

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**Mise en évidence de nouveaux mécanismes de tolérance
induits par des anticorps anti-CD28 en allotransplantation**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Anne-Sophie DUGAST

Le 17 Juin 2008, devant le jury ci-dessous

Président du Jury

Rapporteurs Yves DELNESTE, Directeur de Recherche, Angers

Alain LE MOINE, Docteur, Bruxelles

Examineurs Sabine SARNACKI, Professeur, Paris

Jean-Marie BACH, Docteur, Nantes

Gilles BLANCHO, Professeur, Nantes

Directeur de Thèse Bernard VANHOVE, Docteur, Nantes

| | |
|--|------------------|
| REMERCIEMENTS | 4 |
| ABREVIATIONS | 7 |
| LISTE DES FIGURES..... | 9 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | 11 |
| AVANT PROPOS..... | 12 |
| INTRODUCTION | 13 |
| I- LES REPONSES IMMUNES EN TRANSPLANTATION ET LEUR CONTROLE | 13 |
| <i>I-1- La présentation allogénique</i> | <i>13</i> |
| I-1-1- L’alloreconnaissance directe | 13 |
| I-1-2- L’alloreconnaissance indirecte | 15 |
| I-1-3- Lien entre la voie directe et indirecte et mise en évidence de la voie de présentation semi-directe | 16 |
| <i>I-2- L’activation lymphocytaire T.....</i> | <i>17</i> |
| I-2-1- Le signal antigénique..... | 18 |
| I-2-2- Le signal de costimulation..... | 18 |
| I-2-3- Le signal des cytokines | 19 |
| <i>I-3- Le rejet.....</i> | <i>21</i> |
| I-3-1- Le rejet hyper aigu | 21 |
| I-3-2- Le rejet vasculaire aigu | 21 |
| I-3-3- Le rejet cellulaire aigu..... | 22 |
| I-3-4- Le rejet chronique | 22 |
| <i>I-4- La tolérance.....</i> | <i>25</i> |
| I-4-1- La tolérance centrale..... | 25 |
| I-4-2- La tolérance périphérique..... | 27 |
| a) L’ignorance | 27 |
| b) La délétion | 28 |
| c) L’anergie | 28 |
| d) Inhibition et régulation/suppression | 29 |
| I-4-3- La tolérance clinique dite « opérationnelle »..... | 30 |
| II- LA DIVERSITE DES MECANISMES DE TOLERANCE EN TRANSPLANTATION | 32 |
| <i>II-1- Les cellules T régulatrices.....</i> | <i>32</i> |
| II-1-1- Les cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺ | 32 |
| a) Identification..... | 32 |
| b) Phénotype des cellules T régulatrices T CD4⁺CD25⁺ | 33 |
| c) Les mécanismes suppresseurs des cellules T CD4⁺CD25⁺ | 34 |
| II-1-2- Les cellules T régulatrices induites | 36 |
| a) Les cellules régulatrices induites Tr1..... | 37 |
| b) Les cellules régulatrices induites Th3 | 39 |
| II-1-3- Les cellules régulatrices CD8⁺ | 40 |
| II-1-4- Les cellules régulatrices CD8⁺CD45RClow..... | 42 |
| II-1-5- Les cellules T CD25⁻ | 43 |

| | |
|---|-----|
| II-1-6- Les cellules régulatrices double négatives CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ | 44 |
| II-1-7- Les cellules T régulatrices $\gamma\delta$ (Figure 5) | 45 |
| II-1-8- Les cellules NKT | 46 |
| II-2- Les cellules non-T régulatrices | 47 |
| II-2-1- Les cellules dendritiques..... | 47 |
| II-2-2- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes | 50 |
| II-2-3- Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)..... | 52 |
| II-2-4- Les macrophages activés alternatifs | 55 |
| II-2-5- Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)..... | 57 |
| a) Identification..... | 57 |
| b) Phénotype..... | 57 |
| c) Le microenvironnement promeut le recrutement et la différenciation des MDSC | 58 |
| d) Mécanismes d'action | 59 |
| e) NOS et Arginase..... | 62 |
| III- COSTIMULATION CD28/B7 ET TOLERANCE | 69 |
| III-1- Introduction sur le trinôme CD28/B7/CTLA-4 | 69 |
| III-1-1- Structure et expression | 69 |
| III-1-2- Synapse immunologique et seuil d'activation du TCR..... | 70 |
| III-2- Conséquences de l'engagement de CD28 sur le lymphocyte T | 71 |
| III-2-1- CD28 et cascade de signalisation | 72 |
| III-2-2- CD28 et réponses lymphocytaires | 73 |
| III-2-3- CD28 et survie cellulaire | 74 |
| III-2-4- CD28 et cellules T régulatrices | 76 |
| III-3- Conséquences de l'engagement de CTLA-4 sur le lymphocyte T | 78 |
| III-3-1- CTLA-4 et cascade de signalisation | 78 |
| III-3-2- CTLA-4 et inhibition des réponses lymphocytaires..... | 79 |
| III-4- Les molécules B7 | 82 |
| III-5- Tolérance induite par le blocage de CD28 | 86 |
| III-5-1- Les anticorps anti-CD28 chez la souris..... | 87 |
| III-5-2- Les anticorps anti-CD28 chez le rat | 89 |
| III-5-3- Les anticorps anti-CD28 chez l'homme | 93 |
| RESULTATS | 96 |
| IV- ARTICLE 1 | 96 |
| IV-1- Résultats | 96 |
| IV-2- Perspectives et discussions | 131 |
| V- ARTICLE 2 | 139 |
| V-1- Introduction : La voie Wnt | 140 |
| V-1-1- Identification | 140 |
| V-1-2- Cascade de signalisation de Wnt..... | 140 |
| V-1-3- Rôle de la voie Wnt | 143 |
| V-1-4- Les molécules antagonistes de Wnt..... | 144 |
| V-2- Matériels et méthodes | 147 |

| | |
|--|------------|
| V-2-1- Induction de tolérance | 147 |
| V-2-2- Préparations des échantillons..... | 147 |
| V-2-3- L'analyse des puces à ADN | 148 |
| V-2-4- Clonage de DKK-3 et construction de l'adénovirus | 148 |
| V-2-5- Infection cellulaire avec l'adénovirus | 149 |
| V-2-6- Détection de l'adénovirus DKK-3 | 149 |
| V-2-7- Analyse par Western Blot..... | 149 |
| V-2-8- ELISA | 150 |
| V-2-9- RT-PCR quantitative en temps réel..... | 150 |
| V-2-10- Réponses cellulaires | 150 |
| V-2-11- Immunohistologie..... | 151 |
| V-3- Résultats (encore non publiés) | 152 |
| V-4- Perspectives et discussions..... | 164 |
| V-5- Bibliographie..... | 168 |
| CONCLUSION | 174 |
| BIBLIOGRAPHIE | 176 |
| ANNEXES | 211 |
| VI- ANNEXE 1 TABLEAU MECANISMES D'ACTION DES CELLULES REGULATRICES ET MODELE D'INDUCTION DE TOLERANCE..... | 211 |
| VII- ANNEXE 2 ANTI-CD28 ANTIBODY-INDUCED KIDNEY ALLOGRAFT TOLERANCE RELATED TO TRYPTOPHAN DEGRADATION AND TCR⁺ CLASS II B7⁺ REGULATORY CELLS..... | 223 |
| VIII- ANNEXE 3 IMPLICATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE 7 AND THE NONCANONICAL WINGLESS-TYPE SIGNALLING PATHWAY IN A MODEL OF KIDNEY ALLOGRAFT TOLERANCE INDUCED BY THE ADMINISTRATION OF ANTI-DONOR CLASS II ANTIBODIES | 234 |
| IX- ANNEXE 4 PUBLICATIONS/COMMUNICATIONS/POSTER | 244 |

ABREVIATIONS

AA : Adjuvant-induced Arthritis
AAM Φ : Activated Alternative Macrophage
ACAID : Anterior Chamber Associated Immune Deviation
ADCC : Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity
AdDKK-3 ; Adenovirus DKK-3
AICD ; Activation Induced Cell Death
AIRE : AutoImmune Regulator
AP-1 : Activator Protein 1
APC : Adenomatosis Polyposis Coli
ARG1 : Arginase 1
BTLA : B and T Lymphocyte Attenuator
cAMP
CAM Φ : Classical Activated Macrophage
CIA : Collagen-Induced Arthritis
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX : Cyclooxygenase
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène
CsA : Cyclosporine A
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte Antigen
DKK : Dickkopf
Dsh : Dishevelled
EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EAN : Experimental Autoimmune neuritis
EAU : Experimental Autoimmune uveoretinitis
FC : Fold Change
Flt3 : Fms-like-tyrosine kinase 3
FOXP3 : Forkehead Protein 3
Fz : Frizzled
GVHD : Graft Versus Host Disease
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HSC : Hematopoietic Stem Cells
HSP60 : Heat Shock Protein
ICE : IL-1 β Converting Enzyme
ICOS : Inducible T Cell COStimulator

IDO : Indoleamine DiOxygenase
IFN : Interferon
WNT : Wingless Type
IL : Interleukine
ILT3 : Immunoglobulin-Like Transcript 3
iNOS : inducible nitric oxide synthase
LAG-3 : Lymphocyte Activator Gene 3
LAT : Linker for Activation of T cell
LEW : Lewis
LNMMA: N^G monomethyl-L-arginine
LPS : Lipopolysaccharide
MBP : Myelin Basic Protein
MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells
MMP7 : Matrix Metalloproteinase 7
MOI : Multiplicity Of Infection
MSC : Mesenchymal Stem Cell
NFAT : Nuclear Factor for Activated T cells
NO : Nitric oxide
OVA : Ovalbumine
PBMC : Peripheral Blood of Monocyte Cell
PCP : Planar Cell Polarity
PD-1 : Program Death 1
pDC : Plasmacytoid Dendritic Cell
PGE2 : Prostaglandin E2
PI : Particules Infectieuses
PV : Particules Virales
REIC : Reduced Expression Immortalized Cells
ScFv : Single Chain Fv
SLAM : Signaling Lymphocyte Activation Molecule
STAT-1 : Signal Transducers and Activators of Transcription 1
T reg : T régulateurs
TCR : T Cell Receptor
TNFR : Tumor Necrosis Factor
TTS : tRNA tryptophanyl synthetase
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1 <i>Les différentes voies de présentation allogénique.....</i> | 17 |
| Figure 2 <i>Les mécanismes de tolérance périphérique.....</i> | 30 |
| Figure 3 <i>Mécanismes suppresseurs des cellules T CD4+CD25 + régulatrices.....</i> | 36 |
| Figure 4 <i>Mécanismes suppresseurs des cellules TCD8+ restreintes au Qa-1.....</i> | 42 |
| Figure 5 <i>Mécanismes suppresseurs des cellules T$\gamma\delta$.....</i> | 46 |
| Figure 6 <i>Mécanismes responsables de la tolérance périphérique par les DCs.....</i> | 49 |
| Figure 7 <i>Les fonctions tolérogènes des pDCs.....</i> | 52 |
| Figure 8 <i>Fonctions immunorégulatrices des MSC.....</i> | 55 |
| Figure 9 <i>Effets immunosuppresseurs des MDSC.....</i> | 62 |
| Figure 10 <i>Représentation de l'induction et de la fonction de NO-Tregs.....</i> | 65 |
| Figure 11 <i>Métabolisme de la L-Arg dans les MDSC et régulation de l'activation lymphocytaire T.....</i> | 67 |
| Figure 12 <i>La cascade de signalisation via CD28 induit l'activation lymphocytaire T.....</i> | 75 |
| Figure 13 <i>La cascade de signalisation via CTLA64 induit l'inhibition lymphocytaire T.....</i> | 81 |
| Figure 14 <i>Activation des molécules B7 et induction d'IDO.....</i> | 85 |
| Figure 15 <i>Stratégie de blocage du CD28.....</i> | 87 |
| Figure 16 <i>Stratégies immunosuppresseurs ciblant le CD28.....</i> | 93 |
| Figure 17 <i>Schéma de la construction de la molécule de fusion scFv28.3HaaT.....</i> | 94 |
| Figure 18 <i>Quantification des MDSC dans le sang d'animaux naïfs traités JJ319.....</i> | 135 |
| Figure 19 <i>Western Blot de l'expression de iNOS après culture des lymphocytes T activées avec des MDSC de différentes origines.....</i> | 136 |
| Figure 20 <i>Cascade de signalisation de la voie canonique de Wnt.....</i> | 144 |
| Figure 21 <i>Différences d'expression génique entre des rats tolérants et syngéniques suite à une allogreffe de rein.....</i> | 154 |
| Figure 22 <i>Expression des gènes impliqués dans la voie Wnt après analyse par puces pangénomiques.....</i> | 156 |
| Figure 23 <i>Expression de Dkk-3 dans le rein, le sang et la rate en comparaison avec des animaux syngéniques 100 jours après la transplantation.....</i> | 156 |
| Figure 24 <i>Expression des gènes impliqués dans la voie WNT dans le rein de rats tolérants leur greffe de rein.....</i> | 157 |
| Figure 25 <i>Expression des gènes impliqués dans la voie WNT dans la rate de rats tolérants leur greffe de rein.....</i> | 159 |

| | |
|--|-----|
| Figure 26 Expression des gènes impliqués dans la voie WNT dans le sang de rats tolérants leur greffe de rein..... | 159 |
| Figure 27 Comparaison de l'expression des transcrits <i>Dkk-3</i> dans différents modèles de tolérance après puces à ADN..... | 160 |
| Figure 28 Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la voie WNT dans les sous populations de cellules T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ et les monocytes..... | 161 |
| Figure 29 Analyse de l'expression de l'ARN messager de <i>Dkk-3</i> dans différents compartiments cellulaires d'animaux naïfs et tolérants 100 jours après la transplantation..... | 162 |
| Figure 30 Coupes de rein d'animaux tolérants anti-CD28 marquées avec <i>DKK-3</i> | 162 |
| Figure 31 MLR utilisant des PBMC humains stimulés par des PBMC irradiés allogéniques en présence de dose croissante de protéine recombinante <i>DKK-3</i> | 163 |
| Figure 32 Analyse de l'expression de la protéine <i>DKK-3</i> dans le surnageant de culture de cellules HELA transfectées avec l'adénovirus recombinant <i>DKK-3</i> à différentes MOI..... | 163 |
| Figure 33 Analyse de la cinétique d'expression de la protéine <i>DKK-3</i> dans le sérum de rat après injection de l' <i>AdDKK-3</i> | 164 |
| Figure 34 Analyse par Western Blot de la cinétique d'expression de la protéine <i>DKK-3</i> dans le sérum de rats suite à une allogreffe cardiaque et traités à J0 avec l' <i>AdDKK-3</i> | 165 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 <i>Tableau non exhaustif des principales voies de costimulation du lymphocyte T...</i> | 20 |
| Tableau 2 <i>Résumé des rejets d'allogreffes chez l'homme.....</i> | 24 |
| Tableau 3 <i>Modèles d'induction de tolérance suite au blocage de la molécule CD28.....</i> | 92 |
| Tableau 4 <i>Résumé des différents types de transferts effectués après une allogreffe de rein chez le rat.</i> | 137 |
| Tableau 5 <i>Survie de rats LEW.1A ayant reçu une allogreffe de cœur et traités en intraveineuse avec l'adénovirus recombinant de rat DKK-3 ou avec l'adénovirus CMV null comme contrôle.....</i> | 163 |
| Tableau Annexe 1 <i>Mécanismes d'action des cellules régulatrices et modèle d'induction de tolérance.....</i> | 212 |

AVANT PROPOS

Depuis la découverte de la Cyclosporine, la transplantation d'organes connaît un énorme succès et semble être un traitement de choix en cas d'insuffisance terminale d'un organe vital. Les excellents résultats obtenus en transplantation ont conduit à l'extension de la limite d'âge des receveurs, ce qui entraîne un manque crucial d'organes difficile à surmonter. De plus, la survie à long terme des organes greffés représente un second problème important à considérer en transplantation. En effet, si la survie du greffon rénale est aujourd'hui de 95% à un an et de 85% à 5 ans, il apparaît qu'à 10 ou 20 ans, la survie du greffon tombe respectivement à 40 et 30%.

Les objectifs majeurs de la recherche en transplantation consistent à pallier le manque d'organes et à diminuer les effets secondaires de l'immunosuppression chronique. En effet, cette immunosuppression chronique entraîne un affaiblissement général du système immunitaire du patient, des risques de cancers et ne protège pas contre le rejet chronique de greffons vascularisés. Le but est donc de diminuer les traitements immunosuppresseurs pour induire un état de tolérance où le greffon ne serait pas rejeté en absence ou à faibles doses d'immunosuppression.

Depuis plus de 50 ans, Billingham, Medawar et Brent ont établi le concept de tolérance (Billingham, Brent et al. 1953). La recherche expérimentale sur l'animal a permis de comprendre les différentes phases du rejet de greffe et les effecteurs impliqués dans ces mécanismes. Ainsi, cibler spécifiquement les effecteurs du rejet permet de mieux l'éviter. De nombreux protocoles d'induction de tolérance ont été mis au point ces dernières années. Les résultats de ces expérimentations ont permis le développement de molécules utilisables chez l'homme. Ainsi, l'induction d'un état de tolérance a été établie suite au blocage de l'activation du lymphocyte T ou de différentes voies de costimulation.

Dans cette thèse, je vais tout d'abord présenter les différents types de rejets auxquels sont confrontés les patients. Je détaillerai ensuite les mécanismes de tolérance et les différents types de cellules régulatrices qui y sont associés, je développerai l'importance de la molécule CD28 et les différentes stratégies d'induction de tolérance visant à bloquer la voie de costimulation CD28/B7. Enfin, je présenterai les résultats expérimentaux obtenus dans un modèle de greffe de rein chez le rat, qui étendent notre connaissance des acteurs de la tolérance immunologique en transplantation. En annexe sont rajoutés les papiers obtenus suite à des collaborations réalisées au cours de ma thèse : Jovanovic et al 2008, Hadebourg et al 2007, Guillonnet et al 2007 et Haspot et al 2005.

INTRODUCTION

I- Les réponses immunes en transplantation et leur contrôle

I-1- La présentation allogénique

La capacité du système immunitaire à reconnaître, par réactivité croisée des cellules ou des tissus de la même espèce que l'hôte afin de les éliminer, forme l'allorecognition. Les principaux effecteurs cellulaires de la réponse immune contre des tissus allogéniques sont les lymphocytes T et les complexes majeurs d'histocompatibilités (CMH)/peptides du soi présents sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Après reconnaissance du complexe CMH/peptide, les lymphocytes T sont capables de recevoir des signaux des CPA et déclencher une réponse immune effectrice de type Th1 ou Th2. L'allorecognition se caractérise par deux mécanismes différents : la voie directe et la voie indirecte de présentation antigénique. Ces deux voies peuvent être impliquées dans le rejet d'allogreffe de façon simultanée ou non. Cependant, un nombre important d'études a proposé l'existence d'un troisième mécanisme d'allorecognition, la voie semi-directe.

I-1-1- L'allorecognition directe

L'allorecognition directe correspond à la reconnaissance, par des lymphocytes T du receveur, de molécules intactes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II portées par des cellules du donneur (Daniel, Horvath et al. 1998) (**Figure 1A**). Les lymphocytes T, qu'ils soient CD4⁺ et CD8⁺, sont capables de reconnaître de façon directe le complexe CMH allogénique /peptide porté par les CPA. Les lymphocytes TCD4⁺ reconnaissent le complexe porté par les molécules du CMH de classe II tandis que les lymphocytes TCD8⁺ reconnaissent le complexe présenté par les molécules de CMH de classe I exprimés à la surface de cellules présentatrices du système immunitaire comme les leucocytes passagés situés au sein du greffon. Le groupe de Lafferty a ainsi décrit en 1976, l'existence de la voie directe de présentation de l'antigène et son rôle majeur dans le

développement du rejet aigu (Lafferty, Bootes et al. 1976). Plus tard, cette reconnaissance a été caractérisée comme étant le premier événement conduisant au rejet de greffe (Sherman and Chattopadhyay 1993). L'importance de cette voie directe de présentation décroît au cours du temps au fur et à mesure que les CPA du donneur disparaissent. Ainsi, Lechler propose en 1982 que la perte des leucocytes passager du greffon empêche le rejet de greffe et conduit à une survie permanente des receveurs allogéniques (Lechler and Batchelor 1982). La reconstitution du greffon par injection de CPA du donneur conduit au rejet rapide d'allogreffe (Lechler and Batchelor 1982). Une autre étude a montré que l'ajout de cellules syngéniques T CD4⁺ à des souris immuno déficientes SCID ou Rag1^{-/-}, est nécessaire et suffisant pour induire le rejet aigu d'une allogreffe cardiaque. Cependant, l'absence de molécules de CMH de classe II chez ces souris conduit au rejet aigu d'allogreffe (Pietra, Wiseman et al. 2000) suggérant que la voie de présentation directe est suffisante pour induire le rejet aigu par les TCD4⁺. La réponse directe des lymphocytes T naïfs est générée dès les premiers jours après la transplantation au sein des tissus lymphoïdes. Son intensité est alors déterminée par la fréquence des lymphocytes T spécifiques des molécules de CMH allogéniques (Lindahl and Wilson 1977). Lors d'une greffe cardiaque (van Besouw, Zuijderwijk et al. 2005) ou rénale (Baker, Hernandez-Fuentes et al. 2001) (Hernandez-Fuentes and Lechler 2005) chez l'homme, la fréquence des lymphocytes T alloréactifs activés par la voie de présentation directe, quantifiée en mesurant la sécrétion d'IFN γ par la technique ELISPOT, diminue dans le sang périphérique avec le temps (Hornick, Mason et al. 1998; Baker, Hernandez-Fuentes et al. 2001). Cependant, les cellules T peuvent traverser la barrière de l'endothélium et entrer dans le greffon pour maintenir une réponse immune directe suite à la destruction des CPA du donneur. Ainsi, une étude portant sur des souris déficientes en TCD4⁺ et transgéniques BM3 (dont le TCR est spécifique des molécules de CMH de classe I allogéniques), sont capables de rejeter une greffe de cœur suite à l'activation par la voie directe de lymphocytes TCD8⁺ alloréactifs. Dans ce modèle, ce sont les cellules endothéliales du greffon qui présentent l'antigène et les molécules de costimulation nécessaires à l'activation des TCD8⁺ par l'intermédiaire de la voie directe (Kreisel, Krupnick et al. 2002; Kreisel, Krupnick et al. 2002). De même, des études ont montré que cette réponse était aussi générée par des cellules T mémoires, pré-activées suite à la reconnaissance d'un peptide allogénique dans un contexte de CMH du soi (Lombardi, Sidhu et al. 1990; Merckenschlager, Ikeda et al. 1991).

I-1-2- L'allorecognition indirecte

Par la voie de présentation indirecte, les molécules de CMH du donneur sont capturées par les cellules du receveur (suite à la destruction des cellules du donneur) pour être présentées comme peptides aux lymphocytes T du receveur (Lechler and Batchelor 1982; Inaba, Turley et al. 1998) (**Figure 1B**). En transplantation, cette allorecognition indirecte a été corrélée avec l'apparition du rejet chronique (Lechler and Batchelor 1982; Benichou, Valujskikh et al. 1999; Heeger 2003) avant que son importance soit également démontrée dans le développement du rejet aigu d'allogreffes chez le rongeur (Fangmann, Dalchau et al. 1992) (Auchincloss, Lee et al. 1993) et chez l'homme (Liu, Colovai et al. 1996). D'autres études ont montré que la voie indirecte de présentation était suffisante pour susciter la destruction du greffon en absence de la voie directe (Fluck, Witzke et al. 1999). Le groupe de Auchincloss a ainsi mis en évidence le fait que la voie de présentation indirecte était suffisante pour générer le rejet de greffe : des souris déficientes pour les molécules de CMH de classe I sont capables de rejeter des greffes de peau provenant de souris déficientes pour les molécules de CMH de classe II. Dans ce cas, les lymphocytes TCD4⁺ du receveur peuvent reconnaître indirectement les molécules de CMH de classe I du donneur présentées par les molécules de CMH de classe II du receveur (Auchincloss, Lee et al. 1993). Une autre étude a aussi montré que le transfert de lymphocytes T spécifiques d'un peptide issu des molécules de CMH de classe I dans une souris recevant une greffe de cœur de phénotype correspondant induit le rejet de greffe par l'intermédiaire de la voie indirecte de présentation (Honjo, Xu et al. 2004). Quelques études cliniques ont montré que la fréquence des lymphocytes T activés par la voie de présentation indirecte augmentait au cours du temps chez les patients greffés que ce soit cœur, foie ou rein et présentant un rejet chronique (Hornick, Mason et al. 2000) (Ciubotariu, Liu et al. 1998) (Vella, Spadafora-Ferreira et al. 1997) (Liu, Colovai et al. 1996) (Suciu-Foca, Ciubotariu et al. 1998). Ainsi, la circulation permanente des CPA du receveur présentant des antigènes du donneur au sein du greffon permet à la reconnaissance indirecte d'être constamment active et augmente la fréquence des lymphocytes T alloréactifs de cette voie. La migration des DCs du donneur dans les tissus lymphoïdes est une source d'antigènes pour générer cette voie indirecte de présentation (Austyn and Larsen 1990). D'autres études ont montré que les lymphocytes TCD8⁺ peuvent également être activés par l'intermédiaire de la présentation croisée (Moron, Dadaglio et al. 2004). Dans ce cas, des molécules de CMH de classe I

présentent des peptides non endogènes aux lymphocytes T CD8⁺ (Albert, Pearce et al. 1998; Albert, Sauter et al. 1998).

I-1-3- Lien entre la voie directe et indirecte et mise en évidence de la voie de présentation semi-directe

Certaines études ont permis de montrer qu'il existe un transfert de molécules intactes de CMH entre les cellules (Huang, Yang et al. 1999; Tsang, Chai et al. 2003). Les DCs du receveur peuvent acquérir des molécules intactes de CMH de classe I ou de classe II provenant de cellules du donneur afin de stimuler de façon directe des lymphocytes T CD8⁺ ou T CD4⁺ respectivement (Herrera, Golshayan et al. 2004). Ce troisième type de présentation a été défini comme la voie de présentation semi-directe par le groupe de Lechler (Jiang, Herrera et al. 2004) (**Figure 1C**). Ainsi, par l'intermédiaire de cette voie, les DCs du receveur peuvent présenter simultanément les molécules intactes de CMH de classe I du donneur aux lymphocytes T CD8⁺ par la voie directe mais aussi des peptides digérés et présentés de façon indirecte aux lymphocytes T CD4⁺. L'existence de cette voie pourrait être une alternative pour expliquer des résultats obtenus suite à certaines études. Une première étude a ainsi démontré que des souris déficientes pour le CMH de classe II sont capable de rejeter une allogreffe cardiaque provenant de souris déficientes pour les molécules B7 aussi vite que pour une greffe contrôle. Dans ce cas, la costimulation « in trans » (le signal de costimulation est fournit par une CPA différente de celle qui fournit le signal antigénique) est responsable du rejet de greffe (Mandelbrot, Kishimoto et al. 2001). Cependant, étant donné que la trans costimulation semble inefficace pour l'activation lymphocytaire T (Ding and Shevach 1994), le rejet aigu observé pourrait provenir de l'activation directe des cellules T du receveur par des CPA du receveur suite à l'acquisition de molécules intactes de CMH du donneur. Une seconde étude a montré qu'en absence de la voie indirecte de présentation, le rejet aigu d'épithélium thymique embryonnaire, naturellement dépourvu de CPA, peut être expliqué par l'existence de la voie d'allorecognition semi-directe (Pimenta-Araujo, Mascarell et al. 2001).

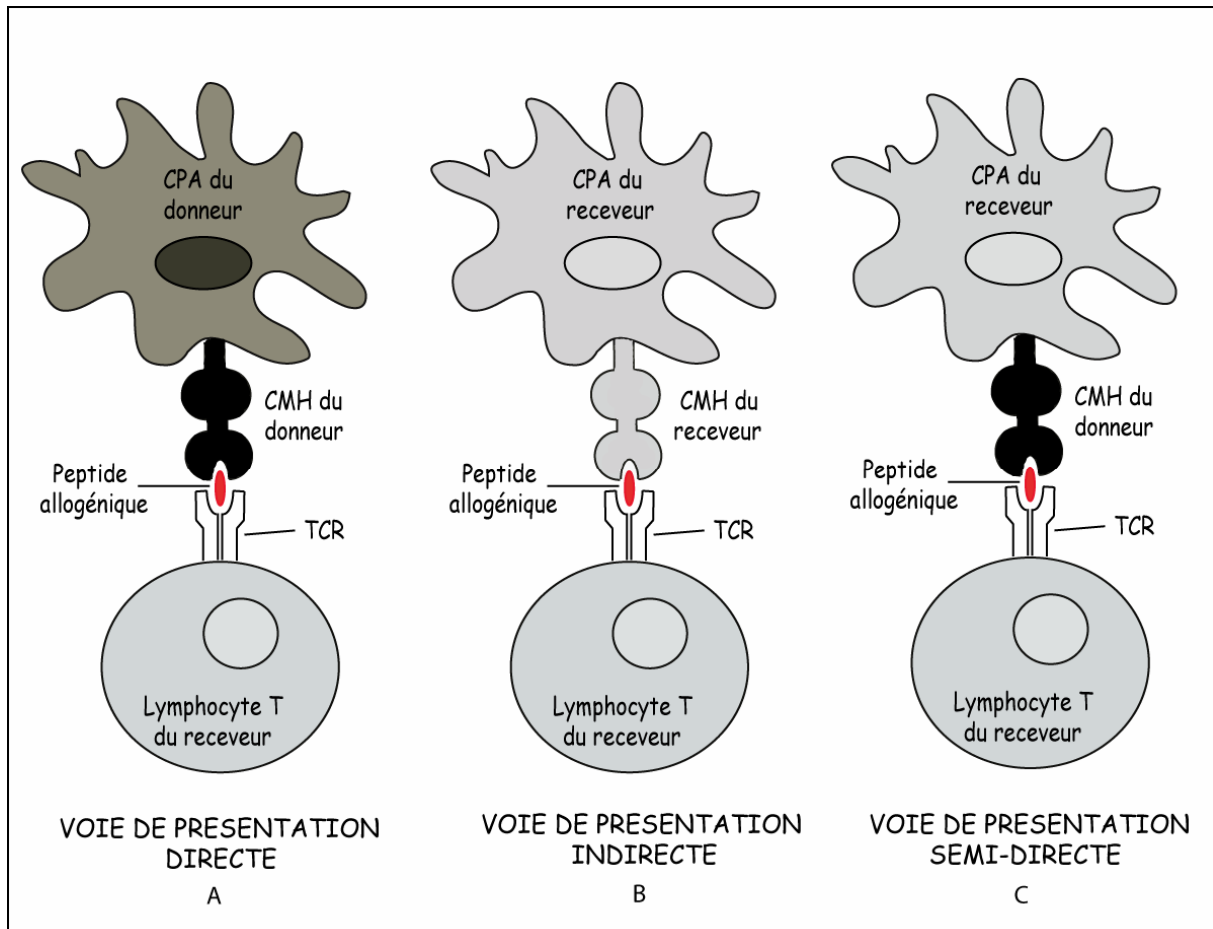


Figure 1 Les différentes voies de présentation allogénique

A, lors de la présentation directe, les molécules de CMH intactes du donneur sont présentées par les CPA du donneur aux lymphocytes T du receveur. B, lors de la présentation indirecte, les molécules de CMH du donneur sont digérées et présentées par les cellules du receveur aux lymphocytes T du receveur. C, lors de la présentation semi-directe, ce sont des molécules intactes du CMH du donneur qui sont portées par les CPA du receveur pour être présentées aux lymphocytes T du receveur.

I-2- L'activation lymphocytaire T

L'activation de cellules alloréactives nécessite trois types de signaux. Le premier signal correspond à la reconnaissance spécifique du TCR (T cell receptor) avec le complexe CMH/peptide porté par la cellule présentatrice d'antigènes (CPA). Le second signal nécessite

l'interaction entre les molécules de costimulation portées par les CPA et leur récepteur porté par les lymphocytes T. Enfin, la combinaison de ces deux types de signaux permet la synthèse et la sécrétion de cytokines comme l'IL-2 ou l'IL-15 constituant le troisième signal d'activation lymphocytaire T.

I-2-1- Le signal antigénique

Le TCR est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β dérivées du réarrangement multiple des segments V, D et J nécessaires à la création d'un répertoire fonctionnel divers. Etant donné que le TCR est dépourvu d'un domaine intracytoplasmique, la transduction du signal suite à la reconnaissance du complexe CMH/peptide est fournie par l'intermédiaire de son association non-covalente avec le CD3. Le CD3 est constitué de 4 sous-unités : δ , ϵ , γ et ζ , qui en plus des deux chaînes α et β du TCR s'associent aux co-récepteurs CD4 ou CD8 nécessaires à la détermination du type de CMH (de classe II ou de classe I respectivement) reconnu par le TCR. L'engagement du TCR avec le complexe CMH/peptide est la première étape nécessaire à la formation de la synapse immunologique qui influence les signaux induits par le TCR. En effet, elle permet l'oligomérisation et la phosphorylation du CD3 par la protéine kinase p56Lck au niveau des domaines ITAM (Weiss and Littman 1994) (Iwashima, Irving et al. 1994) afin d'enclencher la cascade de signalisation nécessaire à la transduction efficace du signal antigénique.

I-2-2- Le signal de costimulation

Le signal de costimulation est le second signal nécessaire à l'activation complète des lymphocytes T. En absence de ce second signal, le lymphocyte T devient anergique, incapables de répondre à une nouvelle stimulation (Jenkins and Schwartz 1987). Cet état anergique peut cependant être totalement restauré suite à l'apport exogène d'IL-2, constituant le troisième signal d'activation. Ce signal de costimulation est fournie par un ensemble d'interactions moléculaires entre le lymphocyte T et la CPA qui augmentent l'avidité du signal antigénique. Ces signaux amplifient le signal transduit par le premier signal indépendamment du CD3 et influencent la réponse cellulaire (Bjorndahl, Sung et al. 1989). Trois grandes familles de molécules de costimulation ont été décrites dans la littérature. Dans

la superfamille des immunoglobulines, on peut distinguer la voie majoritaire de costimulation impliquant l'interaction entre le CD28 exprimé sur les lymphocytes T et leurs ligands B7-1 et B7-2, exprimés par les CPA. De plus, on peut distinguer la superfamille du TNFR (Tumor necrosis Factor Receptor) et la superfamille des intégrines. Notre étude s'étant tout particulièrement intéressée à l'analyse de la voie CD28/B7 dans la greffe de rein chez le rat, seule cette voie sera présentée en détail. Cependant, le tableau 1 résume les principales voies de costimulation impliquées dans l'activation lymphocytaire T.

I-2-3- Le signal des cytokines

Suite à la combinaison des deux signaux précédemment décrits, la sécrétion des cytokines permet aux lymphocytes T de poursuivre leur cycle cellulaire jusqu'à la phase de mitose. La sécrétion d'IL-2 joue un rôle majoritaire dans le devenir de la cellule et nécessite donc une régulation stricte. En effet, suite à sa fixation sur son récepteur de haute affinité, l'IL-2 est nécessaire à la prolifération et la différenciation cellulaire. L'IL-15 qui partage la chaîne β du récepteur à l'IL-2, permet aussi la progression des lymphocytes T dans le cycle cellulaire.

| | Récepteur | Ligand | Effet | Expression |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------------|---|
| Superfamille des Immunoglobulines | CD28 | B7-1<B7-2 | Activateur | Constitutive |
| | CTLA-4 | B7-1>B7-2 | Inhibiteur | Inductible |
| | ICOS | ICOS L | Activateur | Inductible |
| | PD-1 | PD-L1/PDL-2 | Inhibiteur | Inductible (T, B, CPA) Constitutive (NK) |
| | B7H3 | ? | Activateur/Inhibiteur | Inductible |
| | Superfamille du TNFR | CD40L | CD40 | Activateur |
| 4-1 BB | | 4-1 BBL | Activateur | Inductible |
| OX40 | | OX40L | Activateur | Inductible |
| CD27 | | CD70 | Activateur | Constitutive |
| BTLA | | HVEM | Inhibiteur | Inductible |
| HVEM | | LIGHT | Activateur | Constitutive |
| TRANCE | | RANK | Activateur | Inductible |
| GITR | | GITRL | Activateur | Constitutive |
| Intégrines | LFA-1 | ICAM-1 | Activateur | Constitutive |
| | VLA-4 | VCAM-1 | Activateur | Inductible |

Tableau 1 : *Tableau non exhaustif des principales voies de costimulation du lymphocyte T*

I-3- Le rejet

La conséquence la plus naturelle suite à la transplantation de cellules, de tissus ou d'organes entre individus de la même espèce mais génétiquement différents (allotransplantation) est le rejet d'allogreffe. Cependant, des facteurs non immunologiques tels que l'ischémie/reperfusion, des infections ou des toxines peuvent être associés à des réponses inflammatoires non spécifiques modifiant et contribuant au rejet immunologique (Weiser, Williams et al. 1996)(Tableau 2).

I-3-1- Le rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu intervient seulement quelques minutes à quelques heures après la transplantation chez des individus dits hyperimmunisés. Ce type de rejet est dû à la présence d'anticorps préformés, chez le receveur, dirigés contre des molécules du groupe sanguin du donneur (Porter 1965; Kissmeyer-Nielsen, Olsen et al. 1966) ou contre des molécules de CMH du donneur (Williams, Hume et al. 1968). Chez l'homme, ces anticorps préformés sont décelés chez les personnes ayant subi de multiples transfusions sanguines ou chez des femmes immunisées lors d'une grossesse. L'objectif pour empêcher ce type de rejet est donc de déterminer avant la greffe la présence des anticorps anti-donneurs préformés chez le receveur (test de cross match). Ceci a pu être mis en place grâce aux travaux de Dausset et Terasaki en 1980 et a réduit considérablement les risques de rejet hyper aigu suite à la transplantation.

I-3-2- Le rejet vasculaire aigu

Suite au dépôt d'alloanticorps sur les cellules endothéliales, le complément endommage et active l'endothélium qui acquiert des propriétés pro-thrombotiques. (Saadi, Holzknicht et al. 1995). De plus, le recrutement de monocytes et de cellules NK au niveau de l'endothélium par l'intermédiaire de leur récepteur au fragment Fc des immunoglobulines lysent les cellules cibles par ADCC (antibody dependant cellular cytotoxicity). Cependant, ce type de rejet ne se présente pas isolément est souvent associé à un infiltrat cellulaire témoin d'un rejet cellulaire.

I-3-3- Le rejet cellulaire aigu

En absence de traitement immunosuppresseurs, le rejet cellulaire aigu apparaît dans les jours suivant la transplantation chez le rat. Chez l'homme, un rejet aigu peut survenir sous immunosuppression pendant la première année de greffe. En effet, le rejet aigu est dépendant de l'activation des lymphocytes T du receveur dont les T CD4⁺, les T helper CD4⁺ et les T cytotoxiques (Auchincloss, Lee et al. 1993; Pietra, Wiseman et al. 2000; Kreisel, Krupnick et al. 2002). L'activation cellulaire T est amorcée suite à la reconnaissance d'antigènes alloréactifs dans les organes lymphoïdes secondaires et après recirculation, au niveau des cellules endothéliales du greffon (Lakkis, Arakelov et al. 2000). La synthèse de cytokines proinflammatoires permet alors le recrutement de cellules effectrices, les macrophages, au niveau du site de l'inflammation. Suite à l'activation des cellules endothéliales, ces macrophages envahissent alors le greffon pour en anéantir la fonction. De plus, l'activation de cellules cytotoxiques induit la destruction du greffon via l'activation de la voie Fas/FasL ou par exocytose de perforines et de granzymes (Kreisel, Krupnick et al. 2002). Tant que l'élément étranger déclenchant le rejet n'est pas détruit, le processus inflammatoire évolue et l'infiltrat leucocytaire devient un infiltrat composé de lymphocytes, de macrophages et de cellules phagocytaires.

I-3-4- Le rejet chronique

Le rejet chronique est caractérisé par une destruction lente, progressive et irréversible des fonctions du greffon. De pathophysiologie non complètement définie, le rejet chronique semble répondre faiblement aux traitements immunosuppresseurs renforçant l'idée que réponses immunes et non immunes agissent en synergie pour détruire le greffon. L'étude par biopsies des greffons développant un rejet chronique a permis de mieux le caractériser histologiquement. Pour cela, l'évaluation de Banff (Racusen, Colvin et al. 2003) prend en compte les critères histologiques du rejet et les classifie. Ainsi, le rejet chronique est caractérisé par le développement de glomérulopathie chronique d'allogreffe, de vasculopathie associé à des lésions vasculaires touchant principalement les artères et conduisant à la prolifération de l'intima et de la média, d'atrophie tubulaires et de fibroses des tissus. La conséquence directe du rejet chronique suite à une greffe de rein, est une dysfonction progressive du greffon associé à une protéinurie et une hypertension artérielle. Un certain

nombre de modèles expérimentaux suggèrent que la voie de présentation indirecte de l'antigène est majoritaire pendant le rejet chronique (Benichou 1999), cependant, le rôle de la voie directe de présentation ne peut pas être totalement exclu. En effet, des lymphocytes T mémoires activés avant la greffe peuvent réagir de façon croisée avec des molécules de CMH du donneur au moment de la greffe (Bonneville, Moreau et al. 1988; Kreisel, Krupnick et al. 2002; Poggio, Clemente et al. 2004). De plus, des études portant sur les réponses immunologiques dans le rejet chronique montrent que les cellules T CD4⁺ et TCD8⁺ peuvent être impliquées suite à la présentation directe par les cellules endothéliales du greffon. La diminution de T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ générés dans le thymus ou en périphérie semble également corrélée avec le développement du rejet chronique (Louis, Braudeau et al. 2006). Le rôle des alloanticorps est quant à lui encore controversé. En effet, des études chez l'homme (Coupel, Giral-Classe et al. 2003; Hourmant, Cesbron-Gautier et al. 2005) ou chez le rongeur (Pirenne, Kitade et al. 2005; Rifle, Mousson et al. 2005) ont permis de montrer que la présence d'alloanticorps était corrélée avec le développement du rejet chronique. Ainsi, la transfusion de sang du donneur préalablement à une greffe cardiaque chez le rat permet de bloquer le développement du rejet aigu sans empêcher le rejet chronique en présence de taux détectables d'anticorps anti-CMH de classe II dans le sérum (Cuturi, Josien et al. 1994). Des résultats identiques sont obtenus suite à l'utilisation d'un adénovirus CD40-Ig lors d'une greffe cardiaque (Guillot, Guillonnet et al. 2002) ou suite au blocage simultané de la voie CD40/CD40L et CD28/B7 (Guillonnet, Seveno et al. 2007). Cependant, le rejet chronique peut aussi apparaître en absence d'alloanticorps (Guillot, Menoret et al. 2003). D'autres études expérimentales chez le rat ont permis d'abroger le développement du rejet chronique comme suite à une greffe de rein après blocage de la costimulation par utilisation d'anticorps anti-CD28 (Haspot, Seveno et al. 2005) ou l'immunisation à J0 avec un sérum anti-classe II (Degauque, Lair et al. 2006). Enfin, le rejet chronique peut aussi être empêché suite au blocage simultané des voies CD40L/CD40 et ICOS/ICOSL après une greffe cardiaque (Guillonnet, Aubry et al. 2005).

| Type de rejet | Survenue | Histologie | Pathologie | Acteurs du rejet | Thérapie/Issue |
|------------------------|--|---|---|---|---|
| Rejet hyperaigu | Echec de la greffe immédiat Quelques minutes à quelques heures après la reperfusion | Neutrophiles dans les glomérules et les CPT, hémorragie, nécrose et thrombose | Cellules endothéliales endommagées et thrombose vasculaire | Anticorps anti-donneur, complément et activation des cellules endothéliales | Presque toujours irréversible |
| Rejet aigu | Perte rapide des fonctions du greffon (jours) à n'importe quel moment après la transplantation | Neutrophiles et macrophages dans les glomérules et les PTC, nécrose artérielle et tubulaire | Activation des lymphocytes T par les antigènes du greffon et destruction progressive des tissus infiltrés | Lymphocytes T, B, macrophages et cellules NK | Souvent réversible avec un traitement approprié |
| Rejet chronique | Perte lente et progressive des fonctions du greffon (mois à années) avec protéinurie et hypertension | Fibroses interstitielles et intimaes, infiltration de cellules mononucléaires | Activation vasculaire pathologique | Traumatisme vasculaire et activation des lymphocytes T | Thérapie optimale pas encore définie |

CPT capillaires péritubulaires

Tableau 2 : Résumé des rejets d'allogreffes chez l'homme (D'après Robert B. Colvin JASN 2007)

I-4- La tolérance

La tolérance immunologique à l'allogreffe est définie expérimentalement comme l'acceptation, par un hôte immunocompétent, d'un greffon allogénique en l'absence d'immunosuppression. Le receveur doit donc être capable de produire une réponse immune contre d'autres antigènes sans développer de lésions de rejet aigu ou chronique. L'état de tolérance immunologique après une allogreffe de foie est fréquent (25% des greffes, (Sanchez-Fueyo 2005)) et beaucoup plus rare après une greffe de rein. Il a cependant été décrit chez des patients ayant arrêté spontanément leurs traitements immunosuppresseurs ou suite au développement de cancers dans la greffe de rein (Ashton-Chess, Giral et al. 2007). Les mécanismes de tolérance à l'allogreffe sont répartis selon deux catégories : la tolérance centrale ou la tolérance périphérique parmi laquelle on peut distinguer la délétion, l'anergie, l'ignorance ou la suppression/régulation.

I-4-1- La tolérance centrale

La possibilité pour qu'un lymphocyte T développe une réponse immune dépend de la capacité de son récepteur, le TCR, à reconnaître un antigène présenté par une molécule de CMH du soi. Etant donné que le thymus est un organe spécialisé dans le développement et la génération du répertoire lymphocytaire T (Miller 1961; Bevan 1977; Zinkernagel, Callahan et al. 1978), il joue un rôle fondamental dans l'induction de la tolérance. Les précurseurs des lymphocytes T, les thymocytes $CD4^-CD8^-$ double-négatifs, subissent ainsi une sélection positive et négative dès leur arrivée dans le thymus. Les thymocytes double-positifs sont sélectionnés positivement selon la capacité de leur récepteur à reconnaître avec une affinité moyenne les complexes CMH-peptide du soi présentés par les cellules stromales comme les cellules épithéliales ou les cellules dendritiques du cortex (Hogquist and Bevan 1996; Bousso, Bhakta et al. 2002). Selon la nature du CMH que leur TCR a pu lier, les thymocytes double-positifs perdent l'un des deux marqueurs et deviennent simple-positifs $CD4^+$ ou $CD8^+$. Aucun signal de survie ne peut être transmis aux thymocytes qui ne reconnaissent pas de complexes. Dans ce cas, ils sont éliminés et meurent par apoptose. Seuls les thymocytes simple-positifs subissent la sélection négative. Elle est caractérisée par l'élimination des clones autoréactifs, c'est-à-dire une cellule dont le TCR reconnaît trop fortement les complexes CMH-peptide, et

elle limite le développement de l'autoimmunité. Le processus de maturation des thymocytes simple-positifs s'effectue ensuite dans la médulla et est accompagné de la délétion de cellules autoréactives qui ont échappé à la sélection négative dans le cortex (Kyewski and Derbinski 2004). La présentation aux lymphocytes T de peptides autologues par les cellules épithéliales médullaires est sous contrôle de l'expression d'un gène régulateur de la transcription, AIRE (AutoImmune REgulator). Ainsi, AIRE entraîne l'expression de nombreuses protéines dans le thymus qui peuvent être rencontrées en périphérie (Gavanescu, Kessler et al. 2007). L'expression de AIRE sur les cellules épithéliales médullaires permet donc d'établir un état de tolérance au soi par délétion clonale des thymocytes autoréactifs (Zuklys, Balciunaite et al. 2000; Derbinski, Gabler et al. 2005). En effet, des études ont montré que des souris déficientes pour ce gène (AIRE^{-/-}) subissent un défaut dans l'induction de la tolérance et développent des maladies autoimmunes (Anderson, Venanzi et al. 2002) (Liston, Lesage et al. 2003) (Kuroda, Mitani et al. 2005). La sélection positive et négative des thymocytes conduit donc à la production d'un répertoire lymphocytaire T tolérant aux molécules du soi où seulement 1-3% des thymocytes survivent et sont exportés en dehors du thymus (Scollay, Butcher et al. 1980; Egerton, Scollay et al. 1990; Goldrath and Bevan 1999).

En plus des mécanismes de délétions permettant d'induire un état de tolérance au soi, la médulla favorise également la sélection positive de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Sakaguchi 2004; Fontenot, Rasmussen et al. 2005; Watanabe, Wang et al. 2005). Les cellules épithéliales médullaires permettent le développement des cellules T régulatrices en favorisant l'expression de FOXP3 dans les thymocytes doubles positifs de façon dépendante des signaux via CD28 (Aschenbrenner, D'Cruz et al. 2007). Une nouvelle étude a suggéré que l'expression des ligands de CD28, les molécules CD80 et CD86 n'était pas restreinte à la zone médullaire du thymus et qu'elle s'étendait aussi aux cellules épithéliales du cortex rendant la localisation de la sélection positive des Treg incertaine (Gray, Seach et al. 2006).

Suite à l'utilisation de souris déficientes pour certains gènes de chemokines, une étude récente a également permis de montrer que les chemokines produites par les cellules stromales du thymus ont un rôle majeur dans la migration des thymocytes et leur développement ((Takahama 2006) pour revue).

En transplantation, une tolérance centrale peut être obtenue suite au développement d'un chimérisme hématopoïétique. Ce chimérisme hématopoïétique correspond à la colonisation du

thymus par des cellules d'origines hématopoïétiques du donneur qui participent à la sélection du répertoire lymphocytaire T (Goldrath and Bevan 1999). Ainsi, les thymocytes capables de reconnaître les antigènes du donneur ou du receveur comme des éléments du soi meurent par apoptose suite à la sélection négative dans le thymus. L'établissement d'un chimérisme hématopoïétique conduit à la tolérance à l'allogreffe non seulement chez les rongeurs mais aussi chez les primates et chez l'homme (Sykes and Sachs 1988; Kawai, Cosimi et al. 1995) (Spitzer, Delmonico et al. 1999) (Huang, Fuchimoto et al. 2000) (Buhler, Spitzer et al. 2002). Une étude a ainsi permis d'établir la nécessité de thymus du donneur dans l'induction de tolérance suite à une allogreffe de rein (Yamada, Gianello et al. 1997).

I-4-2- La tolérance périphérique

L'étude du développement du répertoire cellulaire T chez des souris thymectomisées a permis de démontrer que les lymphocytes T pouvaient également subir une sélection positive et négative en dehors du thymus (Colson, Abou El-Ezz et al. 1999).

En effet, les cellules T autoréactives qui ont échappé à la délétion clonale dans le thymus sont sujettes aux mécanismes de tolérance périphérique dans les organes lymphoïdes secondaires. Parmi ces mécanismes, on peut distinguer l'ignorance, la délétion, l'inhibition ou la suppression (**Figure 2**).

a) L'ignorance

L'ignorance immunologique correspond à l'absence d'activation lymphocytaire T suite à leur rencontre avec un antigène. Plusieurs mécanismes peuvent être la cause du développement de l'ignorance. Ainsi, le taux d'antigènes détectés par le lymphocyte T peut être insuffisant pour engendrer une activation. Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris en absence d'organes lymphoïdes secondaires, la rencontre entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques ne se fait pas, une ignorance immunologique s'installe et favorise la tolérance à l'allogreffe (Lakkis, Arakelov et al. 2000). De même, les antigènes peuvent être séquestrés dans les sites immunologiquement privilégiés dépourvus de réponses immunitaires tels que le cerveau, les testicules ou la chambre antérieure de l'œil. Par exemple, la greffe d'îlots pancréatiques au niveau des testicules chez la souris permet leur survie. Dans ce cas

cependant, l'ignorance est relative car ce type de tolérance est aussi accompagné d'une diminution des CD8⁺ mémoires et du développement de cellules T régulatrices (voir point I-4-d ci-dessous (Nasr, Wang et al. 2005)).

b) La délétion

Bien qu'essentielle dans le thymus, la délétion clonale peut également avoir lieu en périphérie. Plusieurs mécanismes peuvent induire la délétion des cellules alloréactives. En effet, suite à la présentation antigénique, l'absence de signaux de costimulation (Ferber, Schonrich et al. 1994) ou de facteurs de croissance (Forster, Hirose et al. 1995) empêche d'une part l'activation lymphocytaire T et d'autre part favorise leur délétion. De même, l'IL-2 programme la mort des lymphocytes T par AICD (Activation Induced Cell Death) suite à des stimulations antigéniques répétées. En effet, des souris déficientes pour le gène de l'IL-2 deviennent résistantes à l'AICD ce qui favoriserait le rejet de greffe cardiaque (Dai, Konieczny et al. 1998). De plus, l'AICD des lymphocytes T CD4⁺ est générée suite à l'interaction du récepteur Fas avec le ligand FasL qu'elle expriment en présence de forte quantité d'IL-2 (Singer and Abbas 1994). L'AICD des lymphocytes T CD8⁺ peut être générée par la voie du TNFR (Zheng, Fisher et al. 1995) mais Fas joue également un rôle majeur dans l'élimination des lymphocytes T CD8⁺ autoréactifs (Kurts, Heath et al. 1998). Même en absence de Fas, les lymphocytes T peuvent subir une délétion permettant l'induction de tolérance à une allogreffe cardiaque chez la souris et suggérant l'existence de d'autres mécanismes. (Li, Li et al. 1999).

c) L'anergie

L'anergie est caractérisée par l'incapacité des cellules T activées à répondre à une nouvelle stimulation par le même antigène même en présence d'un signal de costimulation. Cet état a été décrit dans des modèles *in vitro* de tolérance pour des clones cellulaires T chez l'homme (Lamb, Skidmore et al. 1983) et chez la souris (Jenkins and Schwartz 1987). L'absence d'un signal de costimulation suite à la présentation d'un antigène ou une altération du signal transmis par le TCR peuvent aussi conduire au développement d'un état anergique pour la cellule. Cependant, des cellules n'exprimant pas le CTLA-4 résistent à l'induction d'une

anergie (Greenwald, Boussiotis et al. 2001). La pré-activation des lymphocytes T CD4⁺ permettant la sur-expression de CTLA-4 et son engagement avec les molécules B7 semble donc nécessaire à l'induction de leur état anergique *in vivo*. Celui-ci est cependant réversible suite à l'addition d'IL-2 exogène ((Schwartz 2003) pour revue). Au niveau moléculaire, l'anergie dépend d'un flux calcique généré par la synthèse de gènes faisant suite à la translocation de la molécule NFAT dans le noyau (Sloan-Lancaster, Steinberg et al. 1996). Ces gènes semblent différents de ceux activés par la voie NFAT/AP-1 exprimés suite à l'activation lymphocytaire T (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002). De plus, une étude récente a montré qu'un défaut de phosphorylation de la molécule LAT était caractéristique de l'état d'anergie (Hundt, Tabata et al. 2006). Comme les cellules en anergie, les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ sont incapables de répondre à une stimulation par le TCR (Thornton and Shevach 1998). De la même façon, ces deux types de populations sont capables de bloquer la prolifération de cellules T naïves de façon contact dépendante (Chai, Bartok et al. 1999). De plus, des études *in vivo* ont permis de montrer que dans un modèle de greffe de peau ou d'îlots chez la souris, leur injection chez le receveur permet de retarder le rejet (Chai, Bartok et al. 1999; Luo, Gotoh et al. 2000). Enfin, l'interaction des cellules dendritiques avec les cellules T anergiques diminue la capacité des DCs à présenter l'antigène en bloquant l'expression du CMH et des molécules B7 et les rendent ainsi tolérogènes (Vendetti, Chai et al. 2000). *In vivo* chez le singe, l'injection de T allogéniques rendues anergiques par blocage de la costimulation (anti-B7) induit la tolérance à une allogreffe de rein (Bashuda, Kimikawa et al. 2005).

d) Inhibition et régulation/suppression

La tolérance périphérique peut également être induite par des cellules suppressives régulant les fonctions effectrices de cellules voisines. Ceci sera plus amplement décrit dans ma seconde partie en détaillant l'ensemble des cellules régulatrices T ou non-T et leur rôle dans l'induction de la tolérance (voir pages 30-67+ tableau annexe1)

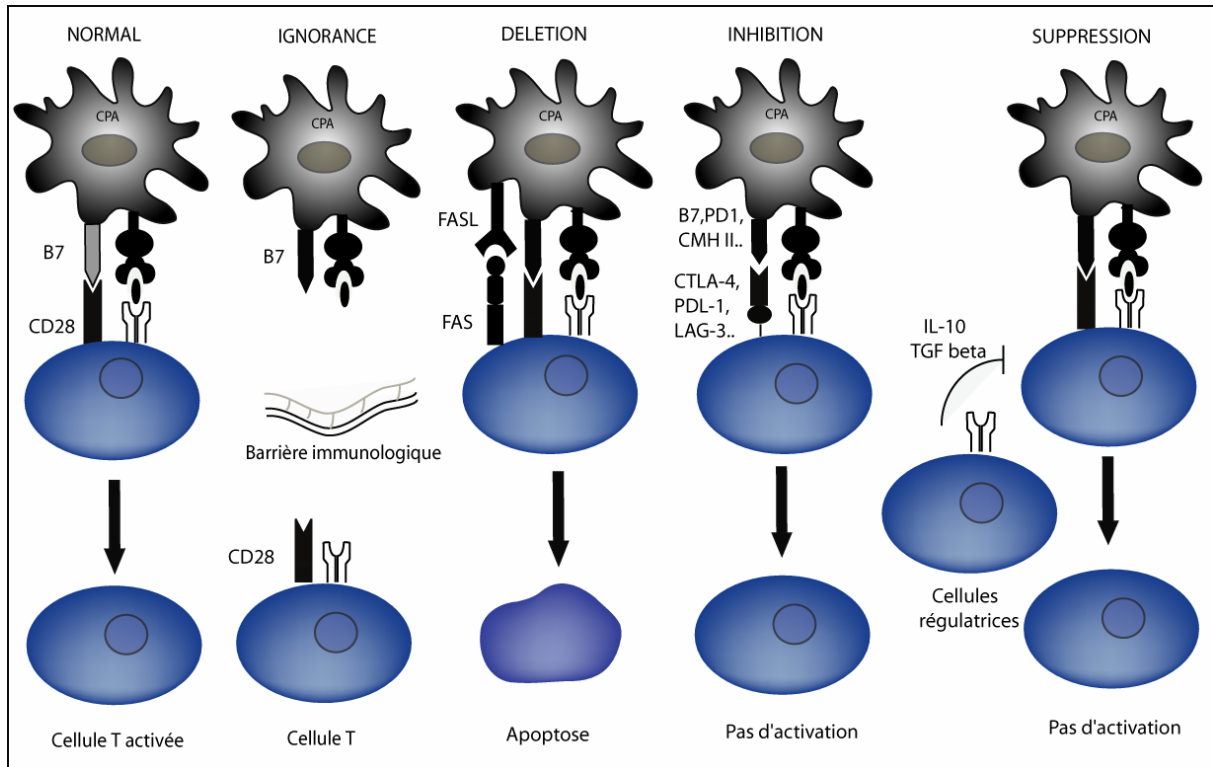


Figure 2 Les mécanismes de tolérance périphérique

(d'après Ian R. Mackay et al New England of Journal in Medicine 2001)

Lors de l'ignorance, les lymphocytes T sont physiquement séparés de leur antigène spécifique par la barrière immunologique et ne peuvent pas devenir activés. Les lymphocytes T qui expriment la molécule Fas en surface peuvent recevoir des signaux des cellules portant le récepteur FasL et rentrer en apoptose. L'interaction de CTLA-4 exprimé par les lymphocytes T avec la molécule B7 portée par les CPA génère un signal négatif d'inhibition de l'activation lymphocytaire. Les cellules régulatrices peuvent inhiber ou supprimer d'autres cellules T via leur production de cytokines, IL-10 et TGF- β .

I-4-3- La tolérance clinique dite « opérationnelle »

Bien que de nouveaux traitements immunosuppresseurs ont considérablement réduit les risques de développement du rejet aigu et ont permis de prolonger la survie du greffon, ils n'empêchent pas le développement du rejet chronique. Bien qu'identifié dans de nombreux modèles animaux, l'établissement d'un état de tolérance est parfois difficile à atteindre chez l'homme. La tolérance opérationnelle est ainsi définie par le maintien d'une fonction stable du greffon sans développement de signes de rejet chronique et en absence d'un traitement

immunosuppresseur depuis plus d'un an. Parmi les facteurs cliniques qui favorisent un état de tolérance opérationnelle, on peut identifier : la qualité du greffon définie par le jeune âge du donneur ou de faibles immunisations avant la transplantation en dépit de nombreuses transfusions sanguines.

De nombreuses stratégies d'induction de tolérance sont à l'étude et ciblent le développement d'immunosuppresseurs plus spécifiques ou le développement d'immunosuppresseurs d'induction. Pour cela, une étude comparative entre des patients tolérant une greffe de rein sous traitements immunosuppresseurs, des patients tolérants ayant spontanément arrêté leur traitement, des patients présentant un rejet chronique et des individus sains permettrait d'identifier une signature transcriptionnelle, dans le sang, de l'état de tolérance (Roussey-Kesler, Giral et al. 2006; Sarwal and Li 2006; Braud, Baeten et al. 2007) et ainsi de comprendre le type de mécanismes à l'origine de leur tolérance. L'analyse du sang périphérique de ces patients ne montre aucune accumulation des transcrits de cytokines inflammatoires dans les clones cellulaires T (Brouard, Dupont et al. 2005) et présente un taux normal de cellules régulatrices $CD4^+CD25^+$ exprimant FOXP3 (Louis, Braudeau et al. 2006) avec un effet suppresseur normal sur les fonctions des cellules effectrices (Braudeau, Racape et al. 2007). Cependant, ces patients tolérants présentent un taux élevé de cellules B (Louis, Braudeau et al. 2006) et de cellules mémoires circulantes tandis que les cellules effectrices $CD8^+CD28^-CD27^-$ sont en nombre inférieur par rapport à des patients en rejet chronique (Baeten, Louis et al. 2006). Cependant, suite à une vaccination contre la grippe, la réponse cellulaire et humorale de ces patients ne semble pas différente de celles développées chez des individus sains (Roussey-Kesler, Giral et al. 2006). Ils semblent développer un phénomène de tolérance naturelle absent chez les patients présentant un rejet chronique.

II- La diversité des mécanismes de tolérance en transplantation

II-1- Les cellules T régulatrices

II-1-1- Les cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺

a) Identification

Dans les années 70, le groupe de Gershon fut le premier à identifier la présence d'une population cellulaire T suppressive dans les maladies autoimmunes (Gershon 1975). D'avantages d'études ont permis de décrire cette population régulatrice, et en 1995, le groupe de Sakaguchi a montré l'existence d'une sous population de T CD4⁺ co-exprimant le marqueur CD25 et représentant 5 à 10% de la population T CD4⁺. Ces cellules, décrites comme une lignée unique de cellules T régulatrices professionnelles, empêchent après transfert adoptif le développement de maladies auto immunes chez des souris *nude* et contribuent au maintien de la tolérance au soi de façon dose dépendante en diminuant la réponse immune contre des antigènes du soi et du non-soi de façon non spécifique (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). De même, d'autres équipes ont montré que des souris thymectomisées âgées de 3 jours développent spontanément une maladie autoimmune pouvant être liées à la disparition des cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ résiduelles du thymus (Suri-Payer, Amar et al. 1998). En 1975, le premier rôle des cellules suppressives dans la tolérance en transplantation a été établi par le groupe de Pinto (Kilshaw, Brent et al. 1975). Dans les années 90, Hall et collègues ont montré que le transfert de cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺ chez des rats traités à la cyclosporine suite à une allogreffe de cœur induisaient la tolérance (Hall, Pearce et al. 1990). Cette population était constituée de cellules T suppressives impliquée dans le maintien de la tolérance en périphérie (Sakaguchi 2000) (Shevach 2002).

b) Phénotype des cellules T régulatrices T CD4⁺CD25⁺

Afin de différencier les cellules T effectrices exprimant CD25 après leur activation des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺, des études ont analysé en détail le phénotype de la sous population suppressive. Ces études ont tout d'abord démontré que la population CD4⁺CD45RBlow chez la souris avait un rôle suppresseur puissant dans les maladies inflammatoires de l'intestin *in vivo* (Powrie, Leach et al. 1993). Plus tard, cette population a été divisée en deux populations en fonction de l'expression différentielle de CD38 : la population CD4⁺CD45RBlowCD38⁺ était capable de supprimer les fonctions des cellules effectrices alors que la population CD4⁺CD45RBlowCD38⁻ apparaît contenir des cellules T mémoires activées incapables de générer un effet suppresseur *in vitro* (Read, Mauze et al. 1998). Les cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices expriment constitutivement le CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated Antigen) (Takahashi, Tagami et al. 2000) connu pour, d'une part interagir avec les molécules B7 et, d'autre part inhiber la prolifération de cellules T effectrices et d'induire ainsi la tolérance. Elles expriment aussi GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene) (Shimizu, Yamazaki et al. 2002), CD103 ($\alpha\beta$ integrin) (Curotto de Lafaille and Lafaille 2002), CD62L (Szanya, Ermann et al. 2002), LAG3 (CD223) (Huang, Workman et al. 2004) ou la neuropiline (Bruder, Probst-Kepper et al. 2004). Pourtant ces marqueurs ne sont pas spécifiques des cellules T régulatrices. Seul le facteur de transcription FOXP3 (forkehead box protein 3) a été identifié comme un gène clé dans le développement et la fonction des cellules T régulatrices (Fontenot, Gavin et al. 2003; Li, Samanta et al. 2006; Ziegler 2006). En effet, les mutations du gène *foxp3* conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée sont responsables d'un désordre lymphoprolifératif chez la souris dénommée *scurfy* (Brunkow, Jeffery et al. 2001) et de maladies autoimmunes chez l'homme (Bacchetta, Passerini et al. 2006). D'autres études ont montré que l'expression de FOXP3 était en effet restreinte à la sous population CD4⁺CD25⁺ (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003). Comme dans le cas de souris KO pour le CTLA-4, les souris *scurfy* sont incapables de réguler l'activité de cellules T, confirmant l'importance de FOXP3 dans la régulation de l'activation et de la prolifération lymphocytaire (Brunkow, Jeffery et al. 2001). Récemment, des études ont révélé un rôle anti-athérogénique essentiel de FOXP3 (Mor, Planer et al. 2007) ainsi qu'un rôle protecteur dans l'athérosclérose (Ait-Oufella, Salomon et al. 2006). De plus, l'introduction du gène *foxp3* dans un vecteur rétroviral peut transformer des cellules CD25⁻ en population régulatrice exprimant CD25, CTLA-4, GITR et

CD103 (Hori, Nomura et al. 2003). De plus, il a été montré que l'utilisation d'un anticorps anti-CD25 chez des patients était bénéfique pour la survie des allogreffes cardiaques. En effet, ce traitement permet d'induire une activité inhibitrice fonctionnelle des T reg suite à l'augmentation de l'expression du facteur de transcription FOXP3 (Vlad, Ho et al. 2007). De même, le groupe de Chen a démontré que le TGFβ était capable de convertir des cellules T CD4⁺CD25⁻ naïves en cellules T CD4⁺CD25⁺ suppressives par l'induction de l'expression du gène foxp3 chez la souris (Chen, Jin et al. 2003). Dans le thymus, l'interaction CD28/B7 induit l'expression de FOXP3 par les cellules double positives pour les engager dans la voie de différenciation des Treg (Bauer, Jiga et al. 2005).

c) Les mécanismes suppresseurs des cellules T CD4⁺CD25⁺

In vitro, les cellules régulatrices ne prolifèrent pas et produisent peu ou pas de cytokines. Elles sont caractérisées comme étant suppressives et anergiques (Sakaguchi 2005). Leur activation est spécifique de l'antigène et dépendante de l'IL-2. En effet, *in vivo*, l'IL-2 et l'IFNγ sont nécessaires à la survie d'allogreffe indiquant l'influence de ces cytokines dans le développement et l'activation des cellules régulatrices (Konieczny, Dai et al. 1998; Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001; Shevach 2002). Elles sont présentes dans des souris normales pour inhiber l'activation de cellules effectrices TCD4⁺CD25⁻ ainsi que leur production d'IL-2 dans un contexte indépendant de l'antigène (Thornton and Shevach 1998). Récemment, il a également été montré qu'elles étaient capables de supprimer la fonction de d'autres types de cellules effectrices incluant les cellules CD8⁺ cytotoxiques (Field, Matesic et al. 2001; Piccirillo and Shevach 2001), les cellules NK (Ghiringhelli, Menard et al. 2005; Smyth, Teng et al. 2006) ou les cellules B (Zhao, Thornton et al. 2006). D'autres études ont démontré l'action des cellules T CD4⁺CD25⁺ sur les CPA en induisant la diminution de l'expression des molécules de costimulation B7-1 et B7-2 ainsi qu'une diminution de leur capacité à stimuler des cellules naïves (Cederbom, Hall et al. 2000; Serra, Amrani et al. 2003). Afin de générer une suppression, les cellules CD4⁺CD25⁺ doivent être activées par leur TCR et nécessitent un contact soit direct avec les cellules répondeuses soit indirecte avec d'autres populations régulatrices qui inhibent l'activation des cellules répondeuses (**Figure 3**). De plus, les cellules T régulatrices peuvent augmenter l'expression de LAG-3 sur les T conventionnelles chez l'homme (Oberle, Eberhardt et al. 2007), ce qui génère la transmission d'un signal inhibiteur à ces cellules lorsqu'elles engagent leur TCR. L'interaction CD28/B7

est cruciale pour maintenir d'une part l'activation mais aussi la régulation du système immunitaire. Les études *in vivo* du groupe de Bushell ont permis de confirmer ces données en démontrant que les signaux via CD28 sont nécessaires à l'induction de l'activité suppressive de la population CD4⁺CD25⁺ contre des alloantigènes du donneur. De façon intéressante, la molécule CTLA-4 exprimée sur les populations régulatrices CD4⁺CD25⁺ peut interagir avec les molécules B7 sur les CPA pour induireIDO (indoléamine 2,3 dioxigénase) et favoriser un état de tolérance (Grohmann, Orabona et al. 2002). La suppression *in vitro* et *in vivo* est aussi dépendante des cytokines en transplantation. Ainsi, le blocage du TGFβ *in vivo* bloque la suppression générée par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Josien, Douillard et al. 1998) (Bickerstaff, VanBuskirk et al. 2000). Ces cellules sont aussi capables de s'expandre *in vivo* de façon dépendante du TGFβ (Peng, Laouar et al. 2004; Ghiringhelli, Menard et al. 2005). Suite à une allogreffe de peau, le traitement du receveur par des anticorps neutralisant dirigés contre l'IL-10, ou le TGFβ provoque le rejet de greffes tolérées par l'action de cellules T régulatrices (Hara, Kingsley et al. 2001; Kingsley, Karim et al. 2002; Lee, Moore et al. 2004). Ces cellules sont également détectées dans de greffons de peau chez des receveurs tolérants (Graca, Thompson et al. 2002). De même, il a été montré que la présentation allogénique par les cellules endothéliales vasculaires permettait l'induction de T reg chez la souris suggérant un rôle important de l'endothélium du greffon dans l'induction et le maintien de la tolérance (Krupnick, Gelman et al. 2005).

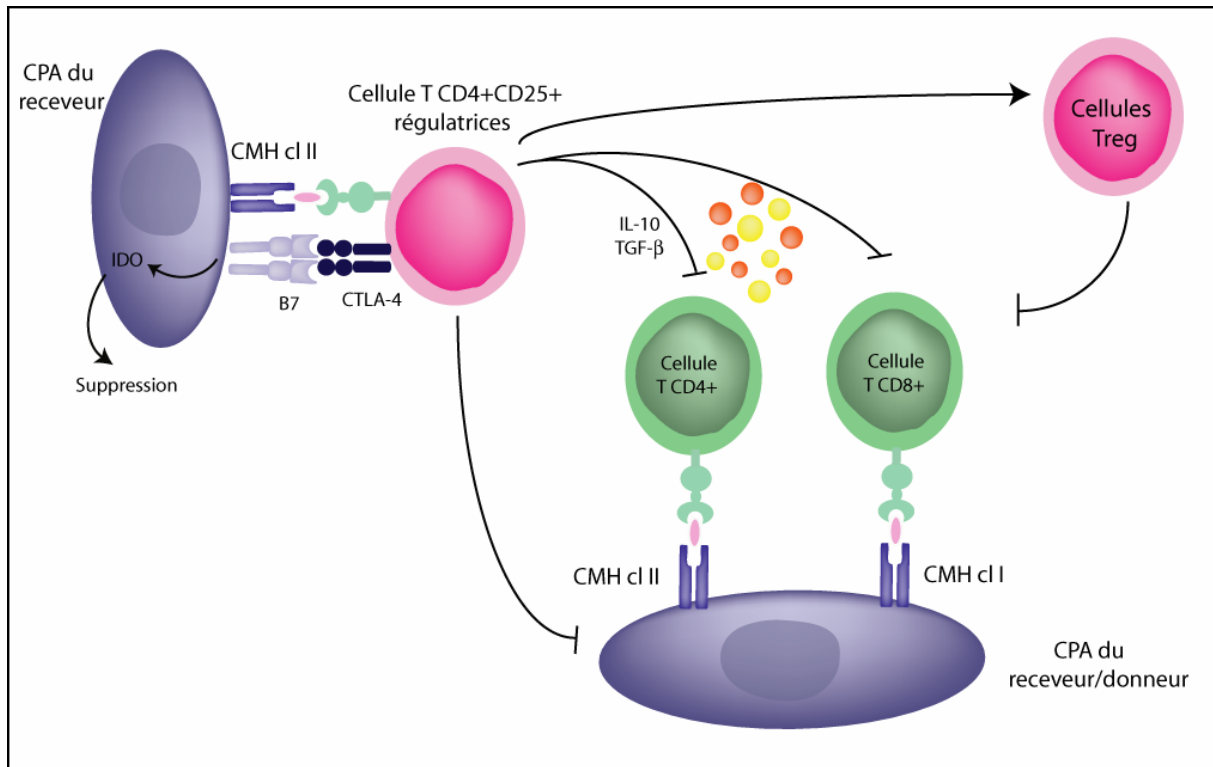


Figure 3 Mécanismes suppresseurs des cellules T $CD4^+CD25^+$ régulatrices

En transplantation, les cellules T $CD4^+CD25^+$ régulatrices sont activées suite à la reconnaissance de l'antigène du donneur sur les CPA du receveur. L'interaction entre B7 sur les CPA et le CTLA-4 des cellules T régulatrices permet l'induction d'IDO par les CPA et favorise un état de tolérance. Les cellules T régulatrices activées peuvent supprimer la réponse immune de façon directe par l'intermédiaire des cytokines qu'elles sécrètent (telles que IL-10 et TGF- β) ou de façon indirecte en activant d'autres types de cellules régulatrices naturelles ou induites pour inhiber l'activation de cellules répondeuses.

II-1-2- Les cellules T régulatrices induites

Les cellules T régulatrices induites ne sont pas issues d'une lignée cellulaire unique et se développent à partir de cellules T $CD4^+CD25^-$ ou de T $CD8^+CD25^-$ en périphérie. Différents types de cellules régulatrices induites sont décrites : les cellules Tr1, les cellules Th3, les cellules $CD4^+CD25^-$ et certaines cellules $CD8^+$.

a) Les cellules régulatrices induites Tr1

i- Identification

L'utilisation de souris transgéniques pour un TCR spécifique du peptide de l'ovalbumine a permis d'analyser les caractéristiques biologiques d'un nouveau type de cellules régulatrices. En contact journalier avec le peptide de l'ovalbumine (voie orale) et en présence d'IL10, ces souris développent des cellules régulatrices avec un profil de cytokines différents de celui des cellules de type Th1 ou Th2. De plus, l'étude de modèles de colite auto-immune chez la souris a permis de démontrer que l'IL-10 était capable de générer une sous population de cellules T CD4⁺ supprimant des réponses immunes dans un contexte dépendant de l'antigène. Ces cellules sont désignées comme étant des cellules régulatrices T de type 1 (Tr1) (Groux, O'Garra et al. 1997).

ii- Phénotype

L'étude du phénotype de ces cellules a permis de montrer qu'elles exprimaient différents marqueurs en fonction de leur état d'activation. Au repos, elles expriment un large répertoire de récepteurs de chemokines comme CXCR3, CCR3, CCR4, CCR5 ou CCR8 (Sebastiani, Allavena et al. 2001) mais aussi des récepteurs spécifiques comme le CCR7 (Sallusto, Lenig et al. 1999). Cependant, suite à leur activation par le TCR, elles expriment de fort taux de CD40L, CD69 ou HLA-DR chez l'homme (Bacchetta, Sartirana et al. 2002) ainsi que CTLA-4 (Kitani, Chua et al. 2000). Cependant, contrairement aux populations régulatrices CD4⁺CD25⁺, elles n'expriment pas FOXP3 (Vieira, Christensen et al. 2004).

iii- Mécanismes d'action

Depuis leur découverte, il apparaît évident que le profil de production de cytokine des cellules régulatrices Tr1 est leur caractéristique majeure. En effet, suite à leur activation par le TCR, elles produisent de grande quantité d'IL-10, de TGF- β , d'IFN γ et d'IL-5 et très peu d'IL-2 ou d'IL-4 (Groux, O'Garra et al. 1997; Roncarolo, Bacchetta et al. 2001). L'ensemble de cette

production de cytokines est responsable de leur activité suppressive. Ainsi, l'action de ces cellules régulatrices semble dépendante d'un facteur soluble et non pas d'un contact cellulaire. En effet, l'utilisation d'anticorps neutralisant anti-IL-10 ou anti-TGF- β , abroge totalement l'effet suppresseur des cellules Tr1 (Kitani, Chua et al. 2000) (Cavani, Nasorri et al. 2000). Cependant, quelques études ont montré que le contact est aussi nécessaire pour générer une suppression optimale. L'expression de récepteurs inhibiteurs encore non identifiés pourraient être augmentées sur les cellules Tr1 dans le but d'interagir avec leur ligand correspondant sur les T ou les CPA (Hawrylowicz and O'Garra 2005). *In vitro*, les cellules Tr1 se différencient à partir de cellules T CD4⁺ en présence d'IL-10 et plus ou moins d'IFN α (Levings, Sangregorio et al. 2001). Les cellules Tr1 peuvent être induites par des cellules dendritiques plasmacytoïdes qui sécrètent de l'IL-10 (Wakkach, Fournier et al. 2003). De plus, certains types de cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ sont capables d'induire le développement de cellules Tr1 (Stassen, Fondel et al. 2004). Les Tr1 prolifèrent très peu après leur activation et ceci est partiellement dépendant de la production d'IL-10 (Groux, O'Garra et al. 1997) (Bacchetta, Bigler et al. 1994). Cependant, l'IL-15 stimule fortement la prolifération des Tr1 en absence d'une activation par le TCR (Bacchetta, Sartirana et al. 2002). Leur activité suppressive s'exerce sur des cellules naïve ou mémoire de type Th1 ou Th2 via leur production d'IL-10 ou de TGF- β (Cottrez, Hurst et al. 2000) (Groux, O'Garra et al. 1997) ou en diminuant la production d'immunoglobulines par les cellules B (Kitani, Chua et al. 2000). De plus, les cellules Tr1 suppriment les capacités des CPA à présenter l'antigène et diminuent l'expression des molécules de costimulation et les molécules de CMH de classe II (Cavani, Nasorri et al. 2000). Les cellules Tr1 régulatrices sont retrouvées au niveau des sites inflammatoires ou elles régulent directement l'inflammation et maintiennent une tolérance périphérique (Cottrez and Groux 2004). En transplantation, des cellules Tr1 ont été retrouvées dans des modèles de tolérance suite à une greffe de peau en plus grande quantité comparativement aux organes lymphoïdes (Sawitzki, Lehmann et al. 2001; Graca, Cobbold et al. 2002). La présence de cellules Tr1 dans le sang de patients SCID greffés avec des cellules souches hématopoïétiques permet d'induire un état de tolérance (Bacchetta, Bigler et al. 1994). De même, cette population apparaît impliquée dans la tolérance suite à une allogreffe rénale ou hépatique chez l'homme (VanBuskirk, Burlingham et al. 2000).

b) Les cellules régulatrices induites Th3

i- Identification

L'administration d'un traitement par voie orale permet d'induire la tolérance dans de nombreux modèles de maladies auto-immunes mais aussi en transplantation. Cette tolérance « orale » est induite suite à l'activité suppressive de cellules régulatrices spécifiques de l'antigène (Faria and Weiner 2005). Ces cellules sont ainsi définies par le terme Th3. De plus, les cellules régulatrices identifiées tout d'abord comme des CD8⁺ peuvent également être des CD4⁺ et sont capables d'induire une suppression immune *in vivo* et *in vitro* (Chen, Inobe et al. 1995).

ii- Mécanismes d'action des cellules régulatrices induites Th3

Les cellules Th3 produisent de grandes quantités de TGF- β et de cytokines de type Th2 comme l'IL-4 ou l'IL-10 (Fukaura, Kent et al. 1996; Seder, Marth et al. 1998). Cependant, ces cellules sont différentes des cellules Th2 classiques. Elles sont capables de générer des mécanismes suppresseurs par un effet « bystander ». En effet, le TGF- β sécrété par les cellules Th3 supprime la prolifération et la production de cytokines des cellules Th1 et Th2 (Chen, Kuchroo et al. 1994). De plus, le TGF- β produit par les cellules Th3 permet d'induire la commutation de classe des IgA ainsi que la sécrétion d'IgA par les lymphocytes B (van Vlasselaer, Punnonen et al. 1992; Weiner 2001). En transplantation, il a été montré que les cellules Th3 (différentes des cellules TCD4⁺CD25⁺) jouent un rôle crucial dans l'induction de tolérance dans un modèle de DST (transfusion de sang du donneur) suite à une allogreffe de cœur chez le rat (Josien, Douillard et al. 1998). Les cellules Th3 se différencient à partir de précurseurs T « helper » dans un microenvironnement riche en TGF- β et en cytokines Th2. Le TGF- β induit la différenciation des cellules Th3 suite à l'altération des signaux que produisent les CPA qui deviennent alors incapables de produire l'IL-12 ou d'exprimer CD40 (Takeuchi, Kosiewicz et al. 1997) (Takeuchi, Alard et al. 1998). De même, les cellules TCD4⁺CD25⁺ exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ induisent des cellules de type Th3 (Stassen, Fondel et al. 2004). Récemment, le groupe de Carrier a identifié un rôle majeur de la population cellulaire Th3

dans la tolérance immune en induisant la différenciation de cellules $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ en périphérie (Carrier, Yuan et al. 2007). Enfin, le TGF- β produit par les cellules Th3 peut induire l'expression de FOXP3 dans des cellules $CD4^+CD25^-$ qui deviennent alors régulatrices (Chen, Jin et al. 2003).

II-1-3- Les cellules régulatrices $CD8^+$

Les cellules T $CD8^+$ suppressives (Ts) ont été tout d'abord décrites dans les années 70. Plus récemment, des études ont décrit une population de cellules régulatrices distinctes chez l'homme caractérisée par le phénotype $CD8^+CD28^-$. Ces cellules suppressives peuvent être induites *in vitro* après plusieurs cycles de stimulation (Jiang, Tugulea et al. 1998) (Colovai, Liu et al. 2000). Les Ts sont restreintes au CMH de classe I (Jiang, Tugulea et al. 1998) et suppriment, de façon spécifique de l'antigène, la réponse cellulaire T $CD4^+$ helper en agissant sur les cellules dendritiques. Ce phénomène est contact dépendant. Ainsi, les CPA permettent une interaction simultanée avec les cellules T suppressives par la reconnaissance des molécules de CMH de classe I et les cellules T $CD4^+$ helper par les molécules de CMH de classe II. Les cellules $CD8^+CD28^-$ augmentent l'expression d'ILT3 et ILT4 (immunoglobulin-like transcript 3 and 4) sur les monocytes, les cellules dendritiques ou les cellules endothéliales en les rendant tolérogènes et incapables de surexprimer les molécules de costimulation (Chang, Ciubotariu et al. 2002). Les CPA deviennent donc incapables d'activer des cellules T $CD4^+$ helper que ce soit contre des alloantigènes (Chang, Ciubotariu et al. 2002) (Manavalan, Kim-Schulze et al. 2004) ou des xénoantigènes (Ciubotariu, Li et al. 2001) *in vitro* et stimulent la génération de cellules régulatrices $CD4^+CD25^+CD45RO^+$ et de nouvelles cellules régulatrices $CD8^+CD28^-FOXP3^+$ (Manavalan, Rossi et al. 2003). Les Ts sont ainsi capables d'inhiber la production d'IL-2 et d'empêcher l'augmentation de l'expression de CD40L et des molécules de costimulation des T $CD4^+$ helper (Liu, Tugulea et al. 1998) (Cortesini, LeMaoult et al. 2001). En transplantation, les cellules $CD8^+CD28^-$ ont été étudiées chez des receveurs suite à une greffe de cœur, de rein ou de foie (Liu, Chen et al. 2007). Le phénotype des cellules T provenant de receveurs tolérants à une allogreffe cardiaque a permis de démontrer une forte expression de cellules T $CD8^+CD28^-CD27^+$ perforine négative (Suciu-Foca, Manavalan et al. 2003) en comparaison avec des cellules provenant de patients rejetant leur greffon (Colovai, Mirza et al. 2003). Les cellules $CD8^+$ provenant de receveurs tolérants à une allogreffe rénale expriment fortement le gène *foxp3* en

comparaison à des animaux naïfs (Zhou, Wang et al. 2007). Enfin, dans un modèle de greffe hépatique chez le rat, la population $CD8^+CD28^-$ génère aussi une immunosuppression et le transfert adoptif de ces cellules abroge le rejet aigu *in vivo*. Le même type d'expériences réalisées *in vitro* permet de montrer que les cellules $CD8^+CD28^-$ induites suite à une DST suppriment les réponses contre les alloantigènes de façon spécifique (Liu, Chen et al. 2007).

La molécule Qa-1 est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe Ib exprimée par les cellules activées et connue pour être un ligand du complexe CD94/NKG2 exprimé par les cellules NK ou les cellules T $CD8^+$ classiques. La molécule Qa-1 (HLA-E) sert de cible aux lymphocytes T suppresseurs, qui bloquent alors les cellules exprimant la molécule Qa-1. En effet, des souris déficientes pour la molécule Qa-1 ou pour les lymphocytes T $CD8^+$ développent les symptômes de l'EAE, suggérant que les cellules T $CD8^+$ restreintes au Qa-1 jouent un rôle important dans la protection contre le développement de l'EAE (Jiang, Zhang et al. 1992; Koh, Fung-Leung et al. 1992) et dans le maintien de la tolérance périphérique (Hu, Ikizawa et al. 2004). De plus, une étude récente a permis de montrer que le peptide HSP60 couplé à la molécule Qa-1 est spécifiquement reconnue par les cellules T $CD8^+$ restreintes au Qa-1 et protège de l'EAE (Chess and Jiang 2004). Cette population est aussi capable de contrôler la réponse immune adaptative face à un antigène du soi ou face à un antigène étranger (Jiang and Chess 2000). Suite à l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ lors de la réponse immune primaire, l'expression membranaire du complexe Qa-1/peptide est augmentée. Celui-ci est alors reconnu par des cellules T $CD8^+$ régulatrices restreintes au Qa-1, qui se différencient en cellules effectrices capables d'inhiber l'activation des cellules T $CD4^+$ exprimant le complexe Qa-1 et régulant ainsi la réponse immune secondaire (Chess and Jiang 2004)(**Figure 4**).

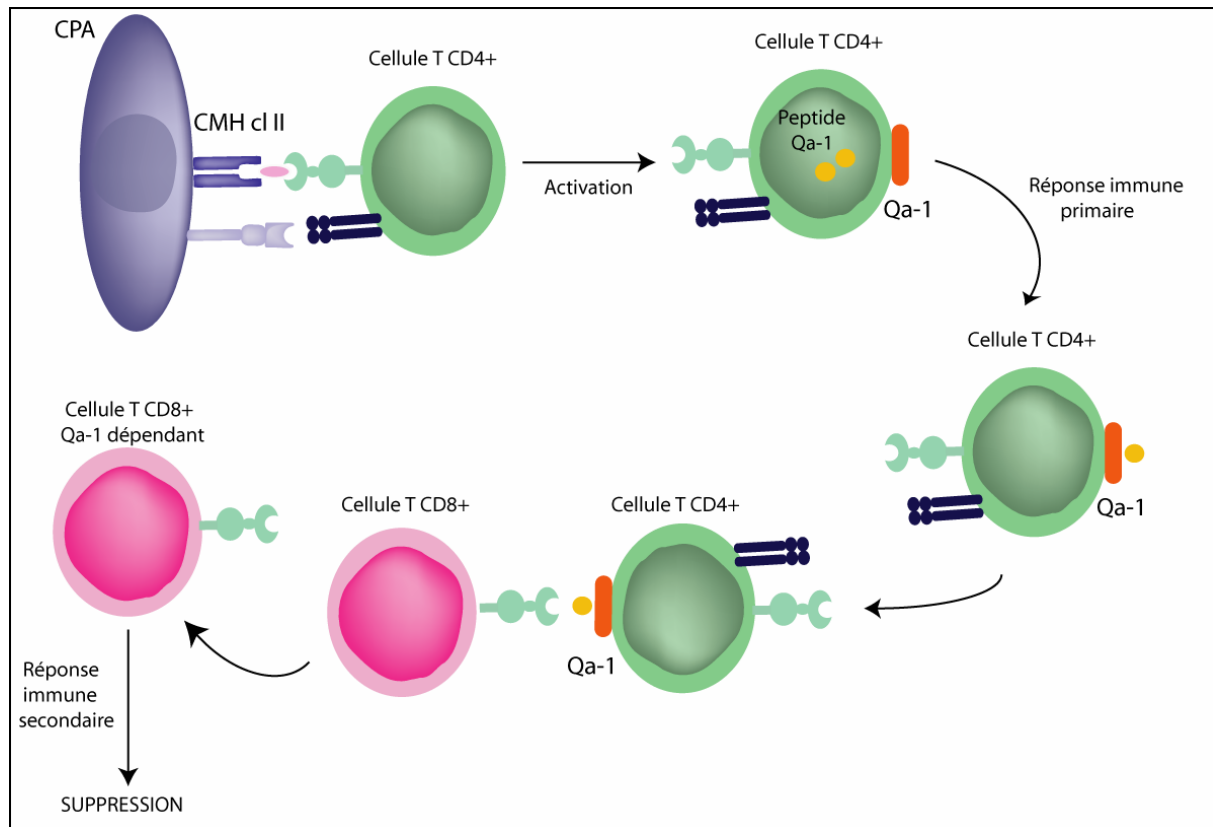


Figure 4 Mécanismes suppresseurs des cellules $T CD8^+$ restreintes au $Qa-1$

(D'après Chess et al *nature immunology* 2004)

L'activation de cellules $T CD4^+$ naïves lors de la réponse immune primaire, induit la présentation en surface d'un complexe $Qa-1$ /peptide reconnu par des cellules $T CD8^+$ restreintes au $Qa-1$. Ces cellules $T CD8^+$ se différencient en cellules effectrices capables de supprimer l'activation de cellules $T CD4^+$ exprimant la molécule $Qa-1$ lors d'une réponse immune secondaire.

II-1-4- Les cellules régulatrices $CD8^+CD45RC_{low}$

Les cellules $TCD8^+CD45RC_{low}$ ont été décrites par l'équipe de Saoudi en 2004 dans un modèle de GVHD chez le rat (Xystrakis, Cavailles et al. 2004). L'analyse du taux d'expression de CD45RC sur les cellules $T CD8^+$ a permis de différencier deux sous populations présentant différentes fonctions et différents profils de cytokines (Xystrakis, Cavailles et al. 2004). Les cellules $CD8^+$ exprimant faiblement le CD45RC en surface ont des propriétés régulatrices. Elles sont non cytotoxiques, produisent des cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13 et expriment FOXP3, CTLA-4 ou GITR (Xystrakis, Dejean

et al. 2004). Elles inhibent la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en cellules de type Th1 de façon contact-dépendante (Xystrakis, Dejean et al. 2004). Le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat génère un clone de cellules T régulatrices CD8⁺CD45RClow capables de prévenir le rejet aigu mais pas le rejet chronique (Guillonnet, Hill et al. 2007). Dans ce modèle, les cellules CD8⁺CD45RClow induisent une suppression locale suite à la sécrétion d'IFN γ qui permet la synthèse d'IDO par les cellules endothéliales du greffon (Guillonnet, Hill et al. 2007).

II-1-5- Les cellules T CD25⁻

Tout comme les cellules T CD4⁺CD25⁺, les cellules T CD4⁺CD25⁻ peuvent également avoir des fonctions régulatrices. Cependant, le pouvoir suppresseur des cellules T CD4⁺CD25⁻ est 10 fois plus faible que celui des cellules T CD4⁺CD25⁺ (Graca, Thompson et al. 2002). Suite à la stimulation par leur TCR respectif, ces deux populations acquièrent deux programmes d'expression de gènes distincts et différents (Graca, Thompson et al. 2002). Les propriétés suppressives de la population CD4⁺CD25⁻ ont été mises en évidence dans plusieurs modèles de maladies auto-immunes (Stephens and Mason 2000) (Curotto de Lafaille, Muriglan et al. 2001) (Furtado, Olivares-Villagomez et al. 2001). De plus, contrairement à des cellules TCD4⁺CD25⁻ issues de souris déficientes pour le CD25, des cellules TCD4⁺CD25⁻ issues de souris déficientes pour le gène de l'IL-2 sont capables de protéger de l'EAE lorsqu'elles sont transférées à des animaux naïfs (Furtado, Curotto de Lafaille et al. 2002). Les cellules TCD4⁺CD25⁻ sont donc capables d'exercer leur pouvoir suppresseur en absence d'IL-2 (Furtado, Curotto de Lafaille et al. 2002). De même, le transfert de cellules T CD4⁺CD25⁻ empêche le développement d'un rejet de greffe de peau chez la souris (Graca, Thompson et al. 2002). Le transfert de cellules TCD4⁺CD25⁻ provenant d'un rat tolérant à une greffe cardiaque suite à une transfusion de sang du donneur induit la survie à long terme des receveurs irradiés et nouvellement greffé (Degauque, Lair et al. 2007). Il a cependant été montré que, *in vivo*, les cellules T CD4⁺CD25⁻ peuvent être converties en T CD4⁺CD25⁺ avec les mêmes propriétés régulatrices et fonctionnelles, suggérant que l'activité régulatrice d'une portion de cellules T CD4⁺CD25⁻ peut être due à une conversion de celles-ci en T régulateurs CD4⁺CD25⁺ (Curotto de Lafaille, Lino et al. 2004).

II-1-6- Les cellules régulatrices double négatives CD3⁺CD4⁻CD8⁻

Les cellules T régulatrices TCR⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻NK1.1⁻ double négative (DN) matures représentent 1 à 5% des lymphocytes T périphériques chez l'homme et 1 à 3% chez les rongeurs (Fischer, Voelkl et al. 2005). Elles n'expriment pas de CD4, de CD8 ou de CD28 (Zhang, Yang et al. 2000) mais expriment des marqueurs d'activation telles que le CD25, CD69 ou FOXP3 (Chen, Ford et al. 2004). Suite à leur activation, les cellules régulatrices DN sécrètent de grandes quantités d'IFN γ et de TNF α mais pas d'IL-2, d'IL-4 ou d'IL-10 (Zhang, Yang et al. 2000). *In vitro*, les cellules T régulatrices DN sont capable d'inhiber la prolifération et de supprimer les réponses immunes allo et xénogéniques des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ de façon dose dépendante (Zhang, Yang et al. 2000) (Young, Yang et al. 2002; Chen, Ford et al. 2003). La régulation des réponses cellulaires T par les cellules DN permet aussi d'inhiber les réponses auto-immunes (Priatel, Utting et al. 2001). Cette inhibition nécessite un contact direct avec les cellules répondeuses et une stimulation par le TCR (Young, DuTemple et al. 2003). Cependant, la stimulation et l'expansion de cellules T DN naïves nécessitent de nombreuses cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-15. Il a été suggéré que les cellules régulatrices T DN génèrent une inhibition spécifique de l'antigène suite à l'expression en surface des complexes CMH-peptide sur les CPA (Zhang, Yang et al. 2000). Les cellules T DN ont également le pouvoir de tuer des cellules T CD8⁺ ou T CD4⁺ via l'interaction Fas/FasL alors qu'elles sont résistantes à l'induction de l'apoptose (Khan, Penninger et al. 1999; Marra, Zhang et al. 2004). *In vivo*, elles contribuent au maintien de la tolérance immunologique (Priatel, Utting et al. 2001), de la prévention du rejet de greffe (Zhang, Yang et al. 2000; Zhang, Yang et al. 2007) et de la GVHD (Young, DuTemple et al. 2003) dans de nombreux modèles animaux. En transplantation, les cellules T DN prolongent la survie d'allogreffe de peau (Zhang, Yang et al. 2000) et de cœur (Chen, Ford et al. 2003). Dans un modèle de xéngreffe cardiaque d'un rat chez une souris, la réponse anti-donneur de cellules T xénoréactives est contrôlée par une augmentation de cellules T régulatrices DN et par une réduction de la stimulation antigénique par les DCs au sein de la greffe (Chen, Diao et al. 2007). Une étude a permis d'établir une corrélation entre la fonction et la localisation de cellules T régulatrices DN. Ainsi l'activité suppressive des cellules T DN apparaît plus importante au sein du greffon que dans la rate suggérant que l'environnement local de la greffe potentialise les fonctions régulatrices de cette population (Chen, Ford et al. 2004).

II-1-7- Les cellules T régulatrices $\gamma\delta$ (**Figure 5**)

Les cellules T $\gamma\delta$ représentent seulement 2 à 3% de la population totale des lymphocytes T. Ces cellules sont majoritairement des cellules $CD4^-/CD8^-$ (Guidos 2006) mais des cellules T $\gamma\delta$ $CD4^+$ ou T $\gamma\delta$ $CD8^+$ ont cependant été caractérisées (Lusso, Garzino-Demo et al. 1995; Harrison, Dempsey-Collier et al. 1996). A la différence des cellules T $\alpha\beta$ (Schild, Mavaddat et al. 1994), les cellules T $\gamma\delta$ reconnaissent directement les antigènes sur les cellules présentatrices sans qu'ils soient apprêtés et présentés par les molécules de CMH (Brenner, McLean et al. 1986) (Shin, El-Diwany et al. 2005). Suite à leur maturation et leur activation, les cellules T $\gamma\delta$ augmentent l'expression en surface des molécules de CMH de classe II et des molécules de costimulation leur permettant de développer des capacités de présentation (Lanzavecchia, Abrignani et al. 1988) (Collins, Werling et al. 1998). De plus, davantage d'études ont permis d'analyser les propriétés régulatrices des cellules T $\gamma\delta$. En effet, l'utilisation de souris déficientes en cellules T $\gamma\delta$ a permis d'établir leur rôle dans le combat contre les infections, le cancer ou le développement de la GHVD (lyse des cellules infectées, régulation des fonctions des cellules T $\alpha\beta$)(Mombaerts, Arnoldi et al. 1993; Raullet 1994; Maeda, Reddy et al. 2005). Afin d'induire leur pouvoir régulateur, elles sécrètent également des chemokines et des cytokines comme l'IL-10 ou le TGF- β nécessaires à la suppression des fonctions effectrices des cellules T $\alpha\beta$ ou des cellules Th1 (**Figure 5**). A l'inverse des cellules T régulatrices $\alpha\beta$, les cellules T $\gamma\delta$ suppressives murines n'expriment pas de FOXP3 et semblent générer une suppression par l'intermédiaire de signaux TLR (Toll Like Receptor) (Peng, Wang et al. 2007). Cependant, elles expriment de fort taux de FasL permettant d'induire la cytolyse de cellules effectrices ou de CPA exprimant le récepteur Fas. Les cellules T $\gamma\delta$ sont recrutées au niveau du site de l'inflammation induite par une infection, des tumeurs ou des lésions autoimmunes où elles réduisent les réactions inflammatoires. Enfin, les cellules T $\gamma\delta$ jouent un rôle crucial dans la tolérance à l'allogreffe. Ainsi, récemment, une étude a démontré la contribution des cellules T $\gamma\delta$ dans la génération de l'ACAID (Anterior Chamber-Associated Immune Deviation) et dans la survie d'une greffe cornéenne suite à la génération de cellules T régulatrices (Ashour and Niederkorn 2006).

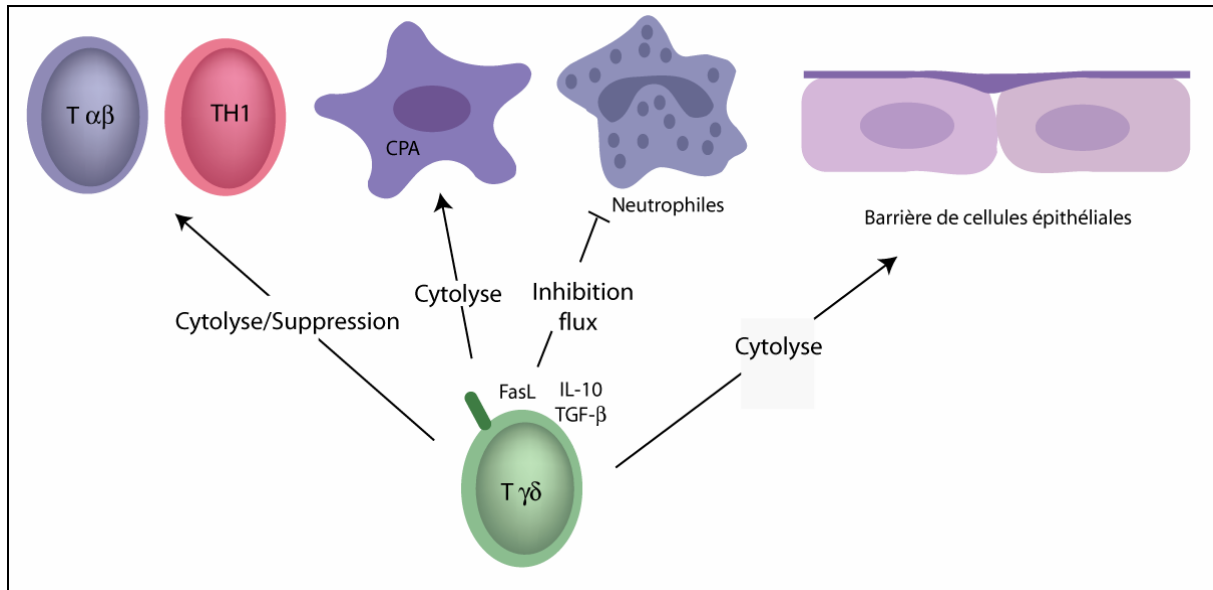


Figure 5 : Mécanismes supresseurs des cellules $T \gamma\delta$

Les cellules $T \gamma\delta$ sont capables de réguler les réponses immunes directement en tuant les cellules effectrices ou indirectement en induisant leur cytolysse via l'interaction Fas/FasL ou suite à la sécrétion de cytokines.

II-1-8- Les cellules NKT

Les cellules NKT représentent une sous-population de cellules T exprimant un TCR monomorphe et des marqueurs de cellules NK comme le CD161 ou NKR1 (Bendelac, Rivera et al. 1997). Dans la majorité des cellules NKT, le TCR est caractérisé chez la souris par un réarrangement $V\alpha 14J\alpha 281 V\beta 8$ de la région CDR3 et par un réarrangement $V\alpha 24J\alpha QV\beta 11$ chez l'homme (Kronenberg 2005). Ces cellules invariantes représentent moins de 0.1% des lymphocytes du sang périphérique chez l'homme et sont générés dans le thymus (Benlagha, Kyin et al. 2002). Elles interagissent avec la molécule de CMH de classe I non classique CD1d qui présente des antigènes du soi glycolipidiques (Vincent, Gumperz et al. 2003; Zhou, Mattner et al. 2004). Leur action est dépendante de l' $IFN\gamma$ et de l'engagement de chemokines avec leur récepteur comme CXCR6/CXCL16 (Jiang, Shimaoka et al. 2005). Par la sécrétion de cytokines de type Th2 ou pro-inflammatoires, les cellules NKT sont responsables de la régulation d'une large variété de maladies auto-immunes (Kukreja, Costi et al. 2002; Kronenberg 2005) (Terabe, Matsui et al. 2000) et de cancers (Kronenberg 2005). En transplantation, les cellules NKT préviennent le développement de la GVHD suite à la greffe

de moelle osseuse allogénique (Zeng, Lewis et al. 1999). Elles sont également responsables de la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris suite au blocage des voies de costimulation LFA-1/ICAM ou CD28/B7 (Seino, Fukao et al. 2001). En effet, le blocage de la costimulation permet la production d'IFN γ par les cellules NKT, contribuant partiellement à l'induction de la tolérance. De plus, l'activation spécifique des cellules NKT restreintes au CD1d permet la production de TGF- β responsable du développement de cellules T régulatrices (Seino, Fukao et al. 2001). Les cellules NKT semblent aussi impliquées dans l'acceptation d'une allogreffe de foie (Kiyomoto, Ito et al. 2005), de peau (Oh, Kim et al. 2005) ou de cornée (Sonoda, Taniguchi et al. 2002). Cependant, dans un modèle d'allogreffe d'îlot, les cellules NKT provoquent le rejet de greffe (Yasunami, Kojo et al. 2005) (Toyofuku, Yasunami et al. 2006).

II-2- Les cellules non-T régulatrices

II-2-1- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) participent à la sélection négative des lymphocytes T dans le thymus et jouent un rôle dans l'induction de la tolérance périphérique des lymphocytes T auto-réactifs qui auraient échappé à la sélection négative (Moser 2003). Contrairement à l'état immature, les DCs matures expriment fortement les molécules de CMH, d'adhésion ou de costimulation et sécrètent des cytokines nécessaires à l'activation optimale des lymphocytes T et au déclenchement d'une réponse immune (Banchereau, Briere et al. 2000). Ainsi, en contrôlant l'activation des DCs, il est possible de contrôler le niveau d'activation lymphocytaire T et d'induire un état de tolérance (Hackstein, Morelli et al. 2001; Hawiger, Inaba et al. 2001; Probst, Lagnel et al. 2003; Steinman, Hawiger et al. 2003). L'équipe de Kurts a été la première à mettre en évidence un rôle des DCs immatures dans la tolérance faisant suite au transfert de cellules TCD8⁺ spécifiques du peptide de l'ovalbumine (OVA) dans une souris transgénique OVA (Kurts, Kosaka et al. 1997). De plus, il a été démontré que l'injection de cellules dendritiques immatures prolonge la survie du greffon cardiaque chez la souris (Fu, Li et al. 1996) (Lutz, Suri et al. 2000; Oh, Lee et al. 2006). Trois mécanismes différents peuvent être responsables de la tolérance périphérique par les DCs : 1) l'anergie des lymphocytes T en absence de signal de costimulation, 2) la délétion de cellules réactives

dépendante soit de l'interaction Fas/FasL, de la capture par les DCs de cellules apoptotiques (Steinman, Hawiger et al. 2003) ou du métabolisme du tryptophane via IDO, 3) l'induction de cellules régulatrices immatures. En effet, les DCs à l'état immature peuvent induire la différenciation de cellules régulatrices de type Tr1 ou Th3 suite à la sécrétion d'IL-10 ou de TGF- β (Jonuleit, Schmitt et al. 2000) (**Figure 6**). En revanche, à l'état mature, les DCs peuvent aussi être tolérogènes dans la mesure où elles sont capables d'une part de maintenir la survie et la fonction de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Yamazaki, Iyoda et al. 2003) et d'autre part de différencier, à partir de précurseurs, les cellules régulatrices TCD4⁺ FOXP3⁺ en périphérie (Yamazaki, Bonito et al. 2007). Plusieurs types de molécules exprimées sur les DCs tolérogéniques ont été identifiés : SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule), PD-L1, DEC-205 (CD205) ou ILT3/4 (Inhibitory receptors of the immunoglobulin Like Transcript family). Le groupe de Chang a montré que chez l'homme, les DCs immatures augmentent l'expression en surface d'ILT3 et ILT4 lorsqu'elles sont en contact avec des cellules T régulatrices CD8⁺CD28⁻ (Chang, Ciubotariu et al. 2002). Ces molécules permettent aux DCs d'inhiber la prolifération de cellules T CD4⁺ alloréactives en empêchant la surexpression de molécules de costimulation (Chang, Ciubotariu et al. 2002). Bien qu'il apparaisse être un bon marqueur des DCs tolérogènes, DEC-205 ne semble pas être lui-même responsable de la transmission d'un signal négatif aux lymphocytes T (Kronin, Wu et al. 2000). Une sous population de DCs double-positives pour les marqueurs CD8 et DEC-205 a été ainsi décrite chez la souris (Kronin, Wu et al. 2000). *In vitro*, alors que la sous population de DCs CD8 α ⁻ DEC-205⁻ induit la prolifération de cellules T CD4⁺ ou T CD8⁺ chez la souris, la sous population de DCs CD8 α ⁺ DEC-205⁺ inhibe la réponse cellulaire T par deux mécanismes différents qu'il s'agisse de TCD4⁺ ou de TCD8⁺. En effet, les DCs CD8⁺ DEC-205⁺ inhibent la réponse cellulaire T CD4⁺ en induisant leur apoptose via l'interaction Fas/FasL (Suss and Shortman 1996) alors qu'ils bloquent celle de TCD8⁺ en limitant la production de cytokines (Kronin, Winkel et al. 1996). Une grande variété de cytokines permet de convertir des DCs immatures en CPA tolérogènes telle que l'IL-10 (Steinbrink, Wolfel et al. 1997), le TGF- β , le HGF (hepatocyte growth factor) ou le G-CSF. En transplantation, l'interaction B7/CTLA-4 entre les CPA et les cellules T est cruciale pour le développement de la tolérance périphérique dans la mesure où elle inhibe l'activation lymphocytaire T (Perez, Van Parijs et al. 1997). Cette inhibition a été attribuée aux signaux impliquant les voies de signalisation STAT-1, p38MAPK et NF κ B permettant la synthèse d'IFN γ , et qui, en retour et en absence d'IL-6, conduit à la synthèse d'IDO (indoleamine 2,3 dioxygénase) (Munn,

Shafizadeh et al. 1999; Grohmann, Orabona et al. 2002). Etant responsable de la dégradation du tryptophane au sein du microenvironnement (Munn, Shafizadeh et al. 1999; Mellor, Munn et al. 2003),IDO inhibe l'activation et la prolifération de divers types de cellules immunitaires telles que les cellules T (Fallarino, Vacca et al. 2002; Munn, Sharma et al. 2002; Terness, Bauer et al. 2002), B ou NK (Frumento, Rotondo et al. 2002) (voir schéma partie II). Des études chez la souris ont aussi suggérées que les produits résultant du métabolisme du tryptophane (kynurenine et acide 3-hydroxyanthranilique) peuvent induire l'apoptose des cellules T (Ozaki, Edelstein et al. 1988; Hwu, Du et al. 2000; Fallarino, Grohmann et al. 2002; Lee, Park et al. 2002; Mellor, Keskin et al. 2002). Malgré un microenvironnement dépourvu en tryptophane, la surexpression de l'enzyme tRNA tryptophanyl synthetase (TTS) induite par l'IFN γ permet aux DCs d'échapper à leur propre destruction. En effet, cette enzyme est responsable de l'association du tryptophane avec son tRNA pour former un complexe Trp-tRNA qui constitue un réservoir d'acides aminés nécessaire à la synthèse protéique et protégeant le tryptophane de sa propre dégradation (Murray 2003; Boasso, Herbeuval et al. 2005).

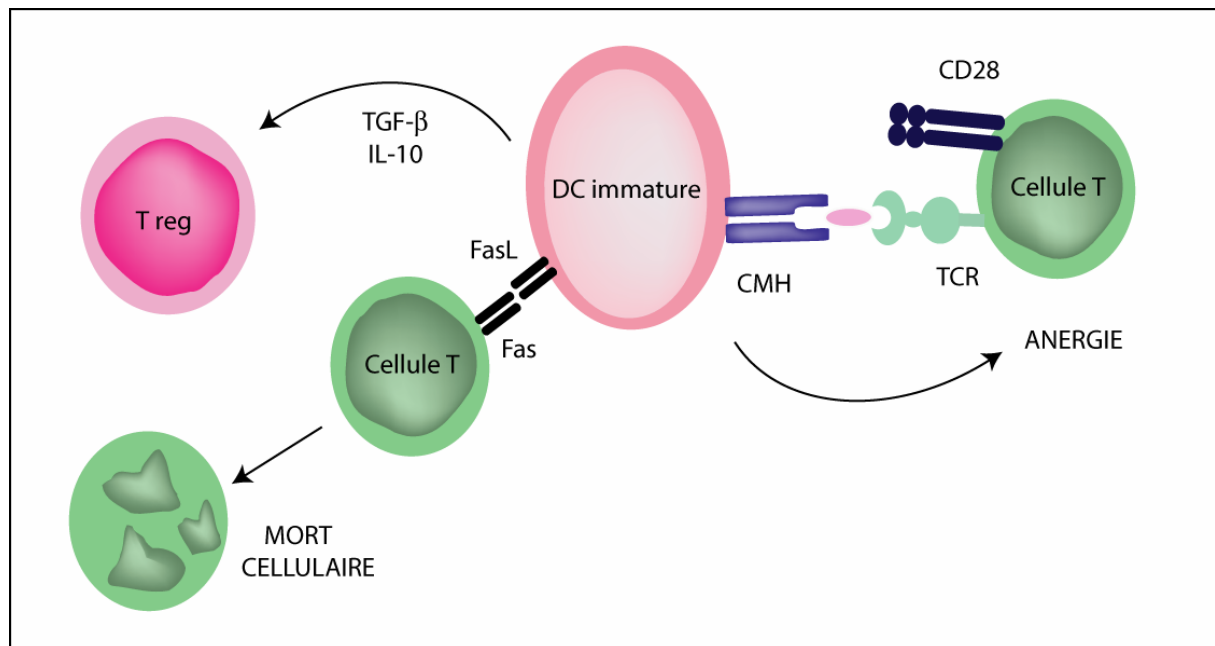


Figure 6 : Mécanismes responsables de la tolérance périphérique par les DCs.

Trois types de mécanismes différents peuvent être responsable de la tolérance périphérique par les DCs : l'anergie de lymphocytes T, la mort par apoptose de cellules réactives, l'induction de cellules régulatrices.

II-2-2- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), présentes dans les tissus lymphoïdes (sang périphérique et moelle osseuse majoritairement) (Dzionek, Sohma et al. 2001) et non lymphoïdes, sont les producteurs majeurs d'interféron de type I et jouent un rôle central dans l'immunité innée et adaptative, l'induction et le maintien de la tolérance ainsi que dans la défense contre les virus (Arpinati, Chirumbolo et al. 2003). Elles constituent un sous type de cellules dendritiques immatures capables de se différencier *in vitro* en cellules dendritiques matures en réponse à différents types de stimulation (Grouard, Risoan et al. 1997). En effet, en présence d'IL-3, de CD40L ou de virus, ces cellules dendritiques matures augmentent l'expression en surface de molécules de CMH de classe II, de molécules de costimulation et de récepteurs de chemokines tel que CCR7 et deviennent ainsi capables d'activer efficacement les lymphocytes T (Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001) (Cella, Facchetti et al. 2000) (Grouard, Risoan et al. 1997). Chez la souris, les pDCs expriment spécifiquement des marqueurs de surface tels que B220, Ly6C ou CD11c (Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001; Nakano, Yanagita et al. 2001) mais pas CD123 (IL-3R α). Chez l'homme, les pDCs immatures expriment communément CD4, CD123, HLA-DR, CD68, ILT-3 et CD45RA (Ito, Inaba et al. 1999) (Cella, Facchetti et al. 2000) (Olweus, BitMansour et al. 1997) (O'Doherty, Peng et al. 1994). Cependant, elles n'expriment pas certains antigènes tels que CD11c, ILT-1 ou des marqueurs tels que CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 et CD56 (Robinson, Patterson et al. 1999) (Cella, Jarrossay et al. 1999). BDCA-2 et BDCA-4 (identique à la neuropiline-1) sont aussi des marqueurs spécifiques des pDCs humaines dans le sang (Dzionek, Inagaki et al. 2002). Ainsi, l'utilisation d'un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement un antigène présent sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes a permis d'identifier BDCA-2 (CD303), une lectine C de type II (Dzionek, Inagaki et al. 2002). Cette molécule joue un rôle dans l'internalisation et la présentation de l'antigène ainsi que dans la suppression de la production d'interféron α/β par les pDCs selon un mécanisme dépendant à la fois de la mobilisation du calcium, de la phosphorylation des tyrosines et de la voie des src kinases (Dzionek, Sohma et al. 2001). Plus récemment, une étude a permis de montrer que la liaison de BDCA-2 avec son ligand génère un signal similaire aux signaux via le BCR (le récepteur des lymphocytes B) (Rock, Schneider et al. 2007). Suite à leur stimulation, les pDCs sont capables de produire de grandes quantités de cytokines en plus de l'IFN α/β incluant le GM-CSF, TNF α , l'IL-6 ou l'IL-8 (Bauer, Redecke et al. 2001) nécessaires à la régulation de

l'inflammation et à la liaison entre l'immunité innée et adaptative. L'IFN de type 1 sécrété par les pDCs humaines favorisent l'activité cytolytique des NKs (Agnello, Lankford et al. 2003). Il peut également affecter les fonctions cellulaires T en permettant leur activation précoce, une longue survie, la production d'IFN γ et la différenciation Th1 via des mécanismes moléculaires différents qu'ils s'agissent de pDCs humaines ou murines (Agnello, Lankford et al. 2003). En se liant à son ligand, BDCA-2 inhibe la production d'IFN α/β par les pDCs et favorise ainsi leur production d'IL-12 (Dzionek, Inagaki et al. 2002). Contrairement aux pDCs matures, les pDCs immatures isolées chez l'homme ou chez la souris expriment des taux peu élevés de molécules de CMH de classe II et de molécules de costimulation et de ce fait sont incapables de présenter efficacement un antigène aux lymphocytes T ou d'induire la polarisation de cytokines (Grouard, Risoan et al. 1997; Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001; Boonstra, Asselin-Paturel et al. 2003). Chez l'homme, les pDCs induisent la génération de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Moseman, Liang et al. 2004). Chez la souris, les pDCs inhibent la réponse lymphocytaire T sans pour autant induire leur anergie mais en leur permettant d'acquérir des propriétés suppressives afin de supprimer la prolifération de d'autres cellules T spécifique de l'antigène (Martin, Del Hoyo et al. 2002). *In vivo*, l'injection d'une population de pDCs isolée du foie prolonge significativement la survie d'une allogreffe cardiaque chez la souris (Lu, Bonham et al. 2001). La stimulation de pDCs par la protéine de fusion CD200-Ig (Fallarino, Asselin-Paturel et al. 2004), CTLA-4 Ig ou GITR-Ig (Puccetti and Fallarino 2008) permet de renforcer leur propriétés immunosuppressives en induisant la synthèse d'IDO par l'intermédiaire de la sécrétion d'IFN de type 1 et favorisant la voie tolérogène du catabolisme du tryptophane (Fallarino, Gizzi et al. 2007). Davantage d'études ont montré que les pDCs de ganglions drainant les tumeurs chez la souris expriment constitutivement IDO. *In vitro*, ces pDCs suppriment la réponse de cellules T face à un antigène présenté soit par les pDCs elles-mêmes soit par d'autres CPA non suppressives (Munn, Sharma et al. 2004). Les pDCs interagissent également avec les mDCs (cellules dendritiques myéloïdes) pour leur conférer la propriété de présenter efficacement un antigène spécifique *in vivo* et d'induire une réponse anti-tumorale (Lou, Liu et al. 2007).

Ainsi, selon leur activation, les pDCs peuvent devenir tolérogènes ou simulatrices. En effet, activées en présence de CD40L et d'IL-3 mais en absence de ligands de TLR, les pDCs développent des fonctions tolérogènes (**Figure 7**). Cependant, suite à leur activation en présence de CD40L, d'IL-3 et de ligands de TLR, elles développent des fonctions

immunostimulatrices produisant de grandes quantités d'IFN de type I et favorisant la différenciation de cellules de l'immunité.

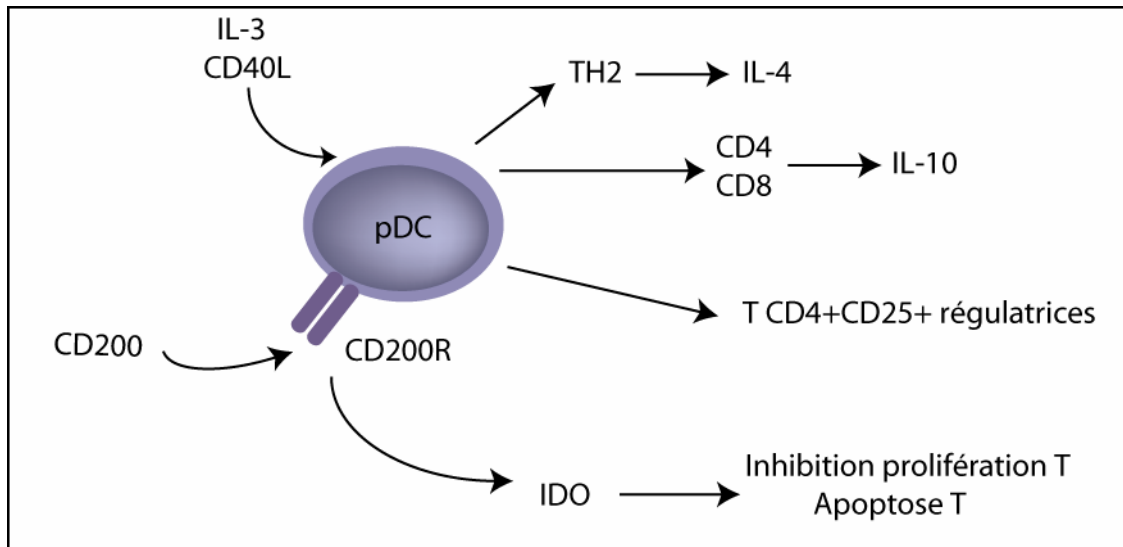


Figure 7 Les fonctions tolérogènes des pDCs.

(D'après Colonna et al 2004 Nature Review Immunology)

Les pDCs activées en présence de CD40L et d'IL-3 mais en absence de ligands de TLR permettent l'activation de cellules de type TH2 produisant de l'IL-4, la génération de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ avec un phénotype régulateur, la génération de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ et la synthèse d'IDO suite à la stimulation via leur récepteur CD200R.

II-2-3- Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont des cellules non hématopoïétiques multipotentes qui ont le potentiel de se différencier en lignées multiples du mésenchyme tels que tissu adipeux, cartilages, tendon, muscle (Pittenger, Mackay et al. 1999). Les MSC sont, à l'origine, isolées à partir de la moelle osseuse mais peuvent aussi bien être retrouvées dans d'autres tissus comme le tissu adipeux (Zuk, Zhu et al. 2001), le liquide amniotique (In 't Anker, Scherjon et al. 2003), le placenta ou les tissus d'origine fœtal ou maternel (In 't Anker, Scherjon et al. 2004) ainsi qu'au niveau du cordon ombilical (Bieback, Kern et al. 2004). Elles sont aussi capables d'acquérir les caractéristiques d'autres lignées cellulaires telles que des cellules endothéliales, des cellules neurales ou des cellules endodermiques (Krabbe,

Zimmer et al. 2005; Laflamme and Murry 2005). Jusqu'à présent, aucun marqueur spécifique unique n'a permis de définir les MSCs. Cependant, suite à leur expansion *ex vivo*, les MSCs peuvent se différencier en multiples lignées mésenchymateuses exprimant CD105, CD73, CD90, CD166, CD44 et CD29 (Pittenger, Mackay et al. 1999; Deans and Moseley 2000). Plus récemment, SSCA-1 (Anjos-Afonso and Bonnet 2007), SSCA-4 (Gang, Bosnakovski et al. 2007) chez la souris ou GD-2 (Martinez, Hofmann et al. 2007) chez l'homme ont été proposés pour être des marqueurs distincts de MSCs. De plus, elles semblent dépourvues de marqueurs de cellules hématopoïétiques ou endothéliales tels que CD11b, CD14, CD31, ou CD45 (Pittenger, Mackay et al. 1999). Les MSCs ont des propriétés immunomodulatrices dans différentes situations tels que le maintien de la tolérance périphérique, l'autoimmunité (Rasmusson 2006; Uccelli, Moretta et al. 2006) ou la tolérance foeto-maternelle (Barry, Murphy et al. 2005). *In vitro*, les MSCs sont capables d'inhiber l'activation et la prolifération de lymphocytes T induites par des alloantigènes (Tse, Pendleton et al. 2003) ou suite à une stimulation polyclonale (Bartholomew, Sturgeon et al. 2002) (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002; Krampera, Glennie et al. 2003) chez l'homme, les rongeurs et les primates en bloquant leur cycle cellulaire en phase G0/G1 et en les rendant anergiques (Glennie, Soeiro et al. 2005). L'étude de ces mécanismes a permis de démontrer que l'interaction des MSCs avec les lymphocytes T est nécessaire à la sécrétion de TGF- β et de HGF (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002) responsables de la suppression de la prolifération des lymphocytes T. PGE2 (Aggarwal and Pittenger 2005), constitutivement sécrété par les MSCs, ou plus récemment NO (Sato, Ozaki et al. 2007), représentent également de bons candidats responsables de cette inhibition.IDO semble également jouer un rôle dans l'inhibition de la prolifération et dans l'induction de l'apoptose des lymphocytes T en présence de MSCs (Meisel, Zibert et al. 2004). Cependant, ces résultats semblent contredits par d'autres travaux démontrant que la coculture avec les MSCs ne conduit pas à l'apoptose cellulaire T induite en présence d'IDO (Tse, Pendleton et al. 2003; Aggarwal and Pittenger 2005). Les MSCs peuvent aussi moduler les réponses immunitaires en induisant la formation de cellules régulatrices T CD8⁺ (Djouad, Plence et al. 2003) ou en amplifiant les cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ (Maccario, Podesta et al. 2005) (Aggarwal and Pittenger 2005). De plus, les MSCs sont responsables du maintien des cellules dendritiques à l'état immature (inhibition de l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation et des molécules de CMH de classe II) leur permettant d'avoir un phénotype de cellules suppressives via l'action de facteurs solubles tels que l'IL-6, le M-CSF (Nauta, Kruisselbrink et al. 2006) ou l'IL-10 (Beyth, Borovsky et al.

2005). D'autres études ont démontré que l'activité immunosuppressive des MSCs pouvait également moduler les fonctions lymphocytaires B. Par l'intermédiaire de facteurs solubles comme PGE₂, les MSCs sont en effet capables de supprimer la prolifération, la différenciation et la production d'anticorps par les cellules B sans modifier leur expression en surface de molécules de costimulation ou leur production de cytokines (Corcione, Benvenuto et al. 2006). Les MSCs peuvent modifier le phénotype des cellules NK et supprimer leur prolifération, leur sécrétion de cytokines ainsi que leur cytotoxicité contre des cellules cibles exprimant le CMH de classe I. Certains de ces effets sont générés par des facteurs solubles tels que PGE₂, TGF- β ou enzymatiques comme IDO (Spaggiari, Capobianco et al. 2008) alors que d'autres nécessitent un contact cellulaire suggérant l'existence de divers mécanismes de suppression des cellules NK par les MSCs (Sotiropoulou, Perez et al. 2006). D'un autre côté, les MSCs peuvent être à leur tour inhibées en étant lysées par des cellules NK activées (Sotiropoulou, Perez et al. 2006; Spaggiari, Capobianco et al. 2006). *In vivo*, une étude a permis de montrer que, chez les primates, les MSCs retardent le rejet d'allogreffe de peau générés par les lymphocytes T (Bartholomew, Sturgeon et al. 2002). Les MSCs sont aussi capables de diminuer le rejet d'une greffe de moelle osseuse allogénique chez la souris (Nauta, Westerhuis et al. 2006) et protègent de l'ischémie/reperfusion dans un modèle de greffe de rein chez le rat (Togel, Hu et al. 2005). Cependant, même si le transfert de MSCs améliore la GVHD suite à la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSC) (Ringden, Uzunel et al. 2006), il peut aussi induire des cellules T mémoires et accélérer le rejet de greffe (Fibbe, Nauta et al. 2007).

Ainsi, les MSC sont des cellules non hématopoïétiques multipotentes qui suggèrent un intérêt particulier en thérapie du fait de leur capacité à moduler les réponses immunes *in vitro* et *in vivo*. Suite à une irradiation subléthale des receveurs de moelle osseuse, elles sont cependant capables de développer une réponse allogénique qui conduit au rejet de greffe. Ces résultats suggèrent que les MSC allogéniques ne se comportent pas comme des cellules suppressives et sont capables d'activer une réponse lymphocytaire T du fait de leur immunogénicité dans des conditions où les receveurs sont immunocompétants.

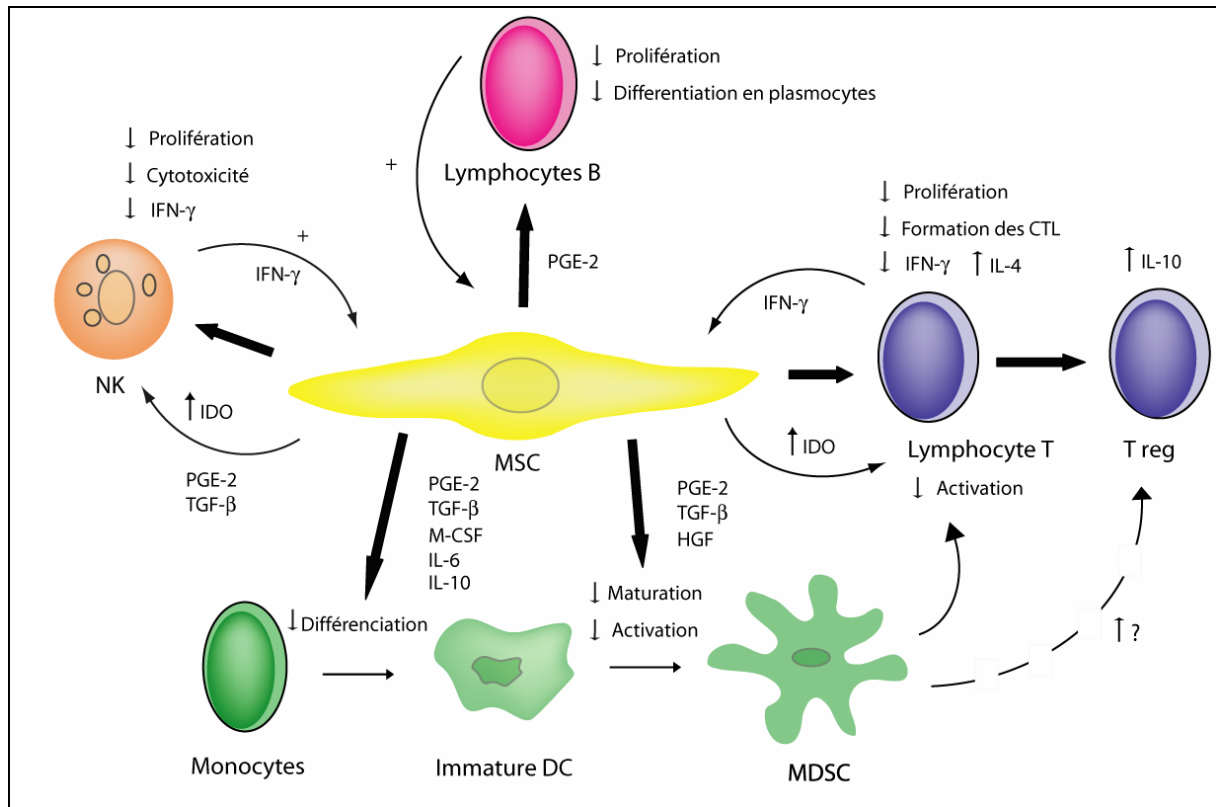


Figure 8 Fonctions immunorégulatrices des MSC (cellules suppressives mésenchymateuses) (D'après Nauta et al Blood 2007)

CTL cellules T cytotoxiques ; HGF, Facteur de croissance des hépatocytes ; IDO indoléamine 2,3 dioxygénase ; PGE2 Prostaglandine E2 ; TGF- β Transforming Growth factor β .

II-2-4- Les macrophages activés alternatifs

Selon leur microenvironnement, les macrophages présentent un phénotype hétérogène permettant de les diviser en deux catégories après activation : les macrophages activés classiques (CAM Φ) et les macrophages activés alternatifs (AAM Φ) (Gordon, Fraser et al. 1992; Gordon 2003; Stout, Jiang et al. 2005). La réponse inflammatoire est majoritairement induite par les macrophages activés classiques (de type M1) sous l'influence d'agents microbiens ou de cytokines de type Th1 tels que l'IFN γ ou l'IL-12 (Louis, Himmelrich et al. 1998; Holscher, Atkinson et al. 2001). Cette activation classique est associée à la production de grandes quantités de NO et de cytokines proinflammatoires tels que l'IL-6 ou le TNF α (Munder, Eichmann et al. 1998; Munder, Eichmann et al. 1999; Welch, Escoubet-Lozach et al. 2002). A l'inverse, la phase de rémission de l'inflammation est générée par les

macrophages activés alternatifs (M2) induits par les cytokines anti-inflammatoires de type Th2 tels que l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, le TGF- β , le GM-CSF ou des glucocorticoïdes (Munder, Eichmann et al. 1999; Gordon 2003). Suite au traitement par l'IL-4 ou l'IL-13 *in vitro*, les macrophages alternatifs murins augmentent l'expression en surface de récepteurs au mannose (CD206) (Stein, Keshav et al. 1992; Martinez-Pomares and Gordon 1999), de récepteur « scavenger » (CD163) (Hogger, Dreier et al. 1998) et de molécules de CMH de classe II (de Waal Malefyt, Figdor et al. 1993) qui stimulent l'endocytose et la présentation antigénique. Cette stimulation induit aussi sélectivement l'expression de d'autres marqueurs tels que la molécule de costimulation PD-L2 (Loke and Allison 2003), CD23 (Becker and Daniel 1990), CD163 (Kristiansen, Graversen et al. 2001), CD14 qui a un rôle crucial dans la phagocytose (Gregory 2000) (Devitt, Moffatt et al. 1998), des chemokines tels que CCL2 (MCP1) (Gao, Wynn et al. 1997), CCL22 (MDC) (Bonecchi, Sozzani et al. 1998), CCL17 (TARC) (Imai, Nagira et al. 1999) ou CCL18 (AMAC1) (Kodelja, Muller et al. 1998), des cytokines comme IL-1 (Mantovani, Locati et al. 2001), IL-10 (Kambayashi, Jacob et al. 1996) ou TGF- β (Lee, Homer et al. 2001) et des enzymes intracellulaires comme l'arginase (Munder, Eichmann et al. 1999; Hesse, Modolell et al. 2001) nécessaire pour le recrutement cellulaire. Une étude récente a montré que l'augmentation de l'expression et la sécrétion de la galectine-3 est une caractéristique majeure des AAM Φ (Mackinnon, Farnworth et al. 2008). Les macrophages alternatifs sont impliqués dans diverses pathologies et tout particulièrement dans les réponses allergiques, cellulaires et humorales contre des parasites et des pathogènes extracellulaires. Chez un individu sain, elles sont retrouvées au niveau du placenta et des poumons où elles protègent contre les réactions immunes non désirées et dans les tissus endommagés où elles diminuent la réponse inflammatoire (Chang, Pollard et al. 1993) (Holt, Schon-Hegrad et al. 1988) (Song, Ouyang et al. 2000) (Mues, Langer et al. 1989). Au niveau fonctionnel, les AAM Φ sont immunosuppressives et bloquent la prolifération de cellules T CD4⁺ activées (Goerdt and Orfanos 1999) (Schebesch, Kodelja et al. 1997). Cependant, cette inhibition semble indépendante des molécules de costimulation ou de la synthèse d'IL-10 et de NO (contrairement aux CAM Φ) (Schebesch, Kodelja et al. 1997). Une étude a montré que le blocage de la voie de costimulation CD28/B7 favorise la génération d'AAM Φ responsables de la suppression de la réponse lymphocytaire T, suggérant un rôle des AAM Φ dans l'induction de la tolérance en transplantation (Tzachanis, Berezovskaya et al. 2002). Récemment, une autre étude a permis de mettre en évidence une fonction encore non caractérisée des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, à savoir leur capacité à

différencier les monocytes en AAM Φ par l'intermédiaire d'une voie partiellement indépendante des cytokines (Tiemessen, Jagger et al. 2007).

II-2-5- Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

a) Identification

Dans les années 80, une nouvelle population cellulaire dénommée cellules naturelles suppressives, distincte des cellules T et NK, a été largement décrite chez la souris portant des tumeurs transplantables (Strober 1984) (Maier, Holda et al. 1989). Ces cellules, générées dans la moelle osseuse sous l'influence de facteurs solubles produits par les tumeurs, dérivent d'une population mixte et hétérogènes de cellules myéloïdes retrouvées à différents stades de différenciation et définies comme des cellules myéloïdes suppressives (MSC) du fait de leur capacité à supprimer des réponses immunes (Bronte, Wang et al. 1998; Bronte, Chappell et al. 1999; Bronte, Apolloni et al. 2000). Afin de minimiser la confusion existante avec les cellules souches mésenchymateuses (MSC), Gabrilovitch a récemment proposé de nommer ces cellules : « les cellules dérivées de cellules suppressives myéloïdes » (MDSC) (Gabrilovich 2007). Ces cellules s'accumulent dans les organes lymphatiques chez la souris (Ezernitchi, Vaknin et al. 2006), suite au développement de différentes pathologies incluant les infections bactériennes (Goni, Alcaide et al. 2002), l'inflammation chronique, la progression tumorale, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Bobe, Benihoud et al. 1999) ou le stress immunitaire (Cauley, Miller et al. 2000).

b) Phénotype

Chez la souris, les MDSC sont caractérisées par la co-expression de marqueurs de cellules myéloïdes tels que Gr-1 (Ly-6G) et de CD11b (Bronte, Wang et al. 1998) ainsi que des marqueurs de cellules immatures comme CD31 (Bronte, Apolloni et al. 2000). D'autres marqueurs en corrélation avec la fonction suppressive de ces cellules sont caractérisés comme le CD80 (Mencacci, Montagnoli et al. 2002) (Yang, Cai et al. 2006), F4/80, CD115 (M-CSF récepteur) (Huang, Pan et al. 2006) ou CD16 (Marshall, Jankovic et al. 2001). Elles expriment

également le CMH de classe I mais pas le CMH de classe II (Gabrilovich, Velders et al. 2001). Chez l'homme, les MDSC accumulées chez les patients cancéreux (Pak, Wright et al. 1995) (Almand, Clark et al. 2001) sont définies par l'expression de marqueurs immatures tels que CD34⁺, CD33⁺, CD15⁺, CD14⁻ et CD13⁺. En présence de facteurs de croissance appropriés, les MDSC peuvent se différencier en cellules présentatrices d'antigènes, en cellules dendritiques ou en macrophages en augmentant l'expression de molécules de costimulation et du CMH de classe II (Bronte, Apolloni et al. 2000) (Kusmartsev and Gabrilovich 2003) (Li, Pan et al. 2004).

c) Le microenvironnement promeut le recrutement et la différenciation des MDSC

De nombreuses études ont montré que le milieu inflammatoire était responsable de la production et de l'accumulation de MDSC capables de bloquer la réponse immune T CD4⁺ et CD8⁺ et de conduire au développement de cancers. En effet, les cellules tumorales sécrètent de grandes variétés de cytokines qui permettent le recrutement des MDSC dans les organes lymphoïdes ou le sang et influencent leur différenciation en cellules suppressives (Kusmartsev, Cheng et al. 2003). Le but en cancérologie est donc d'empêcher l'accumulation de ces cellules suppressives ou de leur permettre de se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages en bloquant les facteurs solubles produits par les cellules tumorales pour activer la réponse immune nécessaire à la régression tumorale (Kusmartsev, Cheng et al. 2003). En effet, la réduction du potentiel inflammatoire chez des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-1 permet de retarder l'accumulation des MDSC et de réduire la progression tumorale et métastatique (Bunt, Yang et al. 2007). De plus, VEGF (vascular endothelial growth factor), un facteur de croissance nécessaire au recrutement (Melani, Chiodoni et al. 2003) et à l'expansion (Ohm and Carbone 2001) des MDSC, M-CSF ou IL-6 bloquent la différenciation des MDSC en cellules dendritiques matures par l'intermédiaire d'un mécanisme nécessitant l'activation de la voie de signalisation STAT-3 (Gabrilovich 2004; Nefedova, Huang et al. 2004). Une autre étude utilisant un adénovirus codant pour le Flt3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand) a permis d'induire l'expansion des MDSC bloquant ainsi l'effet thérapeutique obtenu dans un modèle de cancers suite à l'utilisation de cellules dendritiques et de lymphocytes T, B ou NK (Solheim, Reber et al. 2007). A l'inverse, l'utilisation de siRNA bloquant l'expression du facteur SCF (stem cell factor) ou le blocage

de l'interaction de SCF avec son récepteur c-kit dans un modèle de cancers chez la souris a permis de réduire l'expansion des MDSC, de restaurer la réponse proliférative de cellules T infiltrant la tumeur et ainsi de provoquer le rejet tumoral (Pan, Wang et al. 2008). Une autre étude a montré que la cyclophosphamide empêche la croissance tumorale en favorisant le développement de MDSC capables d'inhiber la réponse immunitaire par l'intermédiaire de la production de NO (Pelaez, Campillo et al. 2001). Le GM-CSF induit lui aussi l'expansion des MDSC qui suppriment la réponse cellulaire T CD8⁺ spécifiques de la tumeur. En revanche en combinaison avec l'IL-4, le GM-CSF induit la différenciation des MDSC en cellules dendritiques matures capables d'activer la réponse immune (Bronte, Chappell et al. 1999; Mellstedt, Fagerberg et al. 1999).

d) Mécanismes d'action

Suite à un stress immun, les MDSC s'accumulent dans les organes lymphoïdes où elles suppriment la prolifération et la production de cytokines de cellules T et B activées par des alloantigènes (Schmidt-Wolf, Dejbakhsh-Jones et al. 1992) ou par une stimulation via le CD3 (Young, Wright et al. 1996) en les bloquant en phase G0-G1 du cycle cellulaire (Mazzoni, Bronte et al. 2002; Serafini, De Santo et al. 2004) de façon contact dépendante (Gabrilovich, Velders et al. 2001; Kusmartsev, Nefedova et al. 2004). Les MDSC sont aussi capables d'inhiber l'activité des cellules NK (Brooks and Hoskin 1994). Une étude *in vitro* a montré que l'ajout de seulement 3% de MDSC étaient capables de bloquer totalement la prolifération des lymphocytes T (Mazzoni, Bronte et al. 2002). De nombreuses études ont montré que l'interaction cellulaire entre MDSC et lymphocytes T, ainsi que la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T, étaient nécessaires au déclenchement de l'activité suppressive par les MDSC (Mazzoni, Bronte et al. 2002). Ainsi, l'étude de souris tumorales a permis de montrer que l'IFN γ produit par les lymphocytes T activés et la stimulation T par le CD40 (Lejeune, Lagadec et al. 1994; Angulo, Rullas et al. 2000; Mazzoni, Bronte et al. 2002) permet aux MDSC d'utiliser les signaux provenant de l'IFN γ et de l'IL-13 qu'elles sécrètent pour supprimer la réponse cellulaire (Gallina, Dolcetti et al. 2006). Afin de contrôler la réponse cellulaire T et en réponse aux signaux fournis par les lymphocytes T activées, les MDSC activées utilisent 2 types d'enzymes impliquées dans le métabolisme de la L-arginine: iNOS qui permet la génération de NO (Kusmartsev, Li et al. 2000) et ARG1 qui appauvrit le milieu

en arginine (Mills, Shearer et al. 1992; Bronte and Zanovello 2005; Gallina, Dolcetti et al. 2006; Makarenkova, Bansal et al. 2006). L'activation de l'une ou l'autre de ces enzymes inhibe la prolifération cellulaire T en interférant avec les voies de transduction des signaux intracellulaires et en induisant l'apoptose des cellules T (Brito, Naviliat et al. 1999; Bronte, Serafini et al. 2003). *In vitro*, l'utilisation d'un inhibiteur de iNOS, le L-NMMA, (Kusmartsev, Li et al. 2000) ainsi que l'utilisation du L-NMMA en combinaison avec l'arginase 1 (Bronte, Kasic et al. 2005) bloquent l'inhibition de la prolifération cellulaire T par les MDSC. De même, l'utilisation d'inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 retarde la progression tumorale en diminuant l'expression de l'ARG1 et de iNOS et ainsi en régulant la machinerie suppressive par les MDSC (Serafini, Meckel et al. 2006). L'inhibition de la prolifération T se traduit également par la perte de la chaîne ζ du TCR ce qui entraîne une diminution des signaux intracellulaires qui en découlent (Otsuji, Kimura et al. 1996; Ezernitchi, Vaknin et al. 2006) de façon dépendante du métabolisme de la L-arginine (Rodriguez, Zea et al. 2002; Zea, Rodriguez et al. 2005) (Rodriguez, Quiceno et al. 2007). En effet, dans un milieu dépourvu en arginine, les lymphocytes T sont bloqués en phase G0-G1 du cycle cellulaire (Rodriguez, Zea et al. 2002). La régulation de la concentration en L-arginine dans le micro-environnement représente donc un mécanisme important pour moduler l'expression de la chaîne CD3 ζ du TCR et ainsi la fonction cellulaire T (**Figure 9**).

En plus de leur action directe, l'équipe de Huang a montré récemment que les MDSC peuvent aussi avoir une action indirecte sur l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T en induisant le développement de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ exprimant FOXP3 (Huang, Pan et al. 2006). Le développement de ces cellules régulatrices est indépendant des mécanismes suppresseurs « classiques » des MDSC fonctionnant par la synthèse de NO. De plus, l'absence de l'expression de CD80 sur les MDSC ou l'utilisation d'anticorps dirigés contre la molécule CTLA-4 retarde la croissance tumorale suggérant que l'interaction CD80/CTLA-4 entre les MDSC et les cellules T régulatrices est nécessaire au développement de ces dernières (Yang, Cai et al. 2006). Une autre étude a analysé l'interaction des MDSC avec les macrophages dans un modèle de cancer chez la souris. La diminution de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages est dépendante de la production d'IL-10 par les MDSC et bloque le développement d'une réponse Th1, ce qui favorise le développement tumoral (Sinha, Clements et al. 2007).

En transplantation, le rôle des MDSC est très peu caractérisé. L'étude de souris déficientes pour la molécule SHIP a permis de montrer qu'elles étaient capables d'accepter une allogreffe

de moelle osseuse sans développer de GVHD. Or, la molécule SHIP intervient dans la régulation de la survie cellulaire, de la prolifération, de la différenciation des cellules myéloïdes ainsi que dans la régulation de l'homéostasie des MDSC (Liu, Sasaki et al. 1999). Ceci suggère que l'inhibition de la GVHD chez les souris SHIP^{-/-} est due à l'accumulation des MDSC qui suppriment les réponses cellulaires T allogéniques (Ghansah, Paraiso et al. 2004; Paraiso, Ghansah et al. 2007). Lors de ma thèse, nous avons pu identifier une population de MDSC en quantité accrue dans une situation de tolérance dans un modèle de greffe de rein chez le rat obtenue à la suite du blocage de la voie de costimulation CD28/B7. Ceci sera plus amplement développé dans ma seconde partie intitulée « résultats ».

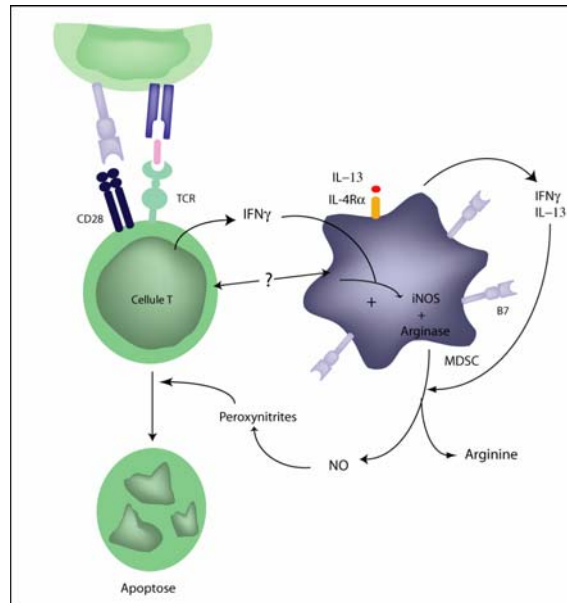


Figure 9 Effets immunosuppresseurs des MDSC

L'IFN γ produit par les cellules T activées et un contact membranaire encore inconnu entre MDSC et lymphocytes T activées permet la sécrétion par les MDSC de monoxyde d'azote (NO) via iNOS et Arginase, induisant la mort par apoptose des lymphocytes T. L'IL-13 sécrété de façon autocrine permet d'amplifier le signal fournit par l'IFN γ pour permettre l'activation des 2 enzymes iNOS et Arginase.

e) NOS et Arginase

i- Le métabolisme de la L-arginine dans les MDSCs

Les MDSC recevant des signaux des cellules T activées sont capables de bloquer la prolifération lymphocytaire T. Afin de contrôler cette réponse, les MDSC utilisent deux enzymes majeures impliquées dans le métabolisme de la L-arginine, l'arginase et NOS (Albina, Caldwell et al. 1989). L'arginase hydrolyse la L-arginine, un acide aminé non essentiel jouant un rôle dans de nombreux systèmes biologiques comme les réponses immunes et la régulation des fonctions des lymphocytes T (Bronte and Zanovello 2005), en urée et L-ornithine tandis que NOS convertit la L-arginine en L-citrulline et en monoxyde d'azote (NO) (Hibbs, Taintor et al. 1987; Wu and Morris 1998; Bogdan 2001). Le NO est une molécule centrale intervenant dans la régulation vasculaire, l'immunité et la neurotransmission (Bogdan 2001; Maniscalco, Sofia et al. 2007). Il est également associé à de

nombreuses pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, le diabète, le lupus érythémateux ou le choc septique (Moncada, Palmer et al. 1991; Nathan and Xie 1994; Liew 1995; Vladutiu 1995) (Kolb and Kolb-Bachofen 1998; van't Hof and Ralston 2001). C'est également un facteur clé de la défense contre des pathogènes intracellulaires comme les virus, les parasites ou les bactéries (Liew and Cox 1991; Nathan and Hibbs 1991; Akaike and Maeda 2000). Différents isoformes de NOS coexistent dans les cellules de mammifères : NOS1 (neuronal NOS) et NOS3 (endothelial NOS) sont constitutivement exprimés par les cellules neuronales et par l'endothélium respectivement alors que NOS2 (inducible NOS), la forme inductible de NOS, est exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires comme l'endothélium vasculaire, les cellules dendritiques et les macrophages. L'induction de NOS2 est sous le contrôle des cytokines de type Th1 telles que l'IFN γ ou le TNF α . De plus, l'activité enzymatique de NOS2 permet de produire 1000 fois plus de NO que les autres isoformes de NOS (Bogdan 2001). Il existe également deux isoformes de l'arginase codés par deux gènes différents, l'arginase I (ArgI), une enzyme cytosolique et l'arginase II, une enzyme mitochondriale. Ces deux isoformes sont exprimées par des macrophages murins. L'ArgI est induite par les cytokines de type Th2 telles que IL-4, IL-13, IL-10 ou TGF β tandis que l'ArgII est induite par le LPS, cAMP ou suite à une stimulation bactérienne (Morris, Kepka-Lenhart et al. 1998; Wu and Morris 1998).

ii- Activités délétères de NO

Malgré son action protectrice en transplantation, le NO peut également avoir des effets délétères en induisant l'activation des lymphocytes T. Ainsi, à de faibles concentrations, le NO inhibe l'apoptose des cellules T et augmente la viabilité cellulaire (Niedbala, Wei et al. 1999). Une étude récente a permis de montrer qu'à de faibles doses, NO a également la capacité d'induire directement la différenciation et la prolifération de cellules murines de type Th1, associées avec les maladies inflammatoires, en synergie avec l'IL-12 produit par les CPA via un mécanisme dépendant de la cGMP (3'5' cyclic guanosine monophosphate) favorisant l'expression de l'IL12R β 2 (Niedbala, Cai et al. 2006). De plus, suite à une stimulation polyclonale anti-CD3/CD28, les signaux via NO sont nécessaires à l'induction du flux calcique suggérant un rôle essentiel du NO dans l'activation des lymphocytes T. Le NO produit pendant l'infection et l'inflammation peut agir en synergie avec le signal TCR pour

stabiliser la p53 qui permet la synthèse d'IL-2 par les cellules T CD4⁺CD25⁻. L'IL-2 induit l'expression de son récepteur (CD25) pour permettre d'induire la prolifération.

En fonction des cellules qui le produisent, le NO ne semble pas avoir les mêmes caractéristiques fonctionnelles. En effet, une étude récente a permis de montrer que la surexpression de NO par les cellules dendritiques immatures leur permet d'augmenter l'expression en surface des molécules de CMH de classe II ainsi que les molécules de costimulation CD80 et CD86 nécessaires à l'induction de la prolifération des lymphocytes T. Dans ce cas, NOS2 interagit avec CD74, une molécule indispensable à l'augmentation en surface des molécules de CMH II sur les cellules dendritiques matures et dont la dégradation par les caspases est contrôlée par la présence de NO (Huang, Cai et al. 2008).

iii- Activité protectrice de NO

L'étude mécanistique a permis de montrer que la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T activés en synergie avec un contact membranaire encore non déterminé entre lymphocytes T et MDSC, sont nécessaires à la production de NO ainsi qu'à l'inhibition des réponses immunes (Apolloni, Bronte et al. 2000; Mazzoni, Bronte et al. 2002; Bronte, Serafini et al. 2003). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de NOS2 a permis de démontrer que la sécrétion de NO par les MDSC est responsable de l'inhibition de la réponse lymphocytaire T (Bingisser, Tilbrook et al. 1998; Koblish, Hunter et al. 1998; Angulo, Rullas et al. 2000; Mazzoni, Bronte et al. 2002). De plus, des souris déficientes pour le gène de NOS2 sont dépourvues de propriétés immunosuppressives (Bingisser, Tilbrook et al. 1998; Koblish, Hunter et al. 1998; Goni, Alcaide et al. 2002; Mazzoni, Bronte et al. 2002). Le NO n'interagit pas avec les signaux provenant de l'activation du TCR mais bloque la cascade de signalisation générée suite à la liaison de l'IL-2 avec son récepteur. En effet, le NO empêche la phosphorylation et l'activation de molécules de signalisation telles que les Janus kinases (JAKs), STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5), Erk et Akt (Bingisser, Tilbrook et al. 1998; Mazzoni, Bronte et al. 2002) (**Figure 11A**). L'inhibition de la prolifération lymphocytaire T dépendante du NO est démontrée réversible pendant les 24 à 48h suivant la stimulation (Mazzoni, Bronte et al. 2002), suggérant que le NO empêche les lymphocytes T d'entrer dans le cycle cellulaire sans les tuer. Cependant, le maintien de taux élevé de NO au niveau du site tumoral conduit à l'apoptose des lymphocytes T infiltrant la tumeur (Saio, Radoja et al. 2001). De plus, le NO permet la conversion des cellules T

$CD4^+CD25^-$ en cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ (les NO-Tregs) avec des fonctions suppressives identiques aux cellules T régulatrices naturelles. Cette population est $GITR^+$, $CD27^+$, $T-bet^{low}$, $GATA3^{high}$ et $FOXP3^-$. Leur induction est indépendante du cGMP et dépendante de la voie faisant intervenir la p53, l'IL-2, OX40 et la survivine (Niedbala, Cai et al. 2007). En effet, l'IL-2 produit par les lymphocytes T permet d'induire l'expression de OX40, qui, lorsqu'il agit sur son récepteur, OX40L, débute la cascade de signalisation de la survivine pour inhiber l'apoptose. Les cellules T qui prolifèrent sont des cellules immunosuppressives NO-Tregs qui inhibent la réponse inflammatoire et limitent le développement des maladies autoimmunes résultant des infections. Cette population de cellules régulatrices est capable de supprimer la prolifération de cellules T $CD4^+CD25^-$ *in vitro* et d'atténuer le développement de maladies autoimmunes chez la souris *in vivo* (**Figure 10**).

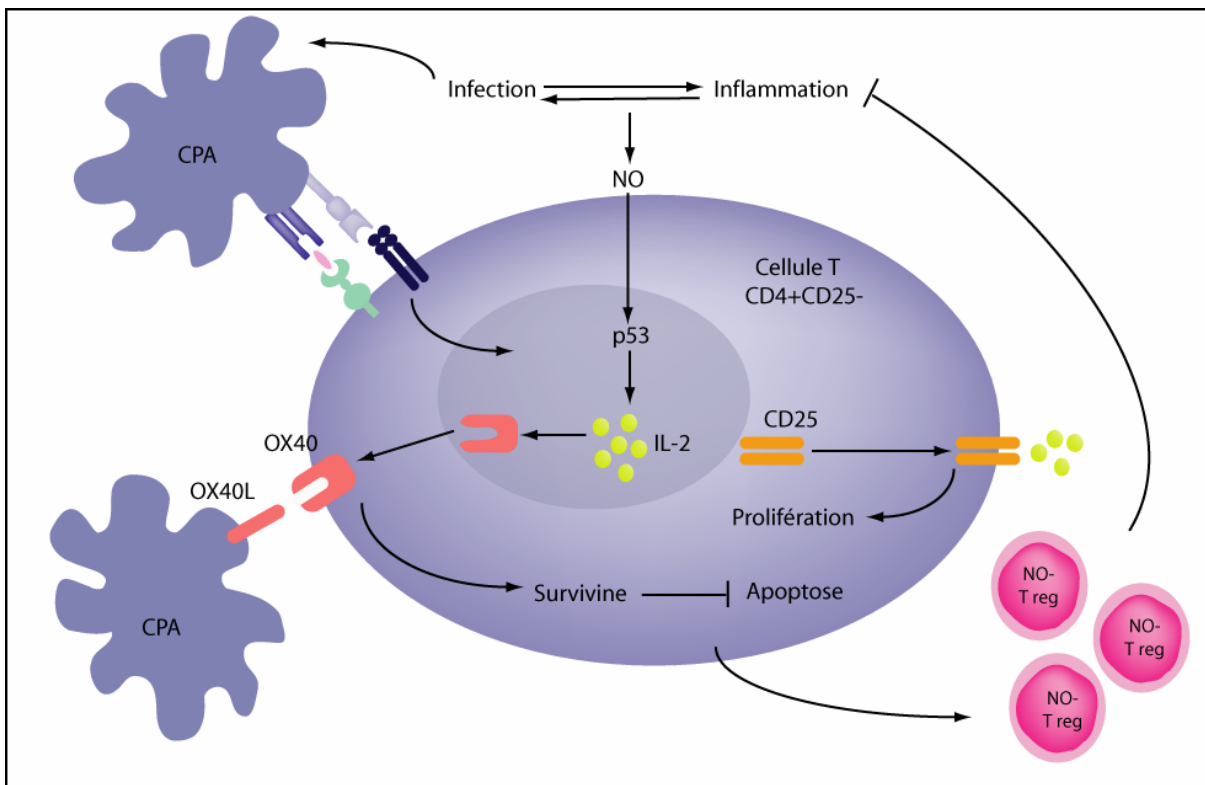


Figure 10 Représentation de l'induction et de la fonction de NO-Tregs. (D'après Niedbala et al 2007)

En synergie avec les signaux TCR, le NO stabilise la p53 qui permet la synthèse d'IL-2 par les cellules T $CD4^+CD25^-$. L'interaction de l'IL-2 sur son récepteur induit la prolifération des cellules. L'IL-2 permet l'augmentation de l'expression de OX40 qui lorsqu'il est engagé avec

OX40L favorise l'induction de la survivine empêchant l'apoptose. Les cellules immunosuppressives NO-Tregs qui en résultent suppriment la réponse inflammatoire.

iv- L'Arginase I

L'arginase participe au métabolisme de la L-arginine en déplaçant le milieu en un acide aminé non essentiel. La L-Arg diminue profondément suite à l'augmentation de la production de l'ArgI chez des patients atteints de cancers (Zea, Rodriguez et al. 2005; Ochoa, Zea et al. 2007) ou suite à une transplantation de foie (Roth, Steininger et al. 1994). Ainsi, dans les cellules myéloïdes, l'induction simultanée de l'ArgI et d'un transporteur d'acides aminés cationiques (CAT-2B) par des cytokines de type Th2 permet le transport de la L-Arg du milieu extracellulaire à l'intérieur de la cellule où il est dégradé (Louis, Mody et al. 1999) (**Figure 11B**). L'utilisation d'un clone de MDSC exprimant spécifiquement l'ArgI a permis de démontrer que la déplétion en L-Arg du microenvironnement est responsable de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (Rodriguez, Zea et al. 2003; Serafini, De Santo et al. 2004). En effet, l'absence de L-Arg conduit à la perte de l'expression du CD3 ζ sur les lymphocytes T qui deviennent alors incapables de proliférer et de produire des cytokines (Zea, Rodriguez et al. 2005) (Rodriguez, Zea et al. 2002; Rodriguez, Quiceno et al. 2004), suggérant que la déplétion de la L-Arg dans le microenvironnement bloque les signaux provenant du TCR et module les fonctions des lymphocytes T au début de leur activation. Une étude récente a permis de démontrer que la déplétion en L-Arg bloque l'expression des cyclines D3 et cdk4 via la phosphorylation des kinases GCN2 et eIF2 α inhibant la traduction et la stabilité d'ARNm cellulaire (Lee, Ryu et al. 2003) (Morris 2004) et jouant un rôle central dans la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire (Rodriguez, Quiceno et al. 2007).

v- Coopération entre ArgI et iNOS dans la suppression par les MDSCs

Les cytokines de type Th1 induisent NOS2 mais inhibent l'ArgI et l'inverse est vrai en ce qui concerne les cytokines de type Th2 (Munder, Eichmann et al. 1998; Mills, Kincaid et al. 2000). En effet, l'étude du rejet d'une xélogreffe de peau de rat chez la souris est caractérisé par la présence de cytokines de type Th2 favorisant l'activité de l'arginase et atténuant la génération de NO au sein du greffon (Holan, Pindjakova et al. 2006). Cependant, l'étude de

souris tumorales a permis de montrer que certaines lignées de MDSC nécessitent le fonctionnement des deux enzymes (ArgI et NOS2) dans le but de bloquer la réponse allogénique des lymphocytes T (Bronte, Serafini et al. 2003) (Gallina, Dolcetti et al. 2006) (Serafini, De Santo et al. 2004) (Wu and Morris 1998). Il a aussi été établi qu'en présence de faibles concentrations de L-Arg, le domaine réductase de NOS2 favorise la génération d'ion superoxide (O_2^-) (Xia and Zweier 1997; Xia, Roman et al. 1998). Ainsi, un modèle de coopération et de synergie dans l'activité de ces deux enzymes a été proposé (Bronte and Zanovello 2005)(**Figure 11C**). En effet, l'activation de l'Arg I est responsable de la diminution de la concentration de la L-arginine dans le microenvironnement permettant à NOS2 de produire O_2^- en plus de NO. Le NO réagit alors avec le O_2^- pour former des peroxinitrites ($ONOO^-$) et induire l'apoptose des lymphocytes T en inhibant la phosphorylation de tyrosines (Brito, Naviliat et al. 1999) ou en favorisant la sécrétion de facteurs de mort par les mitochondries (Aulak, Miyagi et al. 2001).

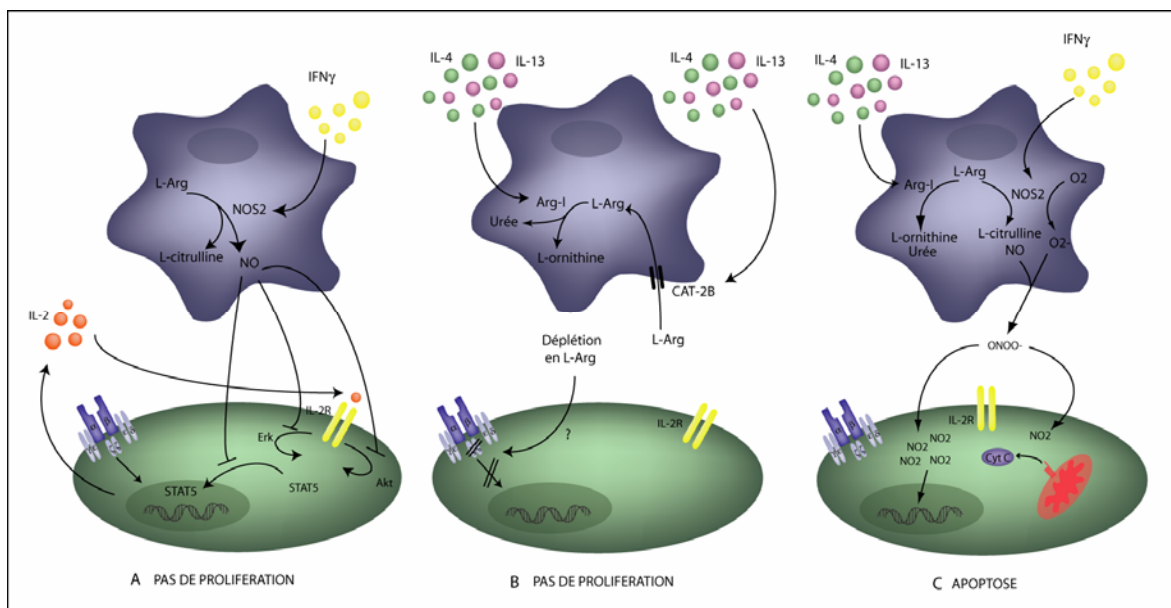


Figure 11 Métabolisme de la L-Arg dans les MDSC et régulation de l'activation lymphocytaire T (D'après Bronte et al 2003 Trends in Immunology)

A, l'IFN γ sécrété par les lymphocytes T induit l'expression de NOS2 et ainsi de NO. En interférant avec la voie de signalisation de l'IL-2, NO empêche la prolifération mais ne bloque pas les signaux précoces d'activation dépendant du TCR. B, Les cellules Th2 sécrètent l'IL-4 et l'IL-13 induisant l'expression de l'Arg1 et du transporteur CAT-2B par les MDSC. La déplétion de la L-Arg dans le microenvironnement conduit à la diminution d'expression de

la chaîne CD3 ζ conduisant à l'arrêt de la prolifération cellulaire. C, Lorsque les 2 enzymes sont activées, et en plus des voies décrites précédemment, le ONOO- est produit conduisant à l'apoptose des lymphocytes T.

III- Costimulation CD28/B7 et tolérance

III-1- Introduction sur le trinôme CD28/B7/CTLA-4

La protéine CD28 fait partie de la superfamille des immunoglobulines qui comporte 5 membres : CD28, CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4), BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator), PD-1 (Program Death 1) et ICOS (Inducible T cell Costimulator). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 avec un ou plusieurs domaines immunoglobulines extracellulaires et un court domaine intracytoplasmique permettant la transduction du signal.

III-1-1- Structure et expression

La molécule CD28 est exprimée constitutivement à la surface de tous les lymphocytes T CD4⁺ murins et humains et sur tous les T CD8⁺ murins du sang périphérique alors qu'il est exprimé par seulement 50% des T CD8⁺ humains (Gross, Callas et al. 1992). Le CD28 est aussi exprimé par d'autres types cellulaires comme les cellules NK, les neutrophiles (Venuprasad, Parab et al. 2001) ou les éosinophiles (Woerly, Roger et al. 1999). Le CTLA-4 (CD152) est une molécule inductible localisée dans les granules intracytoplasmiques des lymphocytes T dont l'expression en surface sur les T naïfs est très faible (Iida, Ohno et al. 2000; Chambers, Kuhns et al. 2001). Son expression en surface dépend de l'activation lymphocytaire T suite à l'engagement du TCR (Linsley, Bradshaw et al. 1996). Le CTLA-4 est également fortement exprimé sur les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Takahashi, Tagami et al. 2000) et il peut être détecté sur les lymphocytes B, les cellules souches CD34⁺ et les granulocytes (Pistillo, Tazzari et al. 2003).

Les molécules CD28 et CTLA-4 présentent un motif extracellulaire MYPPPY essentiel pour la liaison avec leurs ligands, les molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86). La molécule CD28 se lie à une paire de molécule B7 sous forme d'un homodimère de façon monovalente (Linsley, Clark et al. 1990). En revanche, la molécule CTLA-4 se lie aux molécules B7 de façon divalente permettant la formation d'une structure en fermeture éclair (Schwartz, Zhang et al. 2001). Ceci permet alors une interaction de forte avidité et une faible constante de

dissociation de l'interaction CTLA-4/B7 contrairement à la liaison des molécules B7 avec le CD28 (van der Merwe, Bodian et al. 1997; Ikemizu, Gilbert et al. 2000; Stamper, Zhang et al. 2001).

Les molécules B7 sont, quant à elles, exprimées par la plupart des cellules capables de présenter un antigène comme les cellules dendritiques (Vandenberghe, Delabie et al. 1993), les macrophages (Vandenberghe, Delabie et al. 1993), les lymphocytes B (Freedman, Freeman et al. 1987), les cellules de Langerhans, les cellules épithéliales ou les cellules interdigitées spléniques et ganglionnaires (Vandenberghe, Delabie et al. 1993). La molécule B7-2, faiblement exprimée de façon constitutive sur les CPA, se fixe préférentiellement aux molécules CD28 (Hathcock, Laszlo et al. 1994) afin d'initier la réponse immune. Suite à l'activation de la CPA, son expression est rapidement augmentée (Inaba, Witmer-Pack et al. 1994). B7-1 est une molécule inductible et son expression est détectable plus tardivement après l'activation cellulaire (Freeman, Gribben et al. 1993) (Hathcock, Laszlo et al. 1994). Toutefois, B7-1 est aussi capable de se lier à CD28. L'interaction de CD28 avec les molécules B7 se caractérise par une faible affinité et une constante de dissociation élevée, suggérant qu'elle permet aux molécules B7 d'être rapidement libérées pour interagir avec leur deuxième ligand, la molécule CTLA-4 (voir plus en détail dans la partie « molécules B7 »).

III-1-2- Synapse immunologique et seuil d'activation du TCR

Malgré les similitudes structurales entre les molécules CD28 et CTLA-4, leur distribution au niveau des lymphocytes T semble complètement différente. Avant la stimulation, le CD28 est distribué uniformément autour de la membrane plasmique. Cependant, la rencontre d'un lymphocyte T avec une CPA permet un contact stable entre les deux types cellulaires et aboutit à la formation d'un cluster central enrichi en PTK et PKC- θ , la synapse immunologique, où se concentre le CD28 en moins d'une minute (Egen and Allison 2002). L'engagement du CD28 amplifie le flux entrant de calcium provoqué suite à la liaison du TCR avec le complexe CMH-peptide et semble impliqué dans la redistribution des molécules de surface au niveau de la synapse immunologique (Freedman, Liu et al. 1999) (Wetzel, McKeithan et al. 2002). Ainsi, le blocage de l'interaction CD28/B7 à l'aide d'un anticorps antagoniste réduit la formation du cluster TCR/CMH-peptide (Wetzel, McKeithan et al. 2002) et empêche l'accumulation de PKC- θ (Huang, Lo et al. 2002). En absence d'un signal TCR, l'engagement du CD28 par les co-récepteurs B7 induit le recrutement de radeaux lipidiques

enrichis en glycosphingolipides et en cholestérol mais n'induit pas de prolifération cellulaire ou de production de cytokines (Kovacs, Parry et al. 2005) sauf en présence d'un anticorps anti-CD28 superagoniste (voir partie blocage du CD28). Ces radeaux lipidiques sont riches en molécules de liaison telles que LAT (Linker for Activation of T cell) et en protéines kinases telles que p56^{lck} et p59^{fyn} essentielles à la transduction du signal via le TCR (Martin, Schneider et al. 2001). Bien que la liaison du CD28 avec son ligand ne soit pas absolument nécessaire pour permettre son accumulation au niveau de la synapse, l'interaction CD28/B7-2 joue un rôle important dans la régulation de sa localisation ainsi que sa stabilisation suite à l'activation lymphocytaire T (Pentcheva-Hoang, Egen et al. 2004). Une étude a permis de montrer que la partie cytoplasmique de la molécule B7-1 contrôle la localisation de ces récepteurs et de la PKC- θ au niveau de la synapse immunologique (Tseng, Liu et al. 2005). De plus, le recrutement du CD28 au niveau de la synapse immunologique est indépendant du TCR (Acuto, Mise-Omata et al. 2003) et permet de diminuer le seuil d'activation du TCR ainsi que le nombre d'interactions TCR/CMH-peptide nécessaires à cette activation rendant les lymphocytes T plus sensibles à la stimulation antigénique (Viola and Lanzavecchia 1996). A l'inverse, le CTLA-4, localisé au sein des vésicules intracellulaires chez un lymphocyte T au repos, est redistribué au sein de la synapse immunologique suite à l'engagement du TCR avec un complexe CMH-peptide (Egen and Allison 2002). De façon intéressante, la quantité de CTLA-4 transloquée au niveau de la synapse est corrélée avec la puissance du signal TCR, suggérant que le CTLA-4 agit préférentiellement pour réguler des réponses cellulaires T générés suite à un fort signal antigénique (Egen and Allison 2002) (Egen, Kuhns et al. 2002). Parce que B7-1 est un dimère et que B7-2 est un monomère, CTLA-4 se fixe majoritairement à B7-1 (Chua, Alt et al. 2002; Papavasiliou and Schatz 2002; Celeste, Fernandez-Capetillo et al. 2003). L'utilisation de CPA déficientes pour les molécules B7 a permis de confirmer que B7-1 et B7-2 recrutent préférentiellement CTLA-4 et CD28 respectivement au sein de la synapse immunologique et permettant de déclencher l'inhibition ou l'activation de fonctions cellulaires T (Pentcheva-Hoang, Egen et al. 2004).

III-2- Conséquences de l'engagement de CD28 sur le lymphocyte T

La voie de costimulation CD28/B7/CTLA-4 a été la première décrite et est la mieux caractérisée aujourd'hui. Seul, l'engagement de la molécule CD28 avec ses ligands B7

conduit à l'anergie des lymphocytes T (Schwartz 1990). Cependant, en synergie avec le signal antigénique, il permet de dépasser le seuil nécessaire à l'initiation de la réponse immune (Lanzavecchia, Lezzi et al. 1999), diminue le nombre de TCR engagé et permet ainsi l'activation optimale du lymphocyte T, sa prolifération, la production de cytokines et sa différenciation (Viola and Lanzavecchia 1996). Lorsque la cellule s'active, le CD28 est internalisé empêchant un engagement trop important de la molécule avec ses ligands et une activation trop forte de la cellule. Les effets dus au CD28 sont nombreux et l'étude *in vivo* de souris déficientes pour le CD28 (ou pour les molécules B7) a permis de montrer un défaut dans la réponse cellulaire B dépendante de la réponse lymphocytaire T et un défaut d'expression de récepteurs de costimulation nécessaires à la progression et à la maturation de la réponse immune (Sharpe and Freeman 2002). De même, le blocage de l'interaction de CD28 avec son ligand B7 (par des anticorps spécifiques de la molécule CD28 ou des molécules B7), empêche l'induction de la réponse cellulaire T dans des modèles de maladies auto-immunes alors qu'il permet de prolonger l'acceptation d'allogreffes en transplantation (Salomon and Bluestone 2001) (Greenfield, Nguyen et al. 1998) (voir partie blocage du CD28). Cette inhibition affecte aussi bien la prolifération, la commutation de classe des Ig, la différenciation Th2 ou la réponse cytotoxique des T CD8⁺ dépendante des T CD4⁺ (Acuto, Mise-Omata et al. 2003).

III-2-1- CD28 et cascade de signalisation

CD28 peut directement lier la molécule PI3K par l'intermédiaire du motif YMNM de son domaine cytoplasmique (Prasad, Cai et al. 1994; Stein, Fraser et al. 1994). Les ligands de CD28, les molécules B7, peuvent aussi stimuler l'association de CD28 avec la PI3K (Ward, Westwick et al. 1993; Ueda, Levine et al. 1995). L'activation de la PI3K permet le recrutement et l'activation de Vav-1 qui, une fois phosphorylé induit l'activation de ITK/Tec. L'activation du CD28 entraîne également une modification de la conformation de la PLC γ qui augmente la concentration d'inositol triphosphate à l'origine du relargage du calcium des vésicules intracellulaires vers le cytoplasme. Cette augmentation du calcium intracellulaire permet l'ouverture des canaux calciques et l'entrée massive de calcium dans la cellule provoquant la translocation de facteurs de transcription tels que NF-AT (Nuclear Factor for Activated T cells), NF- κ B ou AP-1 (Activator Protein-1) (Diehn, Alizadeh et al. 2002) ((Acuto, Mise-Omata et al. 2003) pour revue) (**Figure 12**).

III-2-2- CD28 et réponses lymphocytaires

La translocation calcium-dépendante des facteurs de transcription (Rincon and Flavell 1994) NF-AT, NF- κ B et AP-1 contrôlent ainsi la transcription de l'IFN γ , l'IL-4 et surtout de l'IL-2 (Thompson, Lindsten et al. 1989; Kane, Lin et al. 2002) qui agit de façon autocrine et fournit un signal de prolifération aux lymphocytes T. Une étude a permis de démontrer que l'engagement du CD28 induit l'expression de cyclines D3 responsables de l'entrée dans le cycle cellulaire des lymphocytes T alors que l'IL-2, produit après la costimulation est impliqué dans le maintien de la prolifération (Boonen, van Dijk et al. 1999). D'autres gènes peuvent être activés par ces facteurs incluant les gènes régulant le métabolisme du glucose (Diehn, Alizadeh et al. 2002) ou bien ceux codant pour le facteur anti-apoptotique Bcl-xL permettant le maintien de la survie des lymphocytes activés (Boise, Minn et al. 1995). *In vitro*, l'absence de costimulation par CD28 conduit à la réduction de l'activation de ces facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes précoces ou tardifs et une diminution de la prolifération des cellules T qui sont alors moins protégés de la mort cellulaire.

La voie de costimulation CD28/B7 régule également la balance Th1/Th2. En effet, en son absence, les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 ne sont pas produites suggérant que la différenciation de cellules T CD4⁺ naïves en cellules de type Th2 est strictement dépendante de la voie de costimulation CD28/B7 (Rulifson, Sperling et al. 1997; Schweitzer and Sharpe 1998). De plus, l'engagement de CD28 est impliqué dans la migration cellulaire et l'inflammation. Ainsi, CD28/B7 permet la production de chemokines tels que MIP-1 α et MIP-1 β (Herold, Lu et al. 1997) ou de récepteurs de chemokines comme CXCR4 (Carroll, Riley et al. 1997). Enfin, l'étude de souris NOD (Non Obese Diabetic) a permis de montrer que la voie de costimulation CD28/B7 était essentielle pour le développement et l'homéostasie de cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices (Salomon, Lenschow et al. 2000; Tang, Henriksen et al. 2003). Bien qu'étant deux fonctions indépendantes l'une de l'autre, la génération de cellules T régulatrices et la production d'IL-2 *in vivo* nécessitent un motif de signalisation identique dans le domaine intracellulaire du CD28, la proline en C-terminal qui lie la tyrosine kinase Lck. *In vitro*, l'engagement de CD28 par des thymocytes double positifs permet d'induire spécifiquement l'expression de Foxp3 et d'augmenter l'expression de GITR et de CTLA-4 lors de leur différenciation en cellules T CD4⁺CD8⁻ dans le thymus (Tai, Cowan et al. 2005).

III-2-3- CD28 et survie cellulaire

L'engagement du TCR peut conduire à la survie ou à la mort cellulaire en fonction de la présence ou non du signal de costimulation. Ainsi, l'activation d'un lymphocyte T suite à l'engagement du TCR et en synergie avec le signal de costimulation CD28/B7, permet l'expression d'IL-2 et de Bcl-x_L nécessaires à la survie lymphocytaire. L'étude de souris déficientes pour la molécule CD28 a permis d'analyser le rôle de cette molécule dans la régulation de la survie des lymphocytes T. En effet, la stimulation anti-CD3/anti-CD28 permet d'augmenter la survie de lymphocytes T provenant de souris normales mais pas celle de lymphocytes T provenant de souris déficientes pour la molécule CD28. De la même façon que pour des lymphocytes T n'exprimant pas la molécule CD28, l'utilisation de la molécule recombinante CTLA-4 Ig, dont le rôle est de se fixer sur les molécules B7 et d'empêcher l'ensemble des interactions avec leur récepteur, réduit la viabilité des lymphocytes T (Noel, Boise et al. 1996). L'ajout d'un inhibiteur des ICE protéases (IL-1 β Converting Enzyme) bloque l'entrée en apoptose de cellules T dont le TCR est engagé sans signal de costimulation. Ainsi, l'engagement du CD28 induit les signaux essentiels pour la survie de lymphocytes T naïfs stimulés pour la première fois. Cependant, une seconde stimulation des lymphocytes T peut les conduire à leur mort par apoptose, nécessaire pour éviter une activation trop importante du système immunitaire. Ce processus est appelé AICD (Activation Induced Cell Death) et est régulé par deux types d'interactions, Fas/FasL et TNF α -TNFR2. L'interaction TNF α -TNFR2 provoque une diminution de l'expression d'ARNm codant pour la molécule Bcl-x_L. En revanche, les signaux provenant de l'interaction CD28/B7 protègent les cellules de l'apoptose générée par l'intermédiaire de la voie TNF α -TNFR2 suite à l'augmentation de l'expression de Bcl-x_L (Lin, Hwang et al. 1997). De même, l'expression de Bcl-x_L générée suite aux signaux via CD28 protège le lymphocyte T d'une apoptose Fas/FasL dépendante (Noel, Boise et al. 1996). En effet, des lymphocytes T CD4⁺ provenant de souris CD28 KO semblent plus sensibles à l'apoptose via Fas/FasL (Kishimoto and Sprent 1999) par l'intermédiaire d'une voie dépendante de la PI3K (Jones, Elford et al. 2002). Enfin, l'expression de Bcl-x_L est indépendante de la production d'IL-2, suggérant que la costimulation via CD28 régule la survie lymphocytaire T par de multiples mécanismes (Boise, Minn et al. 1995) (Boise, Minn et al. 1995).

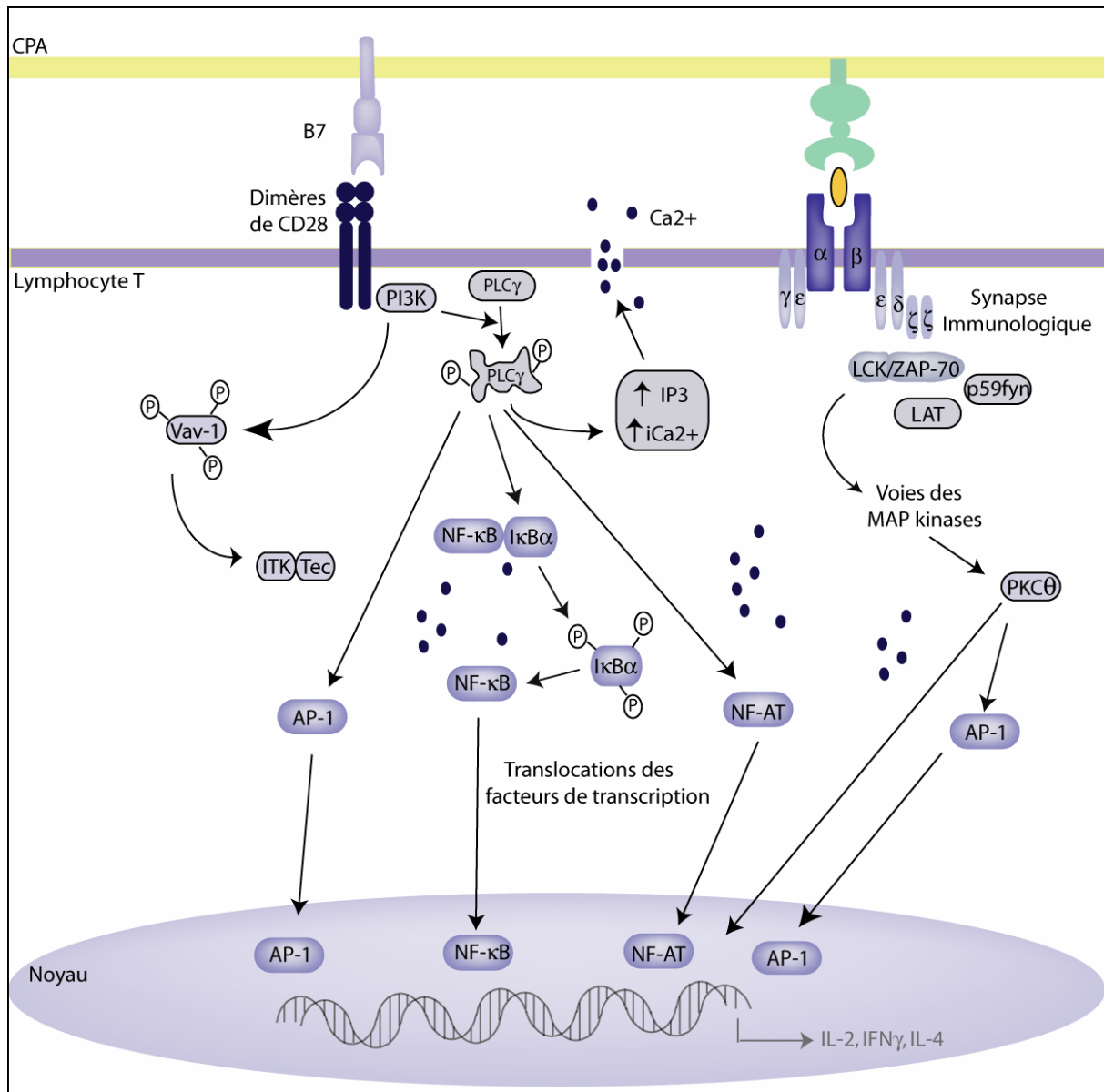


Figure 12 Cascade de signalisation via CD28 induit l'activation lymphocytaire.

(D'après Wang et al 2004 JBC)

L'activation optimale d'un lymphocyte T nécessite la reconnaissance d'un complexe TCR/CMH-peptide et l'activation du CD28 suite à sa fixation avec la molécule B7. La formation des radeaux lipidiques favorise le recrutement, au niveau de la synapse immunologique, de nombreuses molécules nécessaires à la transduction du signal. Suite à l'interaction CD28/B7, l'activation de la PI3K permet le recrutement et l'activation de la molécule Vav-1, qui active le complexe ITK/Tec. Le changement conformationnel de la molécule PLCγ permet d'augmenter la concentration d'inositol triphosphate à l'origine du relargage du Ca²⁺ des vésicules intracellulaires dans le cytoplasme favorisant l'ouverture des

canaux calciques et l'entrée massive de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. D'autre part, $PLC\gamma$ permet la phosphorylation de la molécule $I\kappa B\alpha$ formant un complexe avec la molécule $NF\kappa B$, ce qui favorise sa dégradation par le protéasome et la translocation, dans le noyau, du facteur de transcription $NF-\kappa B$. La translocation des facteurs $NF\kappa B$ et $NF-AT$ est effectuée selon un mécanisme $PLC\gamma$ calcium dépendant. La $PKC\theta$ permet la translocation des facteurs de transcription $AP-1$ et $NF-AT$ selon un mécanisme indépendant du calcium.

III-2-4- CD28 et cellules T régulatrices

Dans une étude menée sur des souris NOD, le blocage de la voie de costimulation médiée par le CD28 a conduit au développement du diabète associé à une diminution du nombre de cellules T régulatrices périphériques (Salomon, Lenschow et al. 2000). De même, une série d'expériences réalisées *in vitro* et *in vivo*, suggèrent que la stimulation par un anticorps anti-CD28 superagoniste augmente la fréquence de cellules T régulatrices exprimant CTLA-4 et FOXP3, produisant de l'IL-10 mais pas d'IL-2 et supprimant efficacement la réponse proliférative des cellules effectrices (Lin and Hunig 2003). Ces résultats suggèrent que le CD28 contrôle le développement thymique des cellules T régulatrices ainsi que leur homéostasie en périphérie (Boden, Tang et al. 2003). De plus, une mutation au niveau de la proline qui lie lck dans la portion C-terminale de la région intracytoplasmique de la molécule CD28 a permis d'identifier la partie de la molécule nécessaire au développement des cellules T régulatrices (Tai, Cowan et al. 2005). En fait, la costimulation par CD28 semble augmenter la prolifération et l'activité suppressive des cellules régulatrices de manière directe, en amplifiant les signaux générés par le TCR et indirectement, en régulant leur survie suite à la sécrétion d'IL-2 par les cellules T conventionnelles et par l'augmentation de l'expression du CD25 sur les cellules régulatrices (Tang, Henriksen et al. 2003). En effet, l'induction de la prolifération des cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ humaines nécessite un fort signal de costimulation via CD28 en plus de l'engagement du TCR. Néanmoins, contrairement à l'induction de la prolifération des cellules T effectrices $CD4^+CD25^-$, le signal provenant de la costimulation via CD28 ne peut pas être substituée par l'ajout d'IL-2, utile pour empêcher l'apoptose spontanée des cellules T régulatrices (Hombach, Kofler et al. 2007).

Malgré un rôle bien décrit du CD28 dans le développement et l'homéostasie des cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$, le rôle du CD28 dans le développement de leur activité suppressive

est controversé. En effet, contrairement aux études menées par l'équipe de Tang ou de Lin, l'étude de l'équipe de Thornton n'a pas permis d'identifier l'implication directe du CD28 dans le fonctionnement des cellules T régulatrices et suggèrent que seuls les signaux transmis par le TCR et l'IL-2 sont suffisants pour entraîner leur activation et leur survie (Thornton and Shevach 1998; Fontenot, Rasmussen et al. 2005; Setoguchi, Hori et al. 2005; Lyddane, Gajewska et al. 2006). En effet, l'induction de l'expression de FOXP3 sur les cellules T régulatrices ne semble pas dépendante de CD28 (Fontenot, Dooley et al. 2005). Cependant, une étude récente a étudié le rôle du CD28 dans l'activité suppressive d'une autre population de cellules T régulatrices, les $CD8^+CD122^+$. Cette population sécrète de l'IL-10 et est capable de supprimer l'IFN γ produit par les cellules cibles T $CD4^+$ et T $CD8^+$ après une stimulation via le TCR et une interaction CD28/B7, suggérant que leur activité suppressive dépend de l'interaction CD28/B7. L'étude de souris déficientes pour le CD28 confirme les résultats précédents en montrant que les cellules régulatrices $CD8^+CD122^+$ isolées à partir de ces animaux ne présentent aucune activité suppressive (Shi, Rifa'i et al. 2008). De même, les cellules régulatrices $CD8^+CD28^-$, par définition, n'utilisent pas le récepteur CD28 pour exercer leur action suppressive. Néanmoins, en absence de CD28, la tolérance périphérique normalement induite par des cellules T régulatrices $CD8^+$ *in vivo* ne peut pas être obtenue (Vacchio and Hodes 2003).

Ces éléments permettent de penser que l'administration d'anticorps antagonistes anti-CD28 chez des patients nouvellement greffés pourrait empêcher le développement de cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ à long terme (Hunig 2007). Cependant, dans cette situation, des cellules T régulatrices de type $CD8^+CD28^-$ peuvent être induites (Cortesini and Suci-Foca 2004) (Liu, Tugulea et al. 1998).

Dans le but d'étudier l'importance des signaux de costimulation dans l'induction de la tolérance suite à une transplantation, la réponse allogénique a été étudiée chez des souris déficientes pour le CD28. Les lymphocytes T de souris KO pour le CD28 diminuent leur réponse proliférative ainsi que leur production de cytokines en réponse à une stimulation par des cellules allogéniques *in vitro*. Malgré cela, ils conservent leur activité cytotoxique et sont ainsi capables de rejeter efficacement une greffe de peau allogénique *in vivo* (Kawai, Shahinian et al. 1996). En supposant que le CD28 joue un rôle majeur dans le développement thymique des cellules régulatrices, l'absence de cellules régulatrices chez les souris $CD28^{-/-}$ peut être une cause du rejet de greffe.

En conclusion, la molécule CD28 ne semble pas essentielle pour l'induction de la tolérance en transplantation car d'autres voies de costimulation jouent également un rôle. L'approche que nous avons utilisée, qui consiste à bloquer l'interaction CD28/B7, en laissant libre l'interaction régulatrice CTLA-4/B7 (Haspot, Seveno et al. 2005) peut donc théoriquement bloquer la costimulation des cellules effectrices tout en permettant le développement de cellules régulatrices. Cependant, ce blocage pourrait empêcher le maintien de l'homéostasie des cellules régulatrices en périphérie.

III-3- Conséquences de l'engagement de CTLA-4 sur le lymphocyte T

Le CTLA-4 est un inhibiteur du signal transduit par le TCR et la molécule CD28. Son rôle est important pour empêcher l'autoimmunité (Perrin, Maldonado et al. 1996) (Karandikar, Vanderlugt et al. 1998) et contrôler la réponse cellulaire T. La génération d'un important désordre lymphoprolifératif accompagné d'un infiltrat de lymphocytes T et de la destruction de nombreux tissus dans des souris déficientes pour la molécule CTLA-4 permet de mettre en évidence le rôle de cette molécule dans la diminution de l'activation cellulaire et le maintien de l'homéostasie immunologique (Tivol, Borriello et al. 1995) (Waterhouse, Penninger et al. 1995) (Chambers, Sullivan et al. 1997). En absence de CTLA-4, l'absence conjointe de CD28 permet de restaurer une homéostasie normale (Mandelbrot, Oosterwegel et al. 2001). De plus, les souris double KO pour les molécules CD28 et CTLA-4 ne présentent plus de désordres lymphoprolifératifs et ont une espérance de vie normale (Mandelbrot, McAdam et al. 1999).

III-3-1- CTLA-4 et cascade de signalisation

La molécule CTLA-4 localisée au niveau des vésicules intracellulaires nécessite la réorganisation du cytosquelette pour pouvoir être exportée à la membrane près du site d'engagement du TCR (Linsley, Bradshaw et al. 1996). Pour cela, la molécule CTLA-4 possède un court domaine intracytoplasmique contenant deux motifs tyrosine YVKM et YFIP conservés à 100% entre les différentes espèces (Thompson and Allison 1997). Le motif YVKM joue un rôle majeur dans le contrôle de la localisation de CTLA-4 ainsi que dans son interaction avec les molécules clés impliquées dans la cascade de signalisation (Leung,

Bradshaw et al. 1995; Bradshaw, Lu et al. 1997). Ainsi, lorsqu'il est non phosphorylé, le motif YVKM peut s'associer avec la molécule AP-2, une molécule adaptatrice associée à la clathrine, pour conduire à l'internalisation de la molécule CTLA-4 dans les puits de clathrine (Shiratori, Miyatake et al. 1997). En revanche, la phosphorylation de la molécule CTLA-4 empêche l'interaction avec la molécule AP-2 et permet l'augmentation de son expression à la surface de la cellule (Chuang, Lee et al. 1999). De plus, la proximité de la molécule CTLA-4 avec le TCR conduit alors à la phosphorylation d'une tyrosine de la partie intracytoplasmique du CTLA-4 par une protéine associée au CD3, la molécule ZAP-70 permettant l'activation et le maintien de la molécule en surface. La translocation membranaire de la molécule CTLA-4 dépend aussi de la force du signal généré par le TCR (Egen and Allison 2002). De plus, le CTLA-4 localisé au niveau de la synapse immunologique possède une affinité plus élevée pour les molécules B7 que le CD28 (van der Merwe, Bodian et al. 1997) et rentre en compétition avec la molécule CD28 interrompant le signal transmis par celui-ci (Alegre, Noel et al. 1996) (Egen and Allison 2002). La tyrosine phosphorylée de CTLA-4 peut d'une part interagir avec la sous-unité p85 de la PI3K (Schneider, Prasad et al. 1995; Zhang and Allison 1997; Chuang, Lee et al. 1999) et forme un complexe avec la tyrosine phosphatase SHP-2 (Marengere, Waterhouse et al. 1996; Zhang and Allison 1997; Cilio, Daws et al. 1998; Lee, Chuang et al. 1998; Chuang, Lee et al. 1999) permettant l'activation de la voie de signalisation par CTLA-4. Des études ont également suggéré que l'interaction CTLA-4/SHP-2 suite à l'engagement du CTLA-4 inhibent la liaison de la tyrosine kinase Lck avec ZAP-70, empêchant la phosphorylation de la chaîne ζ du CD3 nécessaire pour la transduction du signal par le TCR (Marengere, Waterhouse et al. 1996; Lee, Chuang et al. 1998). De plus, le CTLA-4 inhibe le recrutement des radeaux lipidiques permettant le rapprochement des protéines kinases essentielles à la transduction du signal par le TCR (Martin, Schneider et al. 2001)(**Figure 13**).

III-3-2- CTLA-4 et inhibition des réponses lymphocytaires

Deux mécanismes expliquent l'inhibition de l'activation cellulaire par le CTLA-4 : 1) un mécanisme passif de compétition entre les molécules CTLA-4 (ayant une forte affinité pour B7) et CD28, pour leurs interactions avec les molécules B7 (Carreno, Bennett et al. 2000).

Le CTLA-4 bloque ainsi le signal généré par le TCR mais également celui généré par le CD28. En effet, il réduit la phosphorylation de I κ B- α et diminue l'activation des facteurs de

transcription NF- κ B et AP-1 (Olsson, Riesbeck et al. 1999). Ainsi l'activation de la voie de signalisation via CTLA-4 conduit à la diminution de la synthèse d'IL-2. Dans des conditions de costimulation indépendantes de la molécule B7, l'inhibition de la production d'IL-2 suite à l'engagement de CTLA-4 nécessite la région intracytoplasmique de la molécule tandis que dans des conditions dépendantes de B7 cette production est directement proportionnelle à l'expression en surface de la molécule CTLA-4 (Carreno, Bennett et al. 2000). 2) L'interaction CTLA-4/B7 conduit à l'arrêt, entre les phases G0 et G1, du cycle cellulaire de lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Krummel and Allison 1996; Blair, Riley et al. 1998) et de T CD8⁺ (Walunas, Bakker et al. 1996). Cette arrêt est généré suite à l'inhibition de la production de cyclines tels que les cyclines D3 et cdk4, partiellement dépendante de l'IL-2 et de la cycline cdk6, indépendante de l'IL-2 (Brunner, Chambers et al. 1999). L'engagement de CTLA-4 protège également la protéine p27, protéine inhibitrice du cycle cellulaire, de sa dégradation (Brunner, Chambers et al. 1999). L'arrêt du cycle cellulaire peut également conduire à l'apoptose de cellules activées par un mécanisme indépendant de la voie Fas/FasL (Scheipers and Reiser 1998). L'étude de cellules T déficientes pour le CTLA-4 a permis de révéler un rôle important de CTLA-4 dans la régulation de la différenciation des cellules T helper. En effet, en absence de CTLA-4, les cellules T CD4⁺ naïves se différencient en cellules de type Th2 sécrétant de grandes quantités d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 mais pas en cellules de type Th1 (Ubaldi, Gatta et al. 2003). Le CTLA-4, constitutivement exprimé par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺, est essentiel au développement de leur activité fonctionnelle inhibitrice suite à l'activation par le TCR (Takahashi, Tagami et al. 2000; Read, Greenwald et al. 2006).

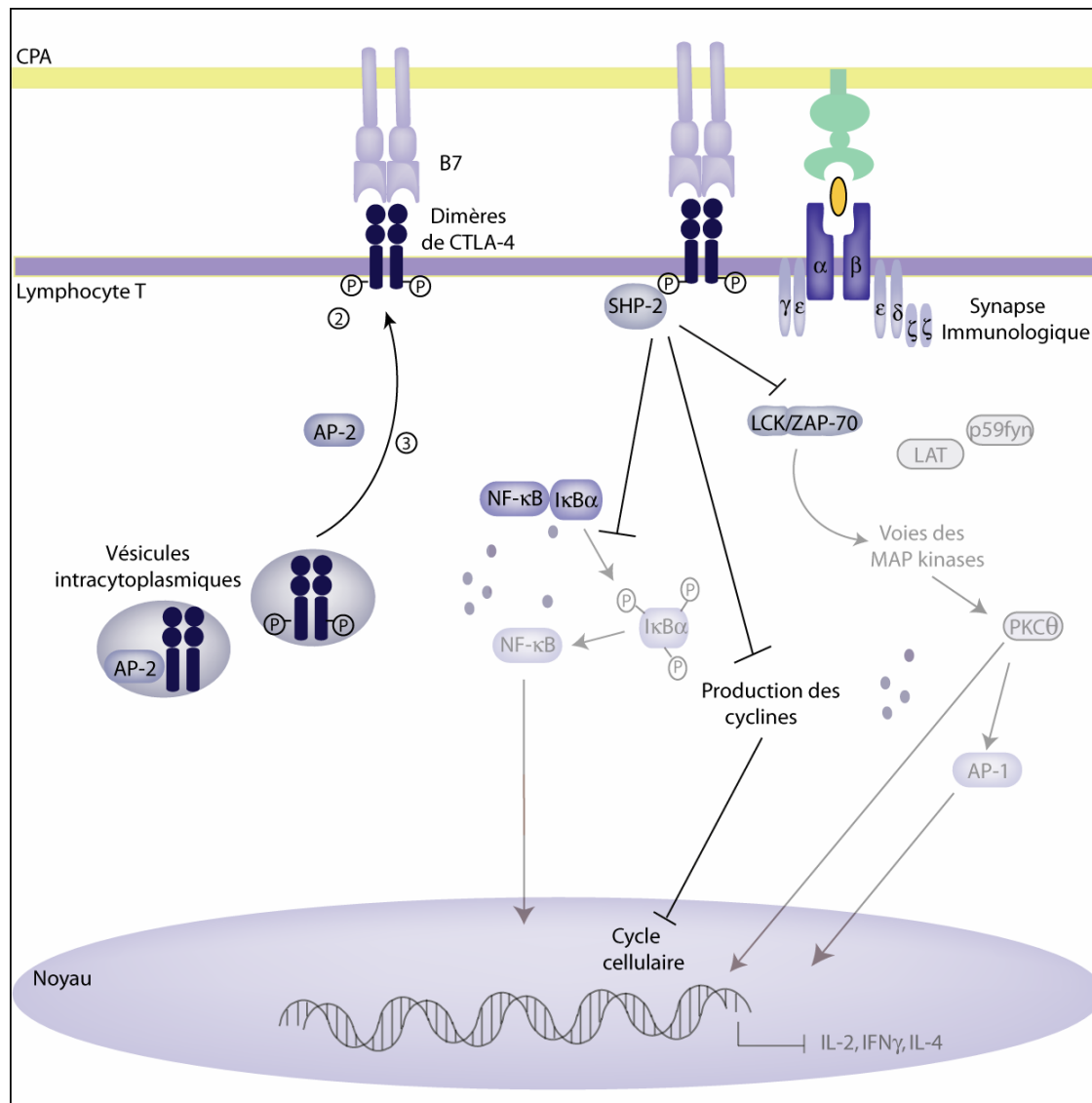


Figure 13 La cascade de signalisation via CTLA-4 induit l'inhibition de l'activation lymphocytaire.

Non phosphorylée, la molécule CTLA-4 s'associe à la molécule AP-2 qui emprisonne les molécules CTLA-4 dans les puits de clathrine (1). La phosphorylation de CTLA-4 empêche alors AP-2 de s'y fixer (2) et permet son externalisation à la surface de la membrane (3). L'engagement de CTLA-4 avec la molécule B7 induit alors le recrutement de phosphatases tels que SHP2, déphosphorylant la protéine kinase $p56^{lck}$ qui devient incapable de se lier à ZAP70 et d'engendrer la cascade de signalisation. SHP2 empêche la phosphorylation d'IκBα et donc sa dégradation capturant NFκB dans le cytoplasme et empêchant sa translocation dans le noyau. De même, l'absence d'activation de la PLCγ et de la PKCθ empêche la translocation d'AP-1 et de NF-AT. Il n'y a donc plus de synthèse d'IL-2, d'IFNγ ou d'IL-4 et le lymphocyte T se retrouve bloqué entre les phases G0 et G1 du cycle cellulaire.

III-4- Les molécules B7

Les molécules B7 ne sont pas seulement considérées comme étant des ligands des molécules CD28 et CTLA-4 pour agir sur les lymphocytes T. Elles sont aussi capables de transduire des signaux aux CPA qui les expriment. Ainsi, le CTLA-4 Ig, protéine de fusion entre la partie extracellulaire de la molécule CTLA-4 et la fraction Fc d'une immunoglobuline (Linsley, Brady et al. 1991), est capable de se fixer aux molécules B7 bloquant ainsi l'interaction CD28/B7 (Linsley, Wallace et al. 1992). De plus, l'interaction de la molécule de fusion CTLA-4 Ig avec les molécules B7 exprimées par les cellules dendritiques induit la synthèse d'une enzyme, IDO (indoléamine dioxygénase) (Grohmann, Orabona et al. 2002) (**Figure 14**). Une étude récente a montré que l'incubation de PBMC avec la molécule CTLA-4 Ig induit l'expression d'IDO par les CPA mais aussi par les cellules T CD4⁺ (Boasso, Herbeuval et al. 2005). IDO permet la dégradation et la déplétion du tryptophane dans le microenvironnement et est à l'origine d'effets régulateurs sur les réponses lymphocytaires T (Grohmann, Orabona et al. 2002). En effet, l'expression d'IDO par les cellules exprimant les molécules B7 bloque la progression du cycle cellulaire par les cellules T, induit l'apoptose lymphocytaire et peut être associée à des désordres autoimmuns chez l'homme (Mellor and Munn 1999; Mellor, Keskin et al. 2002). Une autre étude a montré que pendant la grossesse, l'enzyme placentaire IDO joue un rôle dans la suppression de réponses cellulaires T maternelles contre le fœtus (Munn, Zhou et al. 1998). L'inhibition d'IDO dans un modèle murin conduit à l'activation du système immunitaire et à la perte du fœtus (Mellor and Munn 2000). Dans la plupart des cas, le CTLA-4 Ig seul n'induit pas la tolérance en transplantation mais il y a maintenant plus de 10 ans, le groupe de Lenschow a pu montrer l'induction de la tolérance et la survie à long terme en transplantation suite au traitement par le CTLA-4 Ig (Lenschow, Walunas et al. 1996). De même, IDO peut intervenir dans la tolérance à certaines tumeurs (Friberg, Jennings et al. 2002) ou comme facteur protecteur vis-à-vis de désordres immunitaires (Sakurai, Zou et al. 2002). D'autres études ont permis d'identifier une sous population de DC exprimant IDO et capables de supprimer des réponses lymphocytaires T suggérant l'implication d'IDO dans l'induction de la tolérance centrale et périphérique contre des autoantigènes (Hwu, Du et al. 2000; Munn, Sharma et al. 2002)(Mellor and Munn 2004) pour revue). De plus, une étude a montré que les métabolites issus du catabolisme du tryptophane (kynurénine et acide hydroxyanthranilique) suppriment la réponse lymphocytaire

T et sont capables de prolonger la survie d'une allogreffe de peau chez le rat (Bauer, Jiga et al. 2005).

L'expression d'IDO est régulée par de multiples éléments de réponse localisés au niveau du promoteur du gène murin et humain, comme les éléments de réponse aux interférons de type I (IFN- α/β) et II (IFN γ) (Taylor and Feng 1991) (Mellor and Munn 1999) (Dai and Gupta 1990) (Hassanain, Chon et al. 1993). Il existe une forte corrélation entre l'inflammation, l'IFN γ et l'induction de l'expression d'IDO. En effet, le lipopolysaccharide (LPS), l'IL-1 et le TNF agissent en synergie avec l'IFN γ pour induire l'expression d'IDO *in vitro* (Babcock and Carlin 2000) (Robinson, Shirey et al. 2003). Cependant, *in vivo*, suite à la stimulation par le LPS, l'expression d'IDO dépend du TNF mais ne nécessite pas d'IFN γ , suggérant l'existence d'une voie indépendante de l'IFN γ pour induire l'expression enzymatique (Fujigaki, Saito et al. 2001).

Suite à la fixation du CTLA-4 Ig avec les molécules B7 sur les DCs, la transduction d'un signal dépendant des voies STAT-1 (signal transducers and activators of transcription 1), NF- κ B et p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) stimule les DCs à produire l'IFN γ . Cette sécrétion d'IFN γ agit de façon autocrine ou paracrine sur les DCs pour générer l'augmentation de l'expression d'IDO. IDO catalyse alors la dégradation du tryptophane en kynurénine et en différents produits résultant du catabolisme. Cette diminution du tryptophane peut conduire à l'inhibition de la prolifération T ou à la mort cellulaire (Finger and Bluestone 2002; Grohmann, Orabona et al. 2002).

La protéine IDO peut être exprimée sans activité enzymatique fonctionnelle. Bien que l'isolation de deux sous populations murines de DC, les CD8 α^+ et les CD8 α^- , expriment des taux comparables d'IDO, seules les DC CD8 α^+ sont capables de cataboliser le tryptophane après stimulation par l'IFN γ (Fallarino, Vacca et al. 2002).

La molécule CTLA-4 membranaire, tout comme sa forme soluble, est capable d'induire IDO dans les DC. En effet, une étude *in vitro* a montré que, chez la souris, l'expression de CTLA-4 sur les cellules T régulatrices CD4 $^+$ CD25 $^+$ permet d'induire la synthèse d'IDO (Fallarino, Grohmann et al. 2003) complétant leur fonctionnalité suppressive. Récemment, une étude a montré qu'en synergie avec un signal TCR, l'interaction de la molécule CTLA-4 Ig avec la molécule B7-2 permet de convertir des cellules T naïves T CD4 $^+$ CD25 $^-$ en cellules T régulatrices CD4 $^+$ CD25 $^+$ FOXP3 $^+$ (Razmara, Hilliard et al. 2008). En effet, la surexpression d'IDO par les BMDCs permet d'induire la tolérance à une greffe de peau chez la souris de façon dépendante de cellules T régulatrices (Yu, Fang et al. 2008). Dans un modèle de greffe

de cœur chez le rat, la tolérance induite par le CTLA-4 Ig est dépendante à la fois de IDO et de NO. En effet, seul l'utilisation combinée des deux inhibiteurs de IDO et de NO (1-MT et aminoguanidine respectivement) *in vivo* a permis d'induire le rejet du greffon (Hill, Zagani et al. 2007).

En dehors de ces effets sur les lymphocytes T, IDO peut également agir de façon indirecte sur d'autres types cellulaires. En effet, plusieurs études ont montré qu'IDO est capable de stabiliser les ARN de cytokines produites par les cellules épithéliales et de réguler négativement l'expression de molécules de CMH de classe I sur les kératinocytes (van Wissen, Snoek et al. 2002; Li, Tredget et al. 2004).

Contrairement à l'utilisation de la molécule recombinante CTLA-4 Ig qui génère des DCs tolérogènes, le CD28 Ig, qui se fixe aussi sur les molécules B7, active les DC qui les expriment. En effet, le traitement de DCs avec la molécule CD28 Ig permet la sécrétion d'IL-6 en plus de la production d'IFN γ mais sans augmentation de l'expression d'IDO (Orabona, Grohmann et al. 2004).

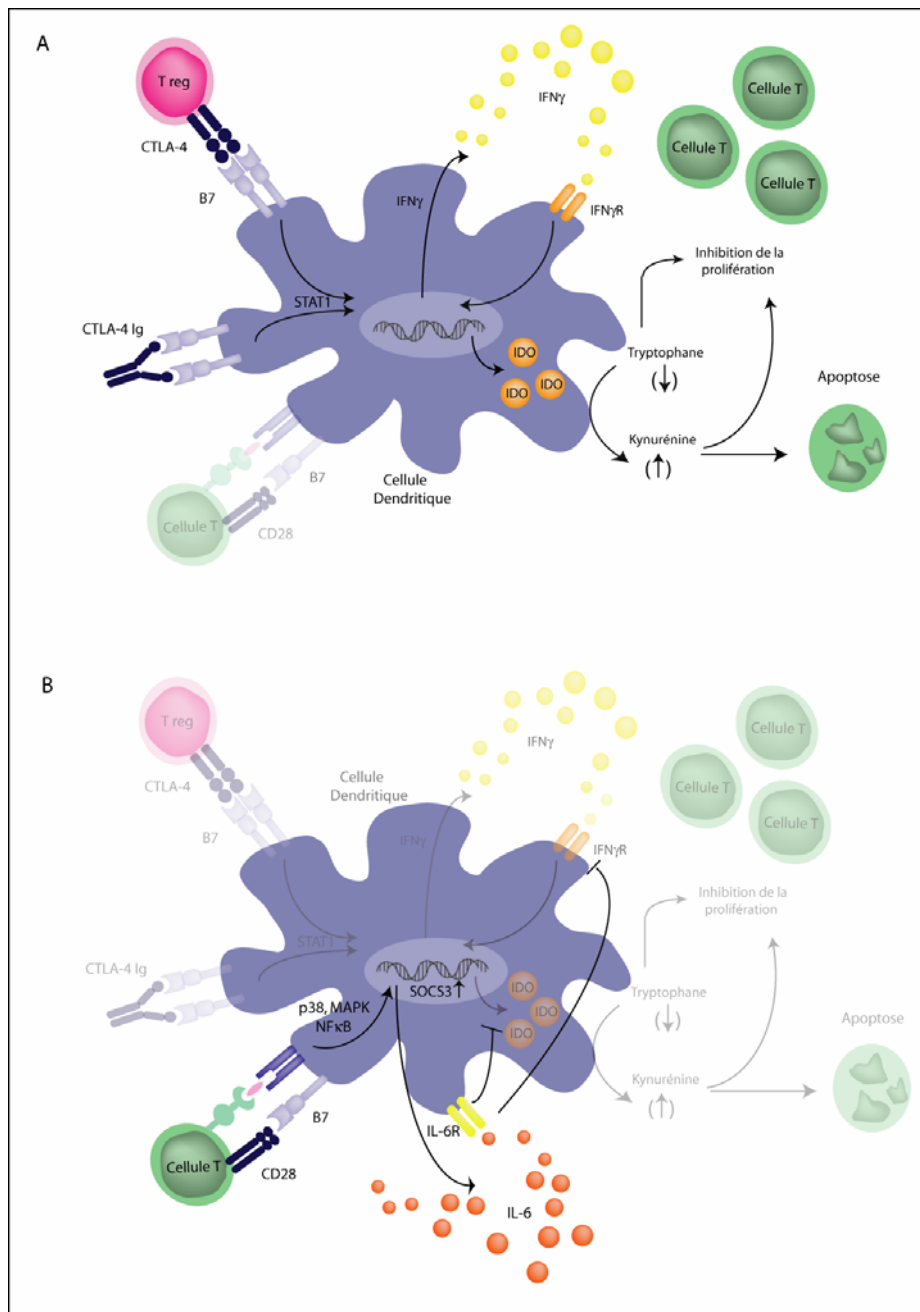


Figure 14 Activation des molécules B7 et induction d'IDO

(D'après Finger et al Nature immunology 2002)

A, L'activation des molécules B7 suite à leur interaction avec CTLA-4 ou CTLA-4 Ig induit un signal tolérogène au sein des cellules dendritiques. En effet, la voie de signalisation dépendante de STAT1 permet aux DCs de produire l'IFN γ qui agit de façon autocrine ou paracrine pour induire l'augmentation de l'expression d'IDO. IDO catabolise la dégradation du tryptophane en kynurénine et autres produits du catabolisme. La diminution du tryptophane dans le microenvironnement et l'augmentation de la kynurénine inhibent la prolifération des lymphocytes T et peut conduire à la mort par apoptose conduisant à un état

de tolérance. B, L'engagement du CD28 sur les molécules B7 permet en plus de la production d'IFN γ , la sécrétion d'IL-6 qui, en agissant de façon autocrine ou paracrine, bloque la production d'IFN γ et en conséquence celle d'IDO stimulant la réponse immunitaire.

III-5- Tolérance induite par le blocage de CD28

De nos jours, la transplantation d'organe reste dépendante de l'utilisation d'immunosuppresseurs pharmacologiques afin d'empêcher le rejet de greffe. Les thérapies immunosuppressives ont ainsi permis de réduire l'incidence du rejet aigu. Cependant, 5% des greffons rénaux sont perdus par an, à cause de dysfonctions chroniques incluant une forme de rejet chronique. Les problèmes concernant le rejet chronique et les complications dues à l'immunosuppression chronique (Cancers, toxicité cardiovasculaire, toxicité rénale) constituent des obstacles majeurs à l'amélioration de la survie à long terme des greffons rénaux. Depuis les 30 dernières années, il a été réalisé que les molécules de costimulation étaient nécessaires à l'induction d'une réponse immune et que le blocage de ces récepteurs en transplantation lors de l'alloreconnaissance influence la réponse du système immunitaire contre un alloantigène particulier. Cibler la costimulation des lymphocytes T et plus particulièrement la costimulation dépendante des molécules B7 est une stratégie qui a été largement étudiée en thérapie d'induction en transplantation et en auto-immunité. Cependant, peu d'études ont été publiées concernant le blocage spécifique de la molécule CD28 permettant de laisser libre l'interaction suppressive/régulatrice CTLA-4/B7. C'est pour cela que lors de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes de régulation induits suite au blocage spécifique de la molécule CD28 dans un modèle de greffe de rein chez le rat, en utilisant un anticorps anti-CD28 permettant d'internaliser la molécule et de laisser libre l'interaction CTLA-4/B7 (voir partie résultats) (**Figure 15**).

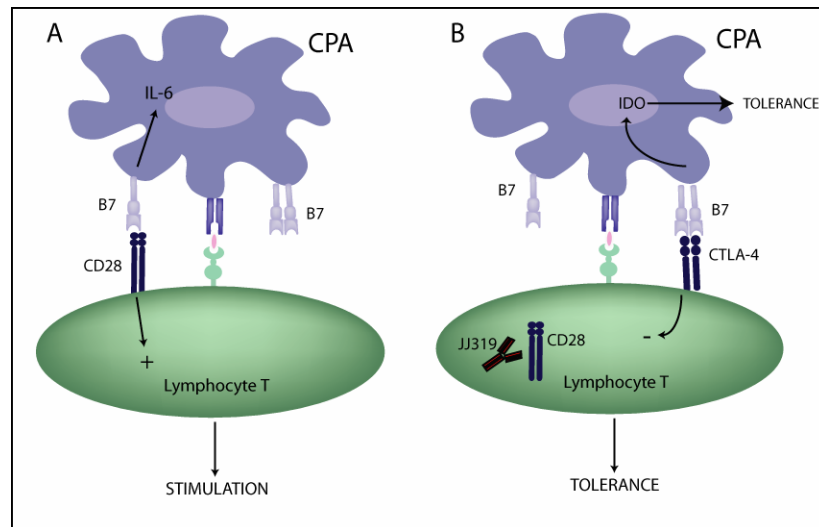


Figure 15 Stratégie de blocage du CD28

A, L'engagement de CD28 avec la molécule B7 permet de stimuler la réponse lymphocytaire T et d'induire la transduction de signaux aux lymphocytes T et aux DCs. Cette interaction permet la synthèse d'IL-2, l'augmentation des molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou Bcl-xl, l'entrée des lymphocytes T dans le cycle cellulaire ainsi que la production d'IL-6 par les DCs. C, l'utilisation d'un anticorps antagoniste dirigé spécifiquement contre la molécule CD28 (le JJ319) bloque les signaux générés aux lymphocytes T et aux DCs. Le JJ319 permet d'internaliser la molécule CD28, générant les signaux négatifs résultant de l'engagement de CTLA-4 avec la molécule B7 : synthèse d'IDO par les DCs et inhibition de la cascade de signalisation et de l'activation lymphocytaire T.

III-5-1- Les anticorps anti-CD28 chez la souris

CD28 joue un rôle important dans l'activation cellulaire T et dans le développement de la GVHD (Yu, Martin et al. 1998) (Blazar, Taylor et al. 1999). Utilisé *in vitro* dans plusieurs modèles expérimentaux, l'anticorps 37.51 est un anticorps monoclonal agoniste, spécifique de la molécule CD28, qui reproduit les signaux de costimulation nécessaires à l'activation des cellules T en empêchant leur anergie (Harding, McArthur et al. 1992). *In vivo*, cependant, cet anticorps inhibe l'expansion lymphocytaire T et réduit le développement de la GVHD induit par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (Yu, Bidwell et al. 2000).

L'incubation *in vitro* de cellules B exprimant B7 en présence d'une protéine recombinante, le CD28 Ig, et de l'anticorps anti-CD28 37.51, a permis de caractériser la liaison de l'anticorps monoclonal sur la molécule CD28 (Yu, Albert et al. 2004). Ces résultats ont ainsi démontré que l'anticorps 37.51 se lie à un épitope différent de celui reconnu par la molécule B7 sur la partie extracellulaire de la molécule CD28, ne bloquant pas l'interaction CD28/B7. Ainsi, des souris transgéniques pour un TCR spécifique de l'ovalbumine traitées avec l'anticorps anti-CD28 et le peptide OVA, ont révélé des taux de cytokines plus élevés qu'en absence d'anti-CD28, confirmant l'effet agoniste de l'anticorps. Cependant, ce même anticorps est capable de supprimer le développement de la GVHD suite à la greffe de moelle osseuse chez la souris. Des tests supplémentaires ont permis de démontrer que cette immunosuppression est dépendante d'un mécanisme résultant de la déplétion par apoptose de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ activées de façon indépendante des voies Fas et TNF. Ce mécanisme est également indépendant du taux d'expression de la molécule Bcl-x_L surexprimée suite à l'activation des signaux par CD28. Suite au transfert de splénocytes provenant de souris sauvages ou déficientes pour l'IFN γ dans des receveurs allogéniques irradiés et traités avec l'anti-CD28 37.51, des analyses ont évalué le taux de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ du donneur. Ainsi, l'absence d'IFN γ empêche la réduction du taux de lymphocytes T observée dans la situation contrôle, suggérant que cette apoptose des lymphocytes T est IFN γ dépendante (Yu, Albert et al. 2004).

Ce même anticorps a été utilisé dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde, la CIA (collagen-induced-arthritis), induite suite à l'immunisation contre le collagène de type II en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund (Holmdahl, Andersson et al. 1990). Lors de cette étude, le blocage des molécules B7-1 et B7-2 diminue la sévérité de la maladie alors que le traitement avec un anticorps anti-CD28 (37.51) conduit seulement à un retard dans le développement de la maladie. L'utilisation d'anticorps anti-CD28 a également été étudiée dans d'autres modèles tels que l'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) chez la souris. L'EAE peut être induite suite à l'immunisation active avec la protéine de la myéline, la MBP (myelin basic protein) (Perrin, Scott et al. 1996) ou bien suite au transfert adoptif de cellules des ganglions lymphatiques de souris immunisées avec cet antigène (Perrin, Scott et al. 1995). L'étude de cette maladie a tout d'abord permis de montrer que les molécules B7 jouent un rôle crucial dans son développement. Ainsi, le CTLA-4 Ig, en interagissant avec les molécules B7, empêche l'activation simultanée des deux voies de costimulation CD28/B7 et CTLA-4/B7. Selon le moment choisi pour administrer le traitement, le CTLA-4 Ig peut

conduire soit à la suppression soit au développement de la maladie (Racke, Scott et al. 1995). Le blocage individuel de l'une ou l'autre des molécules B7 a également été analysé. Ainsi, contrairement au traitement par un anti-B7-2, le traitement par un anticorps anti-B7-1 diminue le développement de la maladie (Racke, Scott et al. 1995) (Perrin, Scott et al. 1996). De plus, l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA-4, en bloquant le signal inhibiteur, favorise le développement de la maladie (Hurwitz, Sullivan et al. 1997). Dans ce modèle, l'utilisation de fragments Fab de l'anticorps monoclonal anti-CD28 PV-1, qui bloque spécifiquement l'interaction CD28/B7, améliore l'EAE en supprimant la sécrétion de TNF α et empêche la rechute (Perrin, June et al. 1999).

L'effet du blocage de la costimulation a été étudié *in vivo* dans un autre modèle de maladie auto-immune, l'EAU (experimental autoimmune uveoretinitis), un modèle d'uvéïte. L'EAU est induite chez la souris suite à l'immunisation avec des antigènes rétiens ou par le transfert adoptif de cellules T CD4⁺ spécifiques d'un antigène de la rétine (Sanui, Redmond et al. 1989) (Rizzo, Silver et al. 1996). Le blocage des molécules B7 ou de la molécule CD28 a été analysé lors de la première immunisation. Ainsi, l'administration d'anticorps anti-B7-1 et d'anti-B7-2 ou d'anticorps anti-CD28 (PV-1), pendant la première stimulation antigénique, empêche le développement de la maladie et supprime les réponses immunologiques qui y sont associées. Cependant, une fois que le taux d'anticorps circulants a disparu, la seconde immunisation est accompagnée d'une rechute et d'une réponse cellulaire élevée (Silver, Hathcock et al. 2000) suggérant que le blocage de la costimulation empêche le développement de l'EAU mais ne permet pas d'induire de tolérance à long terme.

III-5-2- Les anticorps anti-CD28 chez le rat

Chez le rat, deux anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule CD28 ont été développés dans le laboratoire de Thomas Hunig (Wurzberg, Allemagne) : le JJ319 et le JJ316 (Tacke, Clark et al. 1995). *In vitro*, ces deux anticorps sont capables d'activer les lymphocytes T. Ainsi, le JJ316, anticorps superagoniste, est capable d'induire, en absence de signal antigénique, la prolifération et la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T. En revanche, le clone JJ319, est un anticorps qui ne possède pas cette activité superagoniste mais qui est capable de générer un signal de costimulation seulement suite à l'engagement du TCR *in vitro* (Hunig and Dennehy 2005). Même si le JJ319 est activateur de la réponse lymphocytaire T *in vitro*, il est antagoniste *in vivo* car il entraîne la modulation transitoire de l'expression de

CD28 à la surface des cellules sans induire de déplétion des lymphocytes T (Tacke, Hanke et al. 1997). Les différences d'activité de ces 2 anticorps sont liées aux épitopes reconnus : le JJ316 se lie à la boucle C''D du domaine immunoglobuline de la molécule CD28 alors que le JJ319 reconnaît un épitope proche du site de liaison des molécules B7 (Luhder, Huang et al. 2003).

En transplantation, des études *in vivo* ont permis de démontrer que le clone JJ319 prolonge la survie d'une allogreffe de coeur hétérotopique chez le rat en empêchant le développement du rejet aigu sans induire un état de tolérance à long terme (Dengler, Szabo et al. 1999; Dong, Yuan et al. 2002). En effet, suite à l'injection intrapéritonéale de 8 mg de JJ319, le CD28 est modulé en surface pendant dix jours pour être totalement ré-exprimé à la surface de la cellule en 21 jours, temps au bout duquel le taux circulant d'anticorps n'est plus détectable dans le sérum. En utilisant des souches de rats incompatibles uniquement pour les antigènes mineurs d'histocompatibilité, le traitement par un anticorps anti-CD28 ou par le CTLA-4 Ig protège contre le développement du rejet chronique suite à une allogreffe de coeur (Azuma, Chandraker et al. 1996; Dong, Yuan et al. 2002). Ce n'est seulement qu'en association avec la cyclosporine A (Dong, Yuan et al. 2002) ou un adénovirus codant pour le CD40 Ig (Guillonnet, Seveno et al. 2007), que le traitement par un anticorps anti-CD28 entraîne la survie à long terme suite à une allogreffe de coeur chez le rat. Une autre étude a montré que le traitement de rats avec le JJ319 inhibe les réponses allogéniques de la voie directe de présentation alors qu'elles conservent les réponses face à un antigène exogène (Haspot, Villemain et al. 2002). De plus, dans un modèle de greffe de rein chez le rat, l'administration de l'anticorps JJ319, en monothérapie, permet d'induire une survie à long terme sans aucun signe de rejet chronique (Haspot, Seveno et al. 2005). Dans ce modèle, nous avons identifié l'existence d'une population de cellules myéloïdes suppressives (Article 1). De même, dans un modèle de rejet chronique chez le rat, le blocage du CD28 prolonge la survie d'une allogreffe de rein (Laskowski, Pratschke et al. 2002). Plus récemment, le JJ319 permet de prolonger la survie d'allogreffe de cornée chez le rat (Thiel, Steiger et al. 2005). Enfin, le traitement de rats Lewis à l'aide du JJ319 ou du JJ316 en combinaison avec une transfusion de sang spécifique du donneur (DST) 14 et 7 jours avant la greffe permet une survie indéfinie d'une allogreffe de foie chez 100% des receveurs (Urakami, Ostanin et al. 2006). Cet effet protecteur est associé avec une augmentation du nombre de splénocytes CD4⁺CD45RC⁻ chez les tolérants.

Les anticorps monoclonaux anti-CD28 de rat ont également été utilisés dans différents modèles d'autoimmunité. Ainsi l'EAN (experimental autoimmune neuritis) est un modèle du syndrome de Guillain-Barré chez l'homme qui provoque la démyélinisation du système nerveux périphérique. L'EAN peut être induite par immunisation avec de la myéline du système nerveux périphérique ou avec les protéines P0 et P2 en association avec de l'adjuvant complet de Freund. Le traitement de l'EAN chez le rat par un anticorps superagoniste anti-CD28, le JJ316, avant ou pendant l'immunisation, empêche le développement de la maladie. La diminution de l'incidence de cette maladie est accompagnée par une diminution de l'infiltrat lymphocytaire T et de la démyélinisation *in situ* (Schmidt, Elflein et al. 2003). Ces travaux suggèrent que l'utilisation d'un anticorps superagoniste stimulant directement l'activité du CD28, peut inhiber la migration cellulaire ou l'expansion clonale qui influencent directement la réponse des cellules T autoréactives. L'explication à ce phénomène a été fournie par l'équipe de Thomas Hunig qui a démontré qu'en plus de favoriser une réponse Th2 et d'induire l'IL-10 (Rodriguez-Palmero, Hara et al. 1999), les anticorps anti-CD28 superagonistes sont capables de générer l'expansion d'une population de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ fonctionnelles (Lin and Hunig 2003). Ce effet a également été démontré dans un modèle d'EAE chez le rat Lewis (Beyersdorf, Gaupp et al. 2005) où des lymphocytes T régulateurs apparaissent. Le transfert adoptif de ces cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺ améliore la maladie suggérant que l'effet thérapeutique obtenu est médié par l'activation *in vivo* de ces cellules (Beyersdorf, Gaupp et al. 2005).

L'arthrite induite par un adjuvant (AA), modèle d'arthrite rhumatoïde chez l'homme, est une maladie inflammatoire associée aux lymphocytes T CD4⁺. Elle est induite par une simple injection intradermique de mycobactéries. L'AA est évaluée par l'augmentation du volume des pattes de l'animal ainsi que par la diminution de son poids. Le traitement de l'AA par le JJ316 empêche le développement inflammatoire de la maladie. Cet effet est associé à la diminution dans le sang du ratio de cellules T CD4⁺CD45RChigh/TCD4⁺CD45RClow, reflétant l'expansion de cellules de type Th2 et une augmentation de l'expression d'IL-10 au niveau de la membrane synoviale. De plus, les taux d'anticorps anti-mycobactériens diminuent suite au traitement des animaux par le JJ316 (Rodriguez-Palmero, Franch et al. 2006) (**Tableau 3**)

| Modèle | Espèce | Traitement | Effets | Références |
|----------------------------------|---------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Allogreffe cardiaque | Rat | Anti-CD28 (JJ319) | Prolongation de survie | (Dengler, Szabo et al. 1999) |
| Allogreffe cardiaque | Rat | Anti-CD28 + CsA | Tolérance | {Dong, 2002 #639} |
| Allogreffe cardiaque | Rat | Anti-CD28 (JJ319) + CD40Ig | Tolérance | (Guillonneau, Seveno et al. 2007) |
| Allogreffe cardiaque/peau | Souris | Anti-CD28 + Anti-CD40L | Tolérance | (Larsen, Elwood et al. 1996) |
| Allogreffe cardiaque | Macaque | Anti-CD28 (Sc28AT) + CsA + Stéroïdes | Tolérance | (Zhang et al, soumis) |
| Allogreffe rénale | Rat | Anti-CD28 + CsA | Tolérance | {Laskowski, 2002 #662} |
| Allogreffe rénale | Rat | Anti-CD28 (JJ319) | Tolérance | (Haspot, Seveno et al. 2005) |
| Allogreffe d'ilôts pancréatiques | Souris | Anti-CD28 + Anti-LIGHT | Tolérance | (Fan, Wang et al. 2007) |

Tableau 3 Modèles d'induction de tolérance suite au blocage de la molécule CD28

III-5-3- Les anticorps anti-CD28 chez l'homme

Le blocage spécifique de la molécule CD28 permettrait de maintenir l'interaction régulatrice CTLA-4/B7 nécessaire au développement de mécanismes suppresseurs responsables de la tolérance en transplantation. Cependant, cibler CD28 avec un anticorps divalent peut conduire à la dimérisation de la molécule et ainsi, à son activation (Damle, Doyle et al. 1988). Pour cela, l'utilisation d'un fragment monovalent d'anticorps, tel que le fragment Fab d'un anticorps anti-CD28, permettrait d'inhiber l'interaction CD28/B7 sans stimuler CD28 (**Figure 16**).

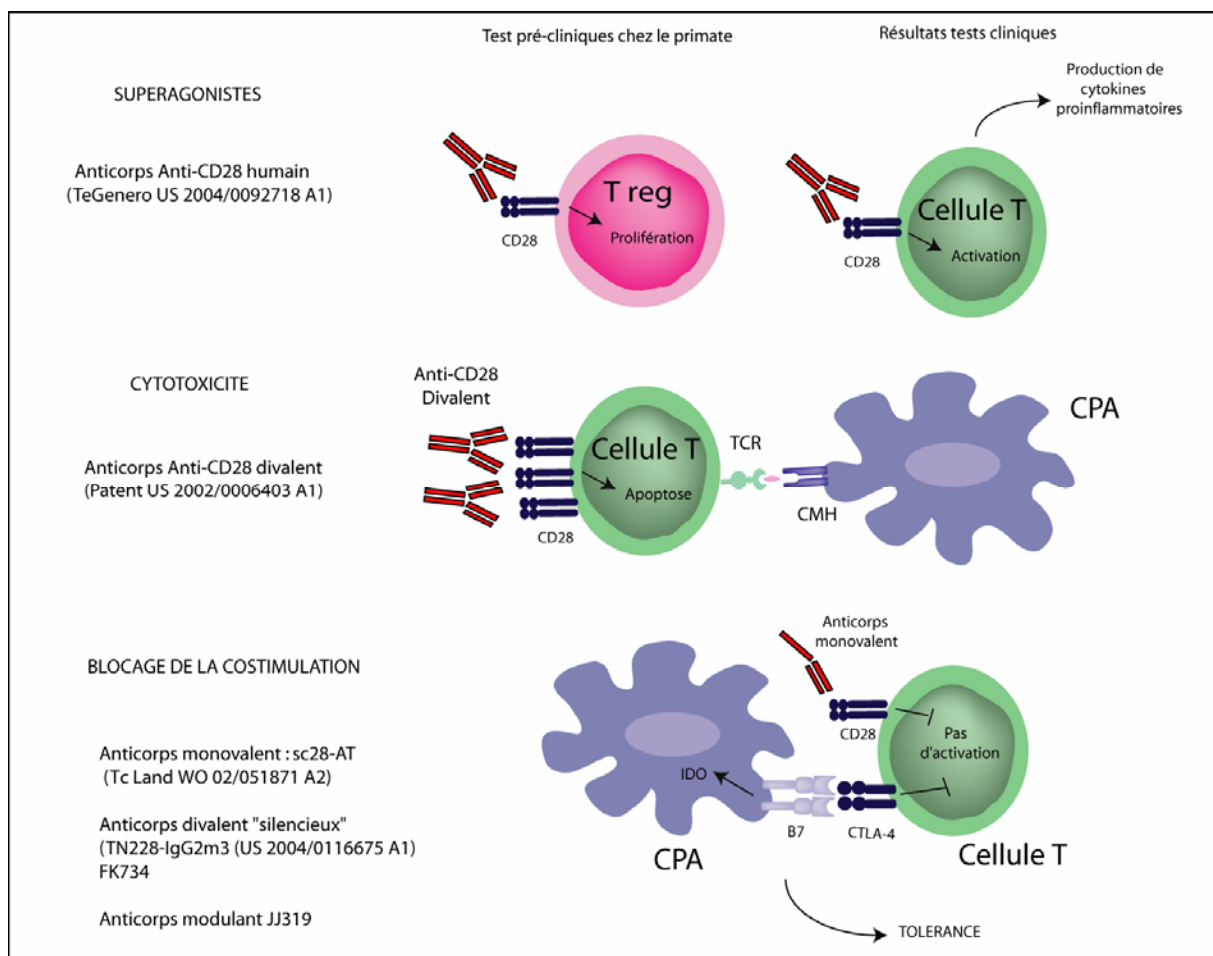


Figure 16 Stratégies immunosuppressives ciblant le CD28

Utilisés *in vivo*, les fragments Fab d'anticorps ont cependant une demi-vie sérique très courte et sont rapidement éliminés. Ainsi, à l'INSERM U643, nous avons proposé qu'un anticorps monovalent possédant une demi-vie allongée pourrait bloquer le CD28 chez l'homme. Nous

avons ainsi développé un anticorps monovalent antagoniste, provenant de la fusion d'un fragment ScFv (Single chain Fv) de l'anticorps humain bloquant de haute affinité, le CD28.3, et de l' $\alpha 1$ anti-trypsine humaine (Vanhove, Laflamme et al. 2003). La fusion moléculaire avec l' $\alpha 1$ anti-trypsine humaine permet d'augmenter la taille de la protéine et ainsi la demi-vie sérique de la molécule (Ferkol, Eckman et al. 2000). La protéine obtenue a été appelée Sc28AT (**Figure 17**).

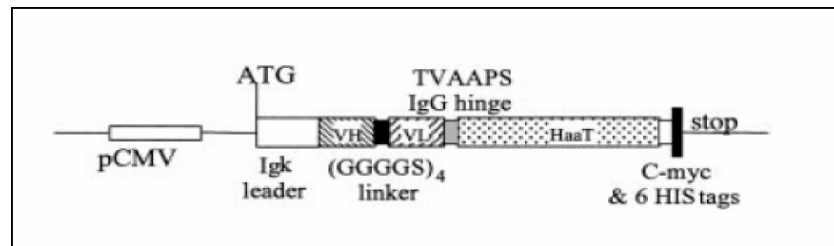


Figure 17 Schéma de la construction de la molécule de fusion scFv28.3-HaaT

Les fragments d'ADN codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères de l'anticorps CD28.3 sont liés par le linker (GGGGS) et fusionnés à l' $\alpha 1$ anti-trypsine humaine.

Une étude pré-clinique effectuée en collaboration avec R. Pierson (Université de Maryland), a été réalisée chez le macaque dans un modèle de greffe de cœur hétérotopique. L'injection de faibles doses (2 mg/kg) de sc28AT chez 2 primates de J0 à J20 a permis de retarder significativement le rejet de greffe. L'administration de sc28AT en bithérapie avec des doses suboptimales de cyclosporine A a bloqué complètement le rejet aigu et a empêché le développement de lésions de rejet chronique vasculaire (T. Zhang, B.H Nguyen, G. Wu, B. Vanhove, A. Azimzadeh and R. Pierson. Efficacy of a novel non-activating anti-CD28 scFv Ab in cynomolgus monkey cardiac allotransplantation. Communication orale au World Transplant Congress, Boston, 16-21 Juillet 2006.).

Des tests pratiqués au laboratoire *in vitro* ont montré que la molécule cross-réagissait également chez le babouin et qu'elle était capable de supprimer la prolifération lymphocytaire

T. *In vivo*, l'administration de sc28AT suite à une greffe de rein chez le babouin, permet de prolonger significativement la survie des animaux (Données encore non publiées).

L'administration *in vivo* d'un anticorps humanisé anti-CD28 superagoniste, le TGN1412 (TeGenero), a fait l'objet d'un essai clinique de phase I chez l'homme en Angleterre en 2006. Comme son homologue murin JJ316, le TGN1412 stimule directement les lymphocytes T indépendamment du signal antigénique. Lors des études pré-cliniques chez le primate, la stimulation du CD28 avec le TGN1412 a activé préférentiellement les cellules T de type Th2 et en particulier les cellules T régulatrices T CD4⁺CD25⁺ résultant en une lymphocytose transitoire sans effets toxique. Six volontaires sains ont participé à cette étude de phase I et ont reçu une dose intraveineuse de 0.1 mg/kg de TGN1412. Chez ces volontaires, l'action agoniste de l'anticorps a été beaucoup plus forte que chez les primates, ce qui a conduit à l'activation polyclonale du compartiment T et au développement d'un choc cytokinique majeur ayant généré une déficience de multiples organes (Suntharalingam, Perry et al. 2006). Cet accident montre que les modèles primates ne reproduisent pas toujours la biologie humaine. Dans le cas de CD28, la présence chez l'homme d'acides aminés additionnels impliqués dans la transmission du signal peut expliquer cette différence (Ohresser, Olive et al. 2006).

Les effets immunomodulateurs du FK734 (clone TN228), un anticorps de souris anti-CD28 humanisé, ont été testés *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de greffe de peau chez la souris SCID. Cet anticorps « silencieux » possède une mutation dans sa portion Fc de la chaîne lourde de l'IgG2 humaine empêchant sa reconnaissance par les récepteurs Fc γ , limitant ainsi l'effet agoniste dû à la multimérisation de l'anticorps. *In vitro* cet anticorps est partiellement agoniste. Cet anticorps est toutefois capable de diminuer la production de cytokines ainsi que la prolifération de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ recevant un important signal par les molécules B7 en MLR. L'administration du FK734 à des souris *scid* ayant reçu une greffe de peau humaine et des PBMC humains réduit la réponse cellulaire T, suggérant une fonction immunosuppressive de l'anticorps *in vivo* (Shiao, McNiff et al. 2007).

Enfin, J.Nunes a développé une batterie d'anticorps anti-CD28 différents en fonction de l'épitope qu'ils reconnaissent. Ainsi, les anticorps CD28.1, CD28.3 et CD28.5 qui partagent le même épitope sont inhibiteurs de la réponse immunitaire et n'induisent ni sécrétion d'IL-2 ni relargage de calcium intracellulaire (Nunes, Klasen et al. 1993).

RESULTATS

IV- Article 1

IV-1- Résultats

Myeloid derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion

Anne-Sophie Dugast, Thomas Haudebourg, Flora Coulon, Michèle Heslan, Fabienne Haspot, Nicolas Poirier, Romain Vuillefroy de Silly, Claire Usal, Helga Smit, Bernard Martinet, Pamela Thebault, Karine Renaudin, Bernard Vanhove

ITERT-INSERM U643, Nantes

Article publié dans Journal of Immunology en 2008

**Myeloid derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance
and specifically suppress effector T cell expansion.**

Running title: Non-T suppressor cells in transplant tolerance.

Anne-Sophie Dugast^{*}, Thomas Haudebourg^{*}, Flora Coulon^{*}, Michèle Heslan^{*}, Fabienne Haspot^{*}, Nicolas Poirier^{*}, Romain Vuillefroy de Silly^{*}, Claire Usal^{*}, Helga Smit^{*}, Bernard Martinet^{*}, Pamela Thebault^{*}, Karine Renaudin[†], Bernard Vanhove^{*}

* INSERM, U643, CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

† Service d'anatomie pathologique du CHU de Nantes, Nantes, France.

Grant support: This program has been in part funded by the ROTRF (Roche Organ Transplant Research Foundation) grant # 466230972 to B.V. and by the Progreffe Foundation.

KEYWORDS : Transplantation, Costimulation, Tolerance/Suppression/Anergy, Monocytes/Macrophages, Rodent.

Address correspondence to: Bernard Vanhove, ITERT, INSERM U643, CHU Hotel Dieu, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33-240-087-410. Fax: +33-240-087-411. Email: Bernard.Vanhove@univ-nantes.fr

ABBREVIATIONS

iNOS: inducible nitric oxide synthase

HO-1: heme oxygenase-1

MDSC: myeloid derived suppressor cells

Treg: Regulatory T cell

Abstract

The immune tolerance to rat kidney allografts induced by a perioperative treatment with anti-CD28 antibodies is associated with a severe unresponsiveness of peripheral blood cells to donor antigens. In this model, we identified an accumulation in the blood of CD3⁻ClassII⁻CD11b⁺CD80/86⁺ plastic-adherent cells that additionally expressed CD172a as well as other myeloid markers. These cells were able to inhibit proliferation, but not activation, of effector T cells, and to induce apoptosis in a contact-dependant manner. Their suppressive action was found to be under the control of inducible nitric oxide synthase, an enzyme also upregulated in tolerated allografts. Based on these features, these cells can be defined as myeloid derived suppressor cells (MDSC). Interestingly, CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells were insensitive in vitro to MDSC-mediated suppression. Although the adoptive transfer of MDSC failed to induce kidney allograft tolerance in recently transplanted recipients, the maintenance of tolerance after administration of anti-CD28 antibodies was found to be dependent on the action of inducible nitric oxide synthase. These results suggest that increased numbers of MDSC can inhibit alloreactive T cell proliferation in vivo and that these cells may participate in the NO-dependant maintenance phase of tolerance.

Introduction

Although transplant tolerance in rats has frequently been associated with the action of regulatory T cells (Tregs) (1-3), in some cases Tregs are not instrumental. For example, administration of anti-CD28 antibodies (4) or anti-donor class II antibodies (5) results in tolerance to kidney allografts across a full MHC barrier with an immune suppression that is at least partially dependent on non-T cells. In the majority of cases, non-T cell populations with potential regulatory activity in the transplant setting have been identified as regulatory dendritic cells producing IDO (6) and HO-1 (7), alternatively activated macrophages creating a Th-2 environment (8) or NKT cells (9). Another type of non-T regulatory cell, so-called myeloid suppressor cells, have been associated with impaired immune reactivity to antigen challenge (mainly tumors but also infections), chronic inflammation, or superantigen-induced tolerance of CD4⁺ T lymphocytes (reviewed by Sefarini et al (10)). Myeloid suppressor cells have also been found to contribute to the immunosuppression accompanying the lethal systemic graft-versus-host reaction in irradiated mice (11). These cells are a heterogeneous mixture of myeloid cells at different stages of differentiation, including precursors of granulocytes, macrophages, dendritic cells, or early myeloid progenitors. To avoid confusion between mesenchymal stem cells and the commonly used term myeloid suppressor cells, Gabrilovich et al proposed the term Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC)(12). In mice, these cells share the common functional characteristics of being able to inhibit T cell responses by inducing the apoptosis of activated T cells via up-regulation of NO production (13). NO regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak/STAT5 signaling pathway (14). In addition, ARG1 can be induced in MDSC under the action of Th-2 type cytokines, which synergizes with NO to give rise to peroxinitrites that drive the apoptosis of antigen-primed T lymphocytes by inhibiting protein tyrosine phosphorylation via nitration of

tyrosine residues (15). It has also been suggested that MDSC suppressive activity is mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and requires an interaction between CD152 on Tregs with CD80 that is upregulated on MDSC upon contact with activated T lymphocytes (16). Mouse MDSC are defined phenotypically by their expression of CD11b and Gr1 (Ly-6G). The human equivalent are less well defined; they have been described as granulocyte-macrophage-progenitor cells expressing the CD34 marker (17). The rat counterparts express the CD11b/c and HIS 48 myeloid markers (18).

Having previously identified non-T cells with suppressive activity in a rat model of kidney transplant tolerance (4), the aim of the current study was to characterize the phenotype and mechanisms of action of these cells. We report here on an accumulation of suppressor cells within the peripheral blood and grafts of tolerant kidney graft recipients. These cells are characterized by their expression of CD80/86, SIRP α (CD172a), CD11a/b and iNOS and their ability to suppress T cell proliferation in a contact-dependent and iNOS-dependent manner. In addition, our data demonstrate that these MDSC selectively suppress activated effector T cells, whereas natural CD4⁺CD25^{high} Tregs are largely resistant to this effect.

Material and methods

Animals and transplantations.

Eight- to 12-week-old male Lewis.1W (LEW.1W, haplotype RT1^u) and Lewis.1A (LEW. 1A, haplotype RT1^a) congenic rats (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) differed in their entire MHC region. Heterotopic LEW.1W kidney transplantation was performed as previously described (19). The kidney (right side) of the recipient (LEW.1A) was replaced by a LEW.1W donor allograft and a contralateral nephrectomy was performed 7 days later, after which time the allograft was life-sustaining. Studies described here have been performed in accordance with the institutional guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Tolerance induction.

The JJ319 (IgG1 anti-rat CD28) mouse hybridoma was a gift from Dr. Thomas Hunig (Wurzburg, Germany). The JJ319 mAb was purified from hybridoma supernatant and administered to LEW.1A allograft recipients by intraperitoneal injection at 1mg/day for 7 days starting on the day of transplantation. This antibody induces a transient down modulation of CD28 expression in vivo, without depleting target cells (20). Without treatment, the grafts were rejected 11 days post-transplantation. Syngeneic transplants (LEW.1A to LEW.1A) served as controls.

Antibodies and reagents

Purified anti-B7-1 (clone 3H5) and anti-B7-2 (clone 24F) mouse hybridomas were a gift from Dr. Yagita, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan. FITC-conjugated Pan-T (CD6), anti-CD11a (WT.1), anti-CD11b (WT.5), anti-RT1A (MHC class I), anti-CD40 and purified anti-CD45R (clone HIS24) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA).

HIS-48 antibody was from Serotec (Cergy, France). FITC-conjugated anti-CD172a (SIRP α or OX41), anti-CD4 (W3/25), anti-MHC class I (OX18), anti-MHC class II (OX6), anti-CD8 (OX8), anti-CD25 (OX39), anti-CD103 (OX62), anti-CD90 (OX7) and anti-CD62L (OX85) were prepared in our laboratory from the corresponding hybridomas obtained from the ECACC (Salisbury, UK). AlexaFluor 647-conjugated anti-NKRP-1 (3.2.3) was prepared in our laboratory using a conjugation kit (Molecular Probes Invitrogen, Cergy Pontoise, France). PE-conjugated anti-mouse was purchased from Jackson Immunoresearch (Suffolk, UK). The anti-TCR β R7-3 antibody was stained with a Zenon alexa fluor 700 mouse IgG1 labeling kit from Molecular Probes according to the manufacturer's instructions. Rabbit anti-rat iNOS antibody was purchased from Abcam (Cambridge, UK).

Cells and cell sorting

Spleen T cells were prepared by nylon wool adhesion followed by depletion of NK cells, B cells and monocytes using specific mAbs (clone 3.2.3, clone HIS24 and clone OX42 respectively), followed by anti-mouse IgG-coated Dynabeads (Invitrogen). Blood sampling was performed in heparin tubes. Erythrocytes were removed by hypotonic lysis. MDSC were identified by staining 30 min at 4°C with anti-rat CD80/86 mAbs and PE-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (Jackson). After saturation with an excess of mouse IgG, cells were stained with FITC-conjugated anti-rat CD6 antibody and alexa 647-conjugated anti-rat NKRP-1 antibody. Cells were then filtered (60 μ m) and sorted using an ARIA flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, France). Cell purity after sorting was routinely > 95%. Bone marrow cells were isolated from the femurs and tibias of tolerant LEW.1A rats.

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 Sequence Detection System using SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA). The following oligonucleotides were used: rat iNOS: upper primer 5'-GACCAAACCTGTGTGCCTGGA-3' and lower primer 5'-TACTCTGAGGGCTGACACAAGG-3'. Rat HPRT: upper primer 5'-CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC-3' and lower primer 5'-TTCGCTGATGACACAAACATGA-3'. HPRT was used as an endogenous control gene to normalize varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a control sample, used for all experiments, was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. All samples were analyzed in duplicate. Expression of genes of interest was compared between tolerant animals and syngeneic controls.

Adoptive cell transfer

Cell transfer was performed by i.v. injection into non-irradiated recipients on the day of kidney transplantation, as previously described (5). Donor cells were unfractionated spleen cells or MDSC purified from blood and bone marrow. In other experiments, CFSE-labeled alloreactive T cells were transferred into irradiated recipients and proliferated in vivo in a GVHD-like manner, as previously described (21). Briefly, 150×10^6 spleen cells from LEW.1A rats were injected i.v. into allogeneic LEW.1W recipients that received a sublethal (4.5 Gy) total body irradiation on day -1. Eight million MDSC from the blood of LEW.1W rats were co-injected. On day 2.5, spleens were harvested and the number of CFSE⁺ cells was analyzed by flow cytometry.

Cell culture and proliferation assays

MLRs were performed as previously described (21). Spleen dendritic cells, used as APC and stimulators, were enriched from LEW.1W spleens by a 14.5% Nicodenz gradient as previously reported (22). 10^5 APC and 10^5 responding cells were cocultured for 5 days in 96-well round-bottom culture plates in RPMI 1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine, 100 U mL⁻¹ penicillin, 0.1 mg.mL⁻¹ streptomycin, 10% heat-inactivated FCS, 1% non-essential amino-acids, 5 mM Hepes, 1 mM sodium pyruvate and 1 μ M beta mercapto-ethanol. Proliferation was measured by addition of 0.5 μ Ci ³H-thymidine per well. For polyclonal stimulation, T cells were stimulated with 2.6 μ g/mL anti-CD28 antibodies in flat-bottom 96-well plates previously coated with anti-CD3 (0.5 μ g/mL; 2 hours at 37°C). For transwell assays, $3 \cdot 10^5$ cells were placed in the lower and/or upper chamber of a 24-well Costar® Transwell (Fisher Scientific, Illkirch, France) plate and cultured for 3 days. Proliferation was measured as for MLRs. In suppression assays, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, Sigma) was used at 5 mM; 1-Methyl-DL-tryptophan (1-MT; Sigma) was used at 200 μ M and Tin protoporphyrin (SnPP; Porphyrin Products, Logan, UT) at 50 μ M.

Mixed leukocyte reactions.

MLRs were performed as previously described (21) , except that 5 mM N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; Sigma) was added to the medium.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assessed in a ⁵¹Cr release assay. Target cells (YAC-1 cells, ECACC) were labeled with ⁵¹Cr for 60 minutes at 37°C in complete medium. Serial dilutions of effector cells in complete medium were mixed with 3000 ⁵¹Cr-labeled target cells in triplicate in V-bottom 96-well plates and centrifuged for 1 minute at 1500 g. Plates were then incubated for 4 hours at 37°C, 5% CO₂. The supernatants were harvested and ⁵¹Cr release was determined using a

scintillation counter (Perkin Elmer, Machelen, Belgium). Specific cytotoxicity was calculated according to the following formula: $(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) \times 100 / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})$.

Cytokine assays

IFN γ and IL-2 in the supernatants were measured by ELISA using kits from Becton Dickinson and R&D Systems (Lille, France), respectively, according to the manufacturer's instructions.

Immunostaining

Analyses of cell cytopins were performed after acetone fixation and saturation (using PBS, 4% BSA, 10% goat serum) for 30 minutes at room temperature. Staining with iNOS antibodies (Abcam) was performed overnight at 4°C. Cells were washed 3 times and incubated for 1 hour at room temperature with FITC-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1/100 and mounted with DAKO. Graft samples were embedded in Tissue Tek (OCT Compound, Torrance, CA, USA), snap-frozen in liquid nitrogen, cut into 5 μm sections and fixed in acetone. Sections were permeabilized for 30 minutes at room temperature using 0.5% saponin, 4% BSA, 2% normal goat serum, 10% rat serum in PBS, and stained with the primary antibody rabbit anti-iNOS (Abcam), FITC-conjugated anti-HIS48 mAb and purified CD11b/c (OX42) mAb overnight at 4°C. After washing, sections were incubated 1h30 with the secondary antibody Alexa 350-conjugated anti-rabbit (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen) and Alexa 568-conjugated anti-mouse IgG2a (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Chemicon, Huissen, The Netherlands), mounted with DAKO and analyzed using a confocal-like immunofluorescence technique (Zeiss 200M microscope with an Apotome module, Zeiss, Le Pecq, France). Control sections were

performed by replacing the primary antibodies with dilution buffer. Naive kidneys were used as negative controls.

Western Blot Analysis

Cells extracts were prepared in RIPA buffer and quantified by BCA Protein Assay Reagent (Pierce). Ten μg of total protein were resolved by 7.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (ECL HybondTM GE Healthcare, Orsay, France) using a Trans-BlotTM SD semidry electrophoretic transfer cell (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% skimmed milk for 2 hours at room temperature, probed overnight at 4°C with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-iNOS (Abcam) or 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -actin (Santa Cruz, Le Perray en Yvelynes, France) antibodies and with secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit antibodies (Jackson Immunoresearch) or HRP-conjugated donkey anti-mouse, respectively, diluted 1/2000 in washing buffer. After washing, membranes were revealed using enhanced chemiluminescence (ECLTM Western Blot, GE Healthcare) and exposed to Kodak X-Omat LS x-ray films.

FACS analyses

Cells were incubated with Alexa 647-conjugated 3.2.3 mAb, PE-conjugated CD80 mAb and biotinylated-conjugated CD86 mAb for 20 minutes at 4°C. Cells were then washed twice and incubated with Streptavidin PECy7 for 20 minutes at 4°C. After 15 min saturation, cells were stained for 20 minutes with FITC-conjugated mAbs directed against rat CD antigens. To finish, cells were stained with Alexa 700 conjugated R7-3 or CD6 mAb for 30 minutes at RT. Analyses were performed using a FACScan II cytofluorometer (BD Biosciences) and Flow Jo software. The negative gates were set using Fluorescence Minus One (FMO) controls. Apoptosis was assessed by staining with APC-conjugated Annexin V (BD Pharmingen) according to the manufacturer's instructions. Evaluation of T cell proliferation by flow cytometry was performed by staining of pure T cells with 5 μM carboxyfluorescein diacetate

succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, O.R, US) for 5 minutes at room temperature and measuring the FL-1 channel after cell culture.

Statistical analyses.

Statistical significance was evaluated using a Mann-Whitney test for the comparison of two groups. Graft survival was evaluated by Kaplan-Meier analysis using the log rank test.

Results

Regulatory cell phenotype.

We have previously demonstrated that administration of anti-CD28 antibodies as an induction treatment results in immune tolerance to kidney allografts that is characterized by a hyporesponsiveness of recipient blood cells after challenge with donor alloantigens (4). In the latter study, we identified a non T cell population in the recipient blood that showed suppressive activity and was responsible for the inhibition of alloreactive T cells. These cells expressed NKRP-1, CD80 and/or CD86. Here, we further characterized the phenotype of these cells. We first noticed that depletion of either CD80⁺ or CD86⁺ cells from the blood using magnetic beads totally restored the allogeneic proliferative response of PBMC against donor APC (Figure 1A), suggesting that the regulatory cells in this model expressed CD80 and CD86. Next, we analyzed the phenotype of these cells after gating on non-T (CD6⁻), CD80/86⁺NKRP-1⁺ cells and found them to express CD11a, CD11b, CD172a (SIRP α) and HIS48 (a rat marker usually associated with granulocytes (18)). Two subpopulations expressing high and intermediate levels of CD11a were observed. However, this variation in CD11a expression might have been induced by the isolation procedure (23). These cells additionally expressed class I (OX18) but not class II (OX6) or CD103 (OX62). Twenty-two percent of them expressed CD4 and less than 10% expressed CD8 (Figure 1B). None expressed CD40, CD90, CD25, CD62L or HIS24 (data not shown). The absence of class II expression was confirmed by the fact that depletion of class II-positive cells using magnetic beads did not restore the alloreactivity of blood cells from the tolerant recipients (data not shown). After sorting by flow cytometry based on the CD6⁻CD80/86⁺NKRP-1⁺ phenotype, the cells were found to adhere to plastic culture plates during overnight culture (data not shown). They presented a homogenous myeloid-like morphology with a large, irregularly-

shaped nucleus and a large cytoplasm containing inclusions (Figure 1Ci). These cells were also found to express iNOS (Figure 1Cii).

Suppression assays.

Since depletion of non-T CD80/86⁺ cells from the blood of tolerant recipients restored the hyporesponsiveness of PBMC against alloantigens, we measured their suppressive activity after sorting. In mixed lymphocyte reactions these cells showed a robust dose-dependant suppressive activity on the proliferation of T cells stimulated by donor-derived APC (Figure 2A, dotted bars). Moreover, these cells suppressed the proliferation of anti-CD3 + anti-CD28 stimulated T cells (Figure 2B, white bars). As a control, non-T CD80/86-negative cells from the blood of the same animals displayed no suppressive activity (Figure 2B, black bars). The suppression was maximal 2 and 3 days after initiation of the culture and partial after 4 days (Figure 2C). Cells with similar suppressive activity could also be isolated from the blood of control recipients of syngeneic grafts or of naïve animals, although in the latter case fewer cells could be collected (see further below for details). The suppressive cells isolated from control-transplant recipient or from tolerant animals had the same suppressive activity on a per cell basis (Figure 2A, dashed and dotted bars, respectively). Cells with a phenotype comparable with the one observed in the blood (i.e. corresponding to the phenotype described in Figure 1B), could also be detected in the spleen, lymph nodes and bone marrow. These cells isolated from the bone marrow of tolerant recipients dose-dependently inhibited T cell activation down to a 1:10 ratio, as did similar cells from the blood. No such suppressive activity, however, could be measured after sorting from the spleen or lymph nodes (Figure 2D).

Accumulation of MDSC in tolerant kidney graft recipients and function of MDSC in vivo.

Given that MDSC from control and tolerant recipients had a similar suppressive activity on a per cell basis in the suppression assay (Figure 2 A and B), we hypothesized that they might work in vivo as a result of their accumulation. We therefore compared the number of MDSC in the blood of tolerant allograft recipients to age-matched, syngeneic recipients, and found a significant twofold accumulation in tolerant recipients (Figure 2E). This increase in blood MDSC was not due to the tolerance induction regimen itself since the administration of anti-CD28 antibodies to naïve, non transplant animals failed to result in their accumulation (data not shown).

To challenge the role of MDSC in vivo, we first tried to transfer tolerance with MDSC. However, the transfer of 2×10^6 MDSC isolated from the blood or the bone marrow did not significantly prolong kidney allograft survival (after the transfer of 2×10^6 MDSC in 3 recipients, kidney grafts survived 12, 14 and 16 days instead of 11 in untreated recipients). Transfers repeated on days 0, 3 and 6 were not more efficient. In addition, the transfer of unsorted blood cells (25×10^6 cells) or spleen cells (200×10^6 cells) had no effect on allograft survival. However, using a previously described GVHD-like system where CFSE-labeled T cells are infused into irradiated allogenic recipients (21), we observed that co-injection of MDSC prevented the proliferation of allogenic T cells in vivo (Figure 2F).

Mechanisms of action.

In the rat, high levels of NKRP-1 expression are characteristic of natural killer cells. Since NKRP-1 was expressed on non-T CD80/86⁺ cells, we tested whether direct cytotoxicity could be responsible for their suppressive action. Using target YAC-1 cells, we observed an absence of cytotoxic activity whereas control cells with the non-T CD80/86-negative NKRP-1⁺ phenotype induced up to 60% cytotoxicity (data not shown), presumably because this cell population contained NKRP-1^{high} NK cells. Therefore, direct NK-like cytotoxicity is not

involved in the suppressive mechanism of the non-T CD80/86⁺ NKRP-1⁺ cells. Since nitric oxide is known to be involved in several mechanisms of immunosuppression and since we detected iNOS expression by immunohistology (Figure 1C, *ii*), we next asked whether this enzyme also plays a role here. In suppression assays, a selective inhibitor of iNOS, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, used at 5 mM) was able to reverse the suppression mediated by non-T CD80/86⁺NKRP-1⁺ cells (Figure 3A). The finding that CD11b/c⁺ cells suppress T cells via NO revealed that these cells had a phenotype and mechanism of action compatible with the definition of myeloid derived suppressor cells (MDSC), as defined by Gabrilovitch et al (12). Therefore, from hereon in, the non-T CD80/86⁺ NKRP-1⁺ cells will be referred to as MDSC. We also noted that 1-Methyl-DL-tryptophan (1-MT, used at 200 μM), an inhibitor of indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO), as well as Tin protoporphyrin (SnPP, used at 50 μM), an inhibitor of HO-1, were both unable to block the suppressive activity of MDSC against stimulated T lymphocytes (Figure 3A). Since iNOS was implicated in the suppression by MDSC, we further tested the level of iNOS expression by western blot. iNOS was not expressed by freshly isolated blood MDSC and resting and activated T cells expressed no or very little iNOS. Moreover, iNOS was not expressed when MDSC were mixed with resting T cells. In contrast, after contact between activated T cells and MDSC, iNOS was strongly upregulated (Figure 3B, left section). Similar experiments were performed using MDSC from the spleen and lymph nodes (cells that share a comparable phenotype were isolated from these compartments). In this case, however, no iNOS upregulation was observed in any of the conditions tested (data not shown).

To determine whether cell contact between MDSC and target T cells was required for suppression, we performed transwell assays. Stimulated LEW.1A T cells were placed in the lower chamber with MDSC isolated from LEW.1A tolerant kidney graft recipients in the upper chamber of the transwell. The physical separation abrogated the suppression, revealing

a contact-dependant inhibition of the proliferative response (Figure 4). Moreover, the physical separation from MDSC reduced the suppression even when the MDSC were mixed with other activated T cells, suggesting that activated T cells must be in contact with MDSC not only to elicit suppression but also to become sensitive to suppression (Figure 4, lower bar). With the aim of identifying molecular interactions between MDSC and activated T cells that might be required for suppression, we tested several antagonistic antibodies in the suppression assays. However, no modification of suppression could be obtained with antibodies against CD80, CD86, CD80 + CD86 (tested at 10 $\mu\text{g/ml}$ and at 50 $\mu\text{g/ml}$), Class I, Class II, CD11b/c, $\text{IFN}\gamma$, CD172a, CD40, IL-4 or IL-10 (tested at 10 $\mu\text{g/ml}$; data not shown). To further understand how MDSC and NO blocked T cell proliferation, we analyzed their possible pro-apoptotic effect. Proliferation and apoptosis were measured using double-staining with CFSE and Annexin V after 2 days of culture. As shown in Figure 5Ai, CFSE-labeled T cells proliferated after polyclonal stimulation and 40 % of them were apoptotic. In the presence of MDSC, proliferation was minimal and 76.2 % of the cells were found to be apoptotic. Thus, MDSC seem to affect the viability of stimulated T cells by blocking their proliferation and by inducing apoptosis in a contact-dependent manner. In similar assays, we also noticed that despite inhibiting T cell proliferation, MDSC only moderately prevented T cell activation after polyclonal stimulation, since about 60 % of them expressed CD25 and the majority had lost their expression of CD62L (Figure 5Aii, iii).

Differential effect on Teff and Treg

According to the CFSE dilution assays after polyclonal activation, although MDSC blocked the proliferation of the majority of CD25^+ T cells, a subpopulation of $\text{CD25}^{\text{high}}$ T cells escaped suppression (Figure 5Aii, arrow), suggesting that CD25^+ Tregs might not be sensitive to MDSC. To directly measure this effect, we sorted $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ effector and $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$

regulatory cells (93 % of the CD4⁺CD25^{high} cells expressed FoxP3 in this assay) and tested the action of MDSC on the proliferation of these cell subpopulations. Effector T cells proliferated strongly after 3 days and their proliferation could be fully inhibited by MDSC. In contrast, MDSC inhibited the proliferation of CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ Tregs by 50% only (Figure 5B). The cytokines secreted by these two T cell populations were also differentially affected by MDSC: stimulated CD4⁺CD25⁻ effector T cells produced less IFN γ in the presence of MDSC, an observation compatible with the inhibition of their proliferation. In contrast IL-2 production by stimulated effector T cells was not abolished by MDSC but rather enhanced (Figure 5Ci). Again, this is compatible with the idea that T cell proliferation, but not activation, is blocked by MDSC (IL-2 would therefore be released and, since not consumed by T cells, accumulate in the medium). As previously described (24), stimulated CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ Tregs produced very low quantities of IL-2 and produced some IFN γ that was enhanced by the addition of MDSC (Figure 5Cii).

Graft infiltration and expression of iNOS

By immunohistology, we found CD11b⁺ cells in the glomeruli of control and tolerated grafts (Figure 6A *a* and *b*). In the parenchyma, CD11b⁺ cells (Figure 6A *b*) synthesizing iNOS were found only in tolerant allografts (Figure 6A *e*, *d* and *f*). At higher magnification, CD11b⁺ HIS48⁺ iNOS⁺ cells could be detected in the parenchyma and associated with the blood vessel walls (Figure 6A *b*, *c-f*). Moreover, a quantitative analysis of messenger RNA for iNOS revealed a significantly higher expression in tolerated grafts than in syngeneic grafts (Figure 6B). Also, more iNOS mRNA was visible in the blood of tolerant recipients (Figure 6B).

Role of MDSC in transplant tolerance

Since the tolerated kidney grafts were infiltrated with CD11b cells expressing iNOS (Figure 6A) and accumulated more iNOS mRNA (Figure 6B), it is likely that in tolerant recipients, MDSC accumulate and localize in the graft. In order to challenge the hypothesis that tolerance was achieved as a result of the activity of the iNOS enzyme, we tested the effect of injection of aminoguanidine, an inhibitor of iNOS, on tolerance 120 days after kidney transplantation. The results showed that tolerant recipients rejected their graft within an average of 10 days after aminoguanidine injection (100 mg/kg i.p. twice daily; Figure 7). A pathological examination of these grafts revealed that acute, cellular-mediated rejection was the origin of the graft failure. These data demonstrate that the maintenance phase of tolerance in this model requires an active synthesis of NO.

Discussion.

Herein, we show that the rat model of anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance triggers the accumulation of plastic-adherent CD11b⁺ myeloid cells expressing CD80/86 that can be defined as MDSC. In vitro, these cells induced a contact-dependent apoptosis of activated effector T cells that themselves triggered the expression of iNOS by MDSC. MDSC had a limited effect on the proliferation of CD4⁺ CD25^{high}FoxP3⁺ Tregs that failed to induce iNOS in MDSC. The action of NO production was critical to the immunosuppression mediated by MDSC and in maintaining the tolerant state in vivo.

It has become clear that transplant tolerance uses multiple cellular mechanisms that cooperate to suppress immunity, involving several types of regulatory T cells and tolerogenic DCs. Cooperation between different cell types might even be required to establish infectious tolerance to kidney allografts (5). In these situations, it is thought that CD152 upregulated on Tregs interacts with CD80 on tolerogenic DCs in an antigen-cognate manner. On the one hand, this interaction results in the maintenance of Treg suppressive activity and on the other hand promotes a CD80-dependent (and IFN γ -dependent) upregulation of IDO, an enzyme that degrades the essential amino acid tryptophan (6). Tryptophan metabolites then suppress T cell responses as well as T cell clonal expansion. In vivo, CTLA-4/CD80 (and/or CD86) interactions have been shown to be required for tolerance after heart allotransplantation in mice (25), as well as IDO activity after heart allotransplantation in the rat (3). Tumors can also modulate immune responses by triggering an immune tolerance. In the latter case, although IDO induced by the action of local Tregs contributes to tumor-induced tolerance (26), the accumulation of MDSC appears to be a dominant mechanism in rodents as well as in man (10). The mechanism of action of MDSC typically involves the synthesis of NO (13)

and/or the action of arginase I (27). In addition, previous studies have suggested that mice Gr-1⁺ CD11b⁺ MDSC express CD80 and suppress immune responses to tumors by promoting IDO upregulation after engagement of CTLA-4 expressed by infiltrating activated or regulatory T cells (16). Here we show that the MDSC that accumulate in kidney allograft tolerance also express CD80. However, in our hands, CD80-CD152 interactions were not essential factors for MDSC function in vitro, since anti-CD80 antibodies had no effect on the system. Nevertheless, the removal of CD80⁺ cells as well as CD86⁺ cells from the MLRs restored proliferation, suggesting that MDSC do express both markers. In addition, MDSC-mediated suppression in vitro was IDO independent, since it was not reversed by the IDO inhibitor 1-MT. As a comparison, 1-MT was shown to reverse the suppression driven by tolerogenic DC and by CD11b⁻ monocytes (4), that are different from the MDSC described here, in the same rat strain combination (5). Instead, in vitro, we found that the immunosuppressive activity of rat MDSC was solely controlled by NO. The fact that iNOS was detectable in isolated MDSC as well as in graft infiltrating cells reinforces this idea. In vivo, the fact that injection of the iNOS inhibitor aminoguanidine induced the rejection of otherwise tolerated allografts also showed that the maintenance of the tolerant state was under the control of NO and not of IDO. In other tolerance models in the same rat strain combination, however, inducing rejection of tolerated allografts necessitated the administration of both IDO and iNOS inhibitors (28), indicating the possible co-existence of two mechanisms that cooperate to maintain transplant tolerance. Therefore, our data point towards a functional difference between mouse Gr-1⁺CD11b⁺ MDSC that mediate suppression via NO and possibly IDO, and the rat MDSC described here that appear not to use the IDO pathway.

In mice, MDSC function is also dependent on IFN γ (29). In our rat system in vitro, we did not find a critical role for this factor, since anti-IFN γ antibodies failed to modify the suppression of MDSC on anti-CD3 + anti-CD28-activated T lymphocytes. Since SIRP α is an inhibitory receptor that modulates macrophage and DC function (30) and since it was expressed by rat MDSC, it was possible that SIRP α /CD47 interactions reinforced the suppressive activity of MDSC. However the suppression by MDSC was not reduced by anti-SIRP α antibodies either. Preventing CD40/CD40L molecular interactions or the action of IL-4 and IL-10 cytokines was also inefficient. Thus, the interactions required for MDSC function in the rat require further exploration.

Our investigations suggest that the MDSC-mediated suppression lacks antigen specificity, since they could regulate the proliferation of 3rd-party APC-stimulated T cells as well as the proliferation of anti-CD3 + anti-CD28 stimulated T cells. In addition, MHC II expression was not detected by flow cytometry and depleting Class II⁺ cells from the blood did not prevent T cell unresponsiveness in the MLRs. Thus, it appears that MDSC do not interact with CD4⁺ T cells in a cognate manner. Therefore, the capacity of MDSC to generate suppressive signals when encountering activated T cells most likely serves to regulate immune responses during times of heightened immune activity, without antigen specificity. In transplantation, MDSC might have a regulatory function, in cooperation with other, antigen-specific, regulatory cells. Here, the observation that inhibition of iNOS in vivo induced rejection suggests that NO-based suppression mechanisms are not dispensable.

An important issue was the location in vivo where a contact could occur between T eff and blood MDSC. We detected MDSC in the blood of tolerant recipients of kidney allografts. In the spleen and lymph nodes, cells were identified that had a comparable phenotype but were

devoid of ex-vivo suppressive activity. By immunohistology, infiltrating cells expressing CD11b, HIS48 and iNOS markers could be detected in tolerated allografts, in the parenchyma as well as associated with blood vessel walls (CD80 and CD86 could not be detected by immunohistology in the rat species since the antibodies do not bind to fixed tissues). Although we were unable to prove that these cells have a suppressive activity *in situ*, this phenotype is compatible with the presence of MDSC within the graft. In addition, messenger RNA for iNOS was found to be accumulated 4-fold in tolerated kidneys. It is therefore possible that blood MDSC suppress T cells inside the graft. This mechanism of action would then be similar to tumor-infiltrating MDSC. In this kidney transplant model, however, tolerance is clearly associated with the control, and not the elimination, of alloreactive T cells, since they can be detected in the periphery several months after transplantation. Indeed, the simple removal of MDSC in vitro from blood cells collected on day 100 was sufficient to lift the suppression of lymphocyte alloreactivity, indicating that the antigen-specific lymphocytes had not been deleted in tolerant recipients. We have previously reported that donor-specific alloreactive T lymphocytes in the blood of tolerant recipients of kidney allografts expressed high rates of activation and apoptotic markers (4). This suggested that alloreactive T cells were continuously produced, presumably as a result of a thymic output, and kept under control by contact with MDSC, which as a result induced apoptosis not only in the graft but also in the blood. Here we confirmed in vitro that reactive T cells express activation markers (express CD25 and loose CD62L) and undergo apoptosis at a high rate in the presence of MDSC.

The question remains as to what extent MDSC participate to tolerance induction or maintenance in vivo. Although the direct evaluation of their role would be provided by an adoptive transfer of MDSC, correlated with tolerance, none of our trials including transfer of

spleen cells, blood cells, blood MDSC, and BM MDSC could induce tolerance. Instead we found a slight, non significant delay in the occurrence of rejection after transfer of blood or blood-derived MDSC. One reason might be that MDSC lose their suppressive activity after transfer, possibly as a result of differentiation. Another might be that NO could play a role in the maintenance phase but not in the induction phase of the tolerance that might be under the control of other mechanisms such as IDO, as previously shown in transplantation trials in the same rat strain combination (3, 28).

A challenging observation was that MDSC were also present in recipients of isografts as well as in naïve animals. MDSC from control animals appeared to have a similar activity to those from tolerant recipients on a per cell basis. Therefore, the only difference was the increase in numbers of these cells in tolerant recipients. These features characterize MDSC as natural modulators of immune reactivity, mobilized by tumors, but also by tolerated allografts, to establish or reinforce tolerance. This view is strengthened by the recent observation that genetic inactivation of CD11b abolishes oral tolerance without compromising APC maturation or antigen-specific immune activation (31), establishing a specific role of CD11b⁺ cells in oral tolerance induction.

A novel finding was that MDSC do express iNOS upon contact with activated T cells, but not upon contact with activated Treg. Moreover, MDSC block the expansion of effector T cells and to a lesser extent, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs. The fact that MDSC spare Tregs directly reinforces the suggestion by Yang et al (16) that MDSC might mediate suppression at least in part via Tregs. However, in our study MDSC suppressed the proliferation of stimulated CD4⁺CD25⁻ T lymphocytes to the same extent as unsorted T cells, clearly showing that the

presence of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs is not required, at least in vitro, for MDSC-mediated suppression.

In summary, our studies show a significant accumulation of MDSC in a rat model of kidney transplant tolerance. These cells have a non-specific immunosuppressive activity in vivo and in vitro, involving the action of iNOS, which is upregulated after contact with activated Teff but not with Treg cells. These data illustrate a novel immunoregulatory mechanism associated with transplant tolerance.

Acknowledgements

The authors are grateful to S. Brouard , R. Josien and J. Ashton-Chess for critically reading the manuscript and thank P. Hulin and the INSERM-IFR26 confocal microscopy platform.

References

1. Pirenne, J., H. Kitade, M. Kawai, T. Koshiba, B. Van Damme, C. Mathieu, and M. Waer. 2005. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 79:S25-27.
2. Chiffoleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 2002. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant* 2:745-757.
3. Guillonnet, C., M. Hill, F. X. Hubert, E. Chiffoleau, C. Herve, X. L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Menoret, A. Saoudi, B. Le Mauff, R. Josien, M. C. Cuturi, and I. Anegon. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:1096-1106.
4. Haspot, F., C. Seveno, A. S. Dugast, F. Coulon, K. Renaudin, C. Usal, M. Hill, I. Anegon, M. Heslan, R. Josien, S. Brouard, J. P. Soulillou, and B. Vanhove. 2005. Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR Class II B7 Regulatory Cells. *Am J Transplant* 5:2339-2348.
5. Degauque, N., D. Lair, A. Dupont, A. Moreau, G. Roussey, F. Moizant, F. X. Hubert, C. Louvet, M. Hill, F. Haspot, R. Josien, C. Usal, B. Vanhove, J. P. Soulillou, and S. Brouard. 2006. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells. *J Immunol* 176:3915-3922.
6. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4:762-774.
7. Chauveau, C., S. Remy, P. J. Royer, M. Hill, S. Tanguy-Royer, F. X. Hubert, L. Tesson, R. Brion, G. Beriou, M. Gregoire, R. Josien, M. C. Cuturi, and I. Anegon. 2005. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106:1694-1702.
8. Tzachanis, D., A. Berezovskaya, L. M. Nadler, and V. A. Boussiotis. 2002. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* 99:1465-1473.
9. Seino, K. I., K. Fukao, K. Muramoto, K. Yanagisawa, Y. Takada, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, K. Takeda, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Bashuda, H. Yagita, and K. Okumura. 2001. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2577-2581.
10. Serafini, P., C. De Santo, I. Marigo, S. Cingarlini, L. Dolcetti, G. Gallina, P. Zanovello, and V. Bronte. 2004. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 53:64-72.
11. Bobe, P., K. Benihoud, D. Grandjon, P. Opolon, L. L. Pritchard, and R. Huchet. 1999. Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction. *Blood* 94:1028-1037.
12. Gabrilovich, D. I., V. Bronte, S. H. Chen, M. P. Colombo, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, and H. Schreiber. 2007. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67:425; author reply 426.
13. Mazzoni, A., V. Bronte, A. Visintin, J. H. Spitzer, E. Apolloni, P. Serafini, P. Zanovello, and D. M. Segal. 2002. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* 168:689-695.

14. Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt, and U. R. Kees. 1998. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 160:5729-5734.
15. Brito, C., M. Naviliat, A. C. Tiscornia, F. Vuillier, G. Gualco, G. Dighiero, R. Radi, and A. M. Cayota. 1999. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* 162:3356-3366.
16. Yang, R., Z. Cai, Y. Zhang, W. H. t. Yutzy, K. F. Roby, and R. B. Roden. 2006. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res* 66:6807-6815.
17. Garrity, T., R. Pandit, M. A. Wright, J. Benefield, S. Keni, and M. R. Young. 1997. Increased presence of CD34+ cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and their differentiation into dendritic cells. *Int J Cancer* 73:663-669.
18. Prins, R. M., G. P. Scott, R. E. Merchant, and M. R. Graf. 2002. Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma. II. Expansion of myeloid suppressor cells that promote tumor progression. *Cancer Immunol Immunother* 51:190-199.
19. Soulillou, J. P., C. B. Carpenter, A. J. d'Apice, and T. B. Strom. 1976. The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J Exp Med* 143:405-421.
20. Dengler, T. J., G. Szabo, B. Sido, W. Nottmeyer, R. Zimmerman, C. F. Vahl, T. Hunig, and S. C. Meuer. 1999. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 67:392-398.
21. Haspot, F., F. Villemain, G. Laflamme, F. Coulon, D. Olive, J. Tiollier, J. P. Soulillou, and B. Vanhove. 2002. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 99:2228-2234.
22. Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan, and R. Josien. 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169:2284-2291.
23. Stent, G., L. Irving, S. Lewin, and S. M. Crowe. 1995. The kinetics of surface expression of CD11/CD18 integrins and CD54 on monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol* 100:366-376.
24. Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172:6519-6523.
25. Tsai, M. K., H. N. Ho, H. F. Chien, P. Ou-Yang, C. J. Lee, and P. H. Lee. 2004. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 77:48-54.
26. Munn, D. H., and A. L. Mellor. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 117:1147-1154.
27. Bronte, V., P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, V. Tosello, A. Mazzoni, D. M. Segal, C. Staib, M. Lowel, G. Sutter, M. P. Colombo, and P. Zanovello. 2003. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 170:270-278.
28. Guillot, C., S. Menoret, C. Guillonnet, C. Braudeau, M. G. Castro, P. Lowenstein, and I. Anegon. 2003. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 101:3325-3333.

29. Kusmartsev, S. A., Y. Li, and S. H. Chen. 2000. Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J Immunol* 165:779-785.
30. Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol* 167:2547-2554.
31. Ehrchiou, D., Y. Xiong, G. Xu, W. Chen, Y. Shi, and L. Zhang. 2007. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *J Exp Med*. 204:1519-24.
32. Taylor, S. R., D. R. Alexander, J. C. Cooper, C. F. Higgins, and J. I. Elliott. 2007. Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7. *J Immunol* 178:3474-3482.

Figure legends

Figure 1 **Characterization of non-T regulatory cells present in peripheral blood.** A: *Expression of CD80 and CD86.* PBMC of the LEW.1A haplotype from syngeneic kidney graft recipients (white bars) or from tolerant kidney allograft recipients (3 months post transplantation; black bars) were depleted of CD6 (pan-T marker)-negative/CD80⁺ cells, CD6⁻-negative/CD86⁺ cells or unmodified, and stimulated with allogeneic LEW.1W APCs. ³H-thymidine incorporation was measured after 5 days. B: *Phenotype analysis.* PBMC from tolerant kidney allograft recipients (3 months post transplantation) were analyzed by flow cytometry. Cells were gated on CD6⁻ NKRP-1⁺ CD80/86⁺ and analyzed for the indicated markers. The percentages of cells expressing each marker are indicated. Ci, May-Grünwald Giemsa staining on cytopspins of CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ cells sorted from PBMC from tolerant kidney allograft recipients (magnification: X63). Cii, Immunofluorescence analysis of iNOS expressed by CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ cells sorted from PBMC from tolerant kidney allograft recipients (magnification: X40).

Figure 2 **Suppressive activity of CD6⁻ NKRP-1⁺ CD80/86⁺ MDSC.** A: *Suppression of mixed lymphocyte reactions.* Purified LEW.1A T cells were stimulated with allogeneic LEW.1W APCs in the presence of the indicated ratios of effector (“E”) CD6⁻ NKRP-1⁺ CD80/86⁺ cells from the blood of tolerant allograft recipients or of recipients of syngeneic grafts. Shown are mean ± SD of triplicate wells from one representative experiment out of 6. B: *Suppression of polyclonal stimulation.* Purified LEW.1A T cells (10⁵ cells/well) were stimulated with anti-CD3/CD28 in the presence of the indicated ratios of blood CD6⁻ NKRP-1⁺ CD80/86⁺ cells or in the presence of control blood CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁻ cells, from tolerant allograft recipients. ³H-thymidine incorporation was measured after 3 days. Shown are mean ± SD of triplicate wells from one representative experiment out of 10. C: *Time-*

course of suppression. Same experiment as in B, performed at an effector:target ratio of 1:4, where ^3H -thymidine incorporation was measured after 2, 3 and 4 days. D: *Immune compartments containing suppressive cells.* Purified T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs in the presence of $\text{CD6}^- \text{NKRP-1}^+ \text{CD80/86}^+$ cells ($2 \cdot 10^4$) sorted from blood, bone marrow, spleen and lymph nodes. ^3H -thymidine incorporation was measured after 3 days. E: *Accumulation of MDSC in the blood of tolerant recipients.* Blood samples collected on heparin were cleared of erythrocytes by hypotonic lysis and stained with CD6-FITC, NKR-P1 Alexa fluor 647, CD80-PE and CD86-PECy7. Total numbers of $\text{CD6}^- \text{NKRP1}^+ \text{CD80/86}^+$ MDSC was evaluated in tolerant kidney allograft recipients (*black bar, n=5*) and in age-matched syngeneic kidney graft recipients (*white bar, n=5*), 100 days post-transplantation. Results are expressed as mean cell number/ml blood \pm SD. *, $p < 0.05$. Similar results were found in two other evaluations performed up to day 250 post transplantation. F: *In vivo inhibition of alloreactive T cell proliferation.* CFSE-labeled spleen cells (150×10^6) were injected i.v. into irradiated allogenic rat recipients. Half of the recipients additionally received 8×10^6 MDSC purified from blood. After 2.5 days, the relative abundance of $\text{CFSE}^{\text{high}}$ and CFSE^{low} T cells was measured in the spleen by flow cytometry. Dotted histogram: controls. Empty histogram: co-injection of MDSC (one figure representative of two independent experiments).

Figure 3 Mechanisms of action of $\text{CD6}^- \text{NKRP-1}^+ \text{CD80/86}^+$ MDSC. A: *Role of iNOS in the suppression.* T cells from naïve animals were stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies in the presence of a 1:3 effector-target ratio of control $\text{CD6}^- \text{NKRP-1}^+ \text{CD80/86}^-$ cells or $\text{CD6}^- \text{NKRP-1}^+ \text{CD80/86}^+$ MDSC extracted from the blood of tolerant kidney graft recipients, added to inhibit proliferation. Enzyme inhibitors were added to the cultures (L-NMMA: iNOS inhibitor, SnPP: HO-1 inhibitor, 1-MT: IDO inhibitor). Proliferation was measured after 3

days by ^3H -thymidine incorporation. Data are mean CPM \pm SD of one representative experiment out of 3. B: *Western blot analysis of iNOS expression.* Cells were cultured as in A for 2 days. Ten μg of whole protein from the indicated cultures were resolved on a 7.5% SDS-PAGE containing 10mM DTT and blotted onto nitrocellulose filters. Membranes were hybridized with anti-iNOS and Actin antibodies plus secondary antibody and revealed by chemiluminescence.

Figure 4 MDSC act in a contact-dependant manner. Transwell chambers were used to prevent direct cell contact between anti-CD3/CD28 stimulated T cells (6×10^5 cells from naive animals) and MDSC or control CD6 $^-$ CD80/86 $^-$ cells (1.5×10^5 cells from the blood of tolerant kidney graft recipients). Proliferation was assessed in the lower chamber by ^3H -thymidine incorporation after 3 days of culture. Data are mean cpm \pm SD of triplicate wells in two independent experiments.

Figure 5 Effector function of MDSC. A: *MDSC block proliferation but only moderately block activation of T lymphocytes.* After coculture of anti-CD3/CD28 stimulated CFSE-labeled T cells with blood MDSC or control cells (CD6 $^-$ CD80/86 $^-$) for 2 days, DAPI-negative cells were stained with Annexin V (i), APC-conjugated CD25 (ii, arrow pointed on CD25 high cells) or APC-conjugated CD62L (iii) and analyzed by flow cytometry. In these analyses, a threshold for CFSE fluorescence was set at a value of 100 to exclude CFSE-negative cells from the evaluation. B: *Differential effect of MDSC on regulatory versus effector T cell proliferation.* Spleen T cells were sorted into Tregs and Teff cells according to their CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$ (these cells were mostly FoxP3-positive) or CD4 $^+$ CD25 $^-$ (FoxP3-negative) phenotypes. Each population was stimulated with anti-CD3/CD28 and cultured with or without MDSC (ratio of 5 target cells for 1 MDSC) for 3 days. Proliferation was measured

after 3 days by incorporation of ^3H -thymidine. Results are means \pm SD of triplicate wells and representative of two experiments. *C, Differential effect of MDSC on cytokine synthesis by regulatory versus effector T cells.* Same experiment as in B, where supernatants were collected after 48h. (i) $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ effector T cells. (ii) $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ regulatory T cells. $\text{IFN}\gamma$ and IL-2 production was measured by ELISA. Results are means of triplicate measurements \pm SD from one experiment representative of four.

Figure 6 Graft infiltration and expression of iNOS.

A: Immunohistological analysis of kidney grafts. Syngeneic grafts (a) and tolerated allografts (b) stained with CD11b (red fluorescence) and HIS 48 (green fluorescence) antibodies. Magnification x 10. The arrows indicate blood vessel sections. c-f: tolerated kidney allograft, at a magnification of 40, focused on a blood vessel section, stained for HIS48 (c, green fluorescence), iNOS (d, blue fluorescence), CD11b (e, red fluorescence) and merged staining (f). *B: Assessment of iNOS mRNA.* The level of iNOS mRNA was analyzed by quantitative PCR in kidney grafts and blood from syngeneic or tolerant recipients, 100 days after transplantation. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Figure 7 iNOS inhibition in vivo brakes tolerance. Four tolerant kidney allograft recipients (> 120 days post transplantation) received i.p. injections of 30 mg/kg of the iNOS inhibitor aminoguanidine (AG) every 12h. Recipient survival is represented. Control rats also received aminoguanidine and kidney function was recorded twice a week for 20 days. In these controls, kidney function was unmodified (uremia of 4 mmol/L and creatininemia of 18 $\mu\text{mol/L}$).

Figure 1

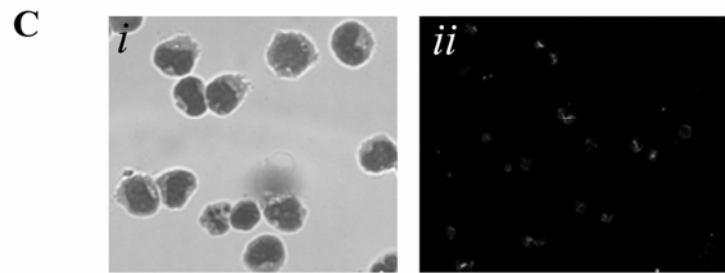
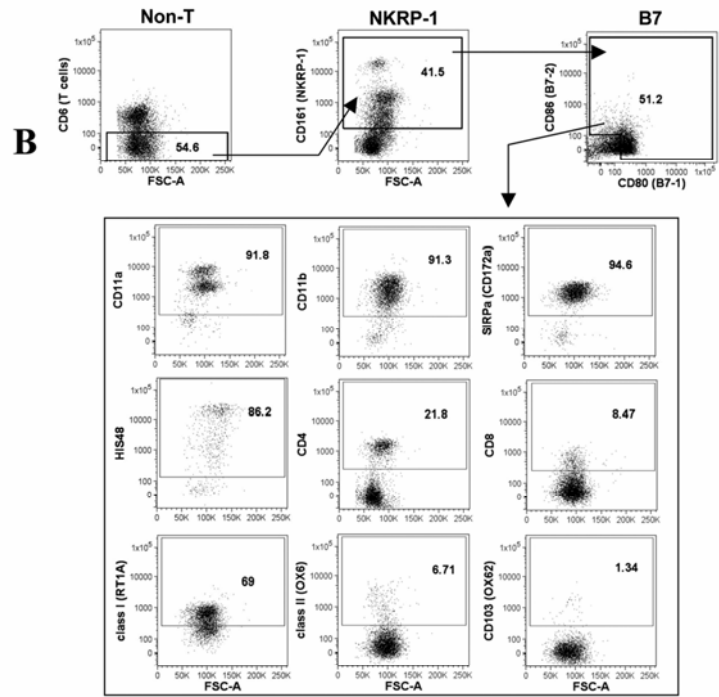
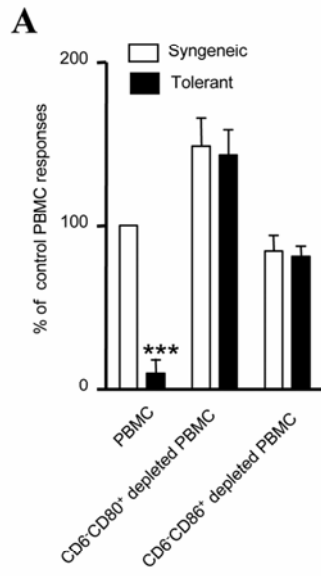


Figure 2

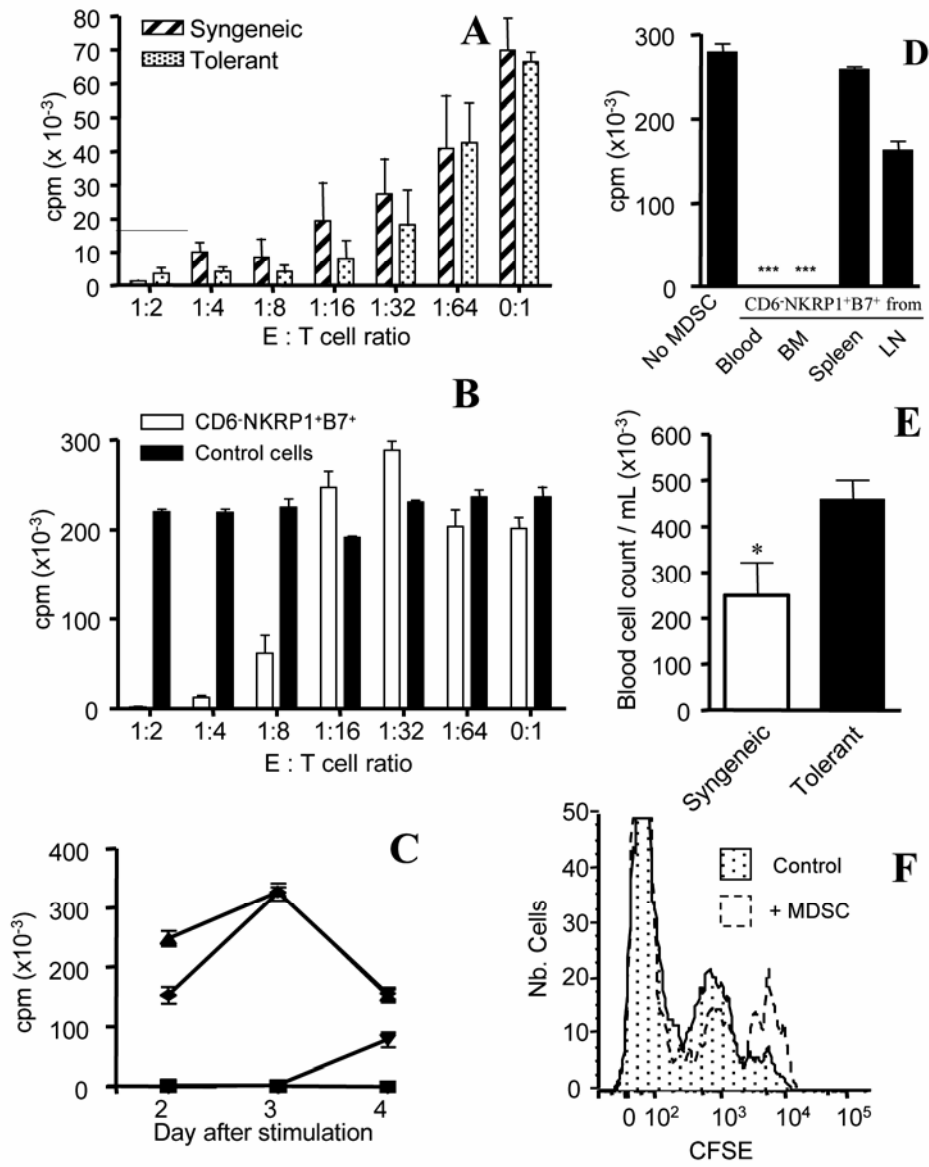


Figure 4

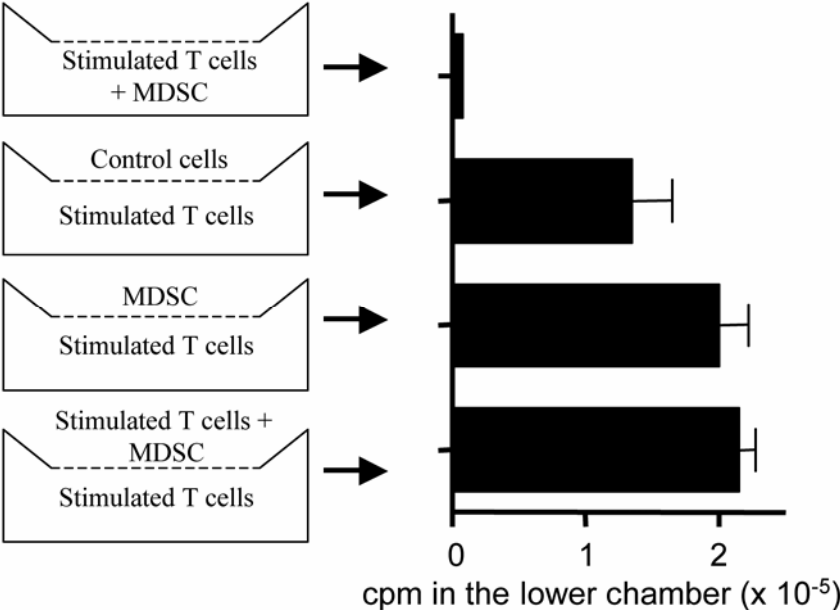


Figure 5

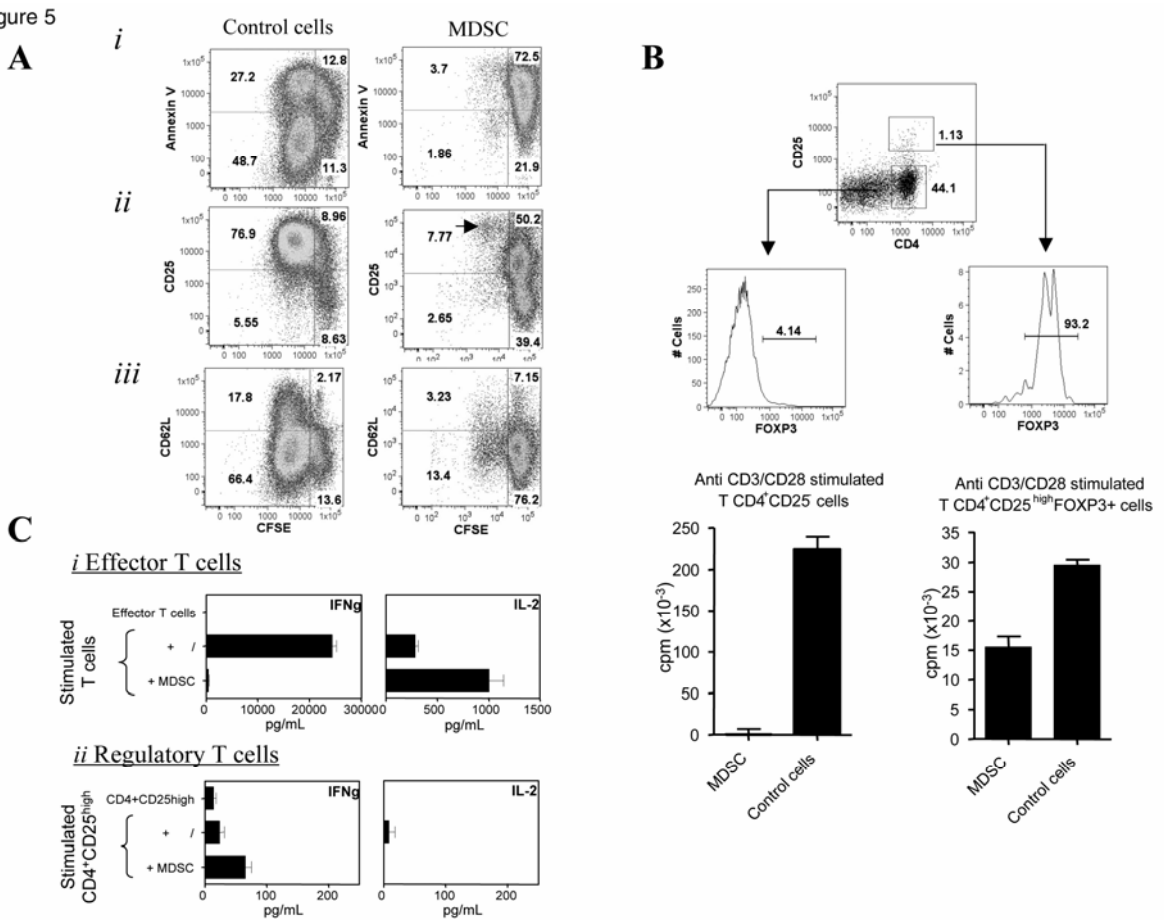
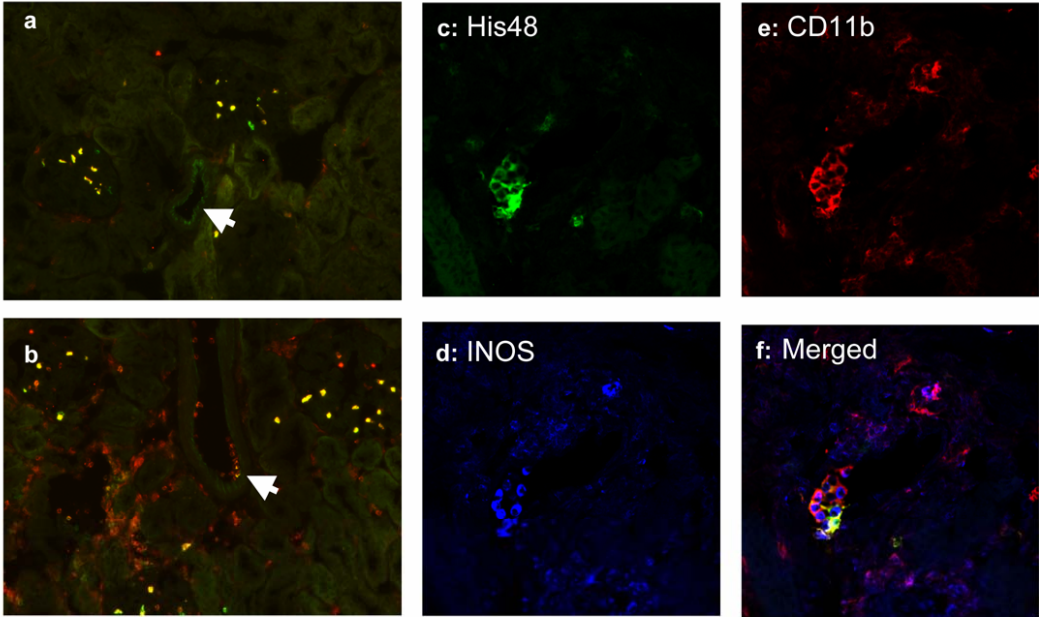


Figure 6

A



B

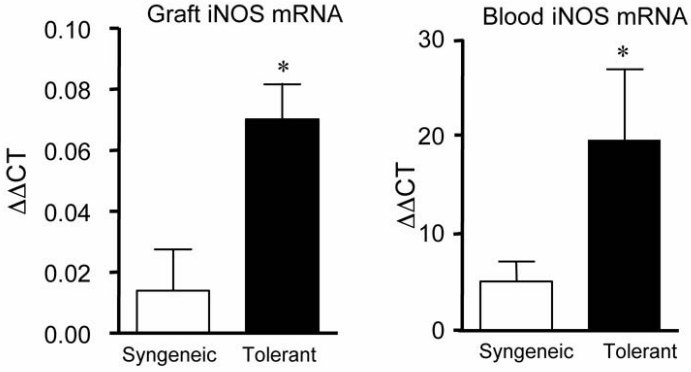
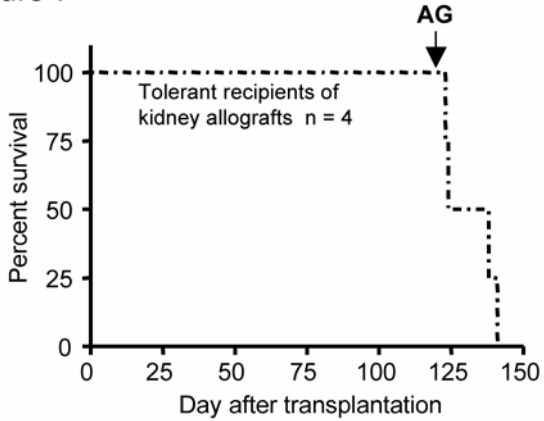
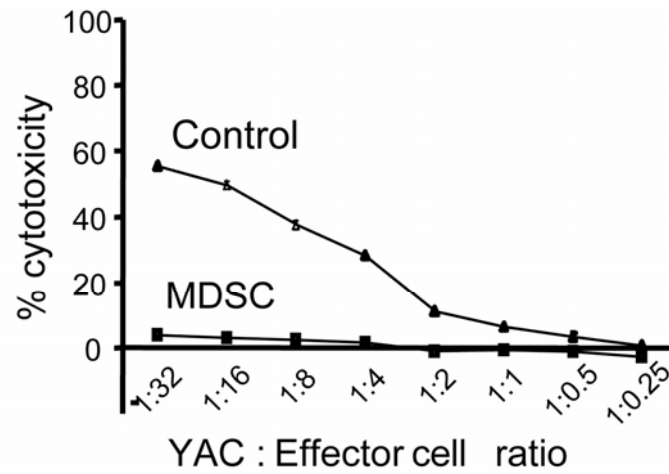


Figure 7



Dugast et al, Supplemental data: absence of cytotoxicity of MDSC



Supplemental data (not shown in the manuscript) MDSC have no cytotoxic activity. CD6- NKRP-1+ CD80/86+ MDSC or control cells (CD6-NKRP-1+ B7- cells) sorted from tolerant allograft recipients were mixed with ⁵¹Cr-labeled YAC-1 target cells at the indicated ratio. Released ⁵¹Cr was measured in the supernatant after 4h. Mean triplicates ± SD of one experiment out of two are shown.

IV-2- Perspectives et discussions

Dans cet article, nous avons démontré que l'augmentation d'une population de cellules suppressives myéloïdes (MDSC) adhérentes chez des rats tolérants une allogreffe rénale, suite au blocage spécifique de la molécule CD28, inhibe la prolifération de lymphocytes T par un mécanisme dépendant du monoxyde d'azote (NO) *in vivo*.

Etant donné que le blocage spécifique de CD28 permet de maintenir l'interaction CTLA-4/B7, favorisant le développement de cellules T régulatrices (Tsai, Ho et al. 2004), nous avons voulu étudier les effets du blocage spécifique de CD28 sur le rejet d'allogreffe et l'induction de la tolérance en transplantation. Parmi l'ensemble des anticorps anti-CD28 de rat décrits dans la littérature, le clone JJ319, anticorps anti-CD28 antagoniste, permet l'internalisation de CD28 à la surface de la membrane cellulaire *in vivo* (Haspot, Villemain et al. 2002). Même si lors du processus de modulation du CD28, le JJ319 peut activer les lymphocytes T de façon transitoire, il a été montré bloquer efficacement le CD28 puisqu'il inhibe la réponse alloréactive des cellules T stimulées par des CPA allogéniques. En transplantation, le JJ319 empêche le développement de la vasculopathie dans un modèle de rejet chronique de greffe de rein chez le rat (Laskowski, Pratschke et al. 2002) et retarde le rejet sans induire de tolérance suite à une allogreffe cardiaque (Dengler, Szabo et al. 1999). Mon équipe s'est intéressée au blocage spécifique de la molécule CD28 dans un modèle de greffe de rein d'un rat LEW.1W à un rat LEW.1A. Huit jours de traitement par l'anticorps anti-CD28 administré en I.P. (intrapéritonéal) permettent au receveur de développer une tolérance sans signes histologiques de rejet chronique. Au bout de 7 jours, une néphrectomie contralatérale est réalisée et la survie de l'animal dépend de l'acceptation du greffon. En absence de traitement par l'anti-CD28, la fonction rénale n'est plus suffisante pour assurer la vie de l'animal greffé après une période de 11 jours, soit 5 jours après la néphrectomie.

Lors de ma thèse, nous avons voulu étudier les mécanismes régulateurs mis en place par le système immunitaire dans un modèle de tolérance à l'allogreffe de rein induit par l'anticorps anti-CD28. Nous avons précédemment montré que ce modèle d'induction entraîne la survie de 60 % des greffons rénaux allogéniques et l'analyse des mécanismes régulateurs du compartiment sanguin de ces animaux révèle la présence d'une population de cellules

régulatrices non-T exprimant les molécules B7 et NKRP-1 responsables de l'inhibition de cellules T alloréactives (Haspot, Seveno et al. 2005).

Dans l'article I, nous avons montré que la tolérance induite à une allogreffe rénale par un anticorps anti-CD28 chez le rat est aussi en corrélation avec une accumulation de cellules myéloïdes CD11b⁺ exprimant les marqueurs B7-1 et B7-2. Ces cellules ont une fonction différente de celle de la population décrite dans l'article précédent (Haspot, Seveno et al. 2005), et sont capables d'inhiber la réponse allogénique de lymphocytes T en MLR (**Figure 2A**) ou suite à une stimulation polyclonale anti-CD3/CD28 (**Figure 2B**). L'étude *in vitro* de la cinétique d'inhibition de la réponse allogénique par les MDSC du compartiment sanguin d'animaux naïfs ou tolérants, démontre une suppression maximale à J3 de co-culture (**Figure 2C**). L'analyse de ces cellules non-T B7⁺, nous a conduit à étudier plus précisément leur phénotype et à les caractériser comme étant des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (**Figure 1B**). En effet, ces cellules, analysées par FACS dans une population de cellules CD6⁻ (non-T), NKRP-1⁺ et B7⁺, n'expriment pas de CMH de classe II et sont fortement HIS48 et CD172a (des marqueurs de cellules myéloïdes).

De nos jours, différents mécanismes de régulation impliquant les molécules B7 sont décrits. L'interaction de CTLA-4, exprimé par les cellules T régulatrices, avec B7-1, des cellules dendritiques tolérogènes, permet d'une part le maintien de l'activité suppressive des cellules T régulatrices et, d'autre part, favorise la sécrétion d'IDO par les cellules dendritiques favorisant la dégradation du tryptophane en métabolites et supprimant ainsi l'activation lymphocytaire T (Mellor and Munn 2004). *In vivo*, l'interaction CTLA-4/B7 est nécessaire à l'induction de la tolérance par des cellules T régulatrices dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris (Tsai, Ho et al. 2004) et via IDO chez le rat (Guillonéau, Hill et al. 2007). Bien que dans notre modèle de tolérance à l'allogreffe rénale, les MDSC expriment B7, leur interaction avec CTLA-4 ne semble pas nécessaire à leur activité régulatrice puisque ni les anticorps anti-B7-1, ni les anticorps anti-B7-2 ou la combinaison des deux ne permet de restaurer la prolifération des lymphocytes T activées par une stimulation anti-CD3/CD28. L'utilisation d'un inhibiteur d'IDO, le 1-MT, ne modifie pas non plus la suppression occasionnée par les MDSC confirmant l'absence de nécessité d'une interaction CTLA-4/B7 (**Figure 3A**). Cependant, nous avons démontré dans notre modèle, qu'un inhibiteur du monoxyde d'azote (NO), le LNMMA, utilisé seul, est capable de restaurer la prolifération des lymphocytes T (**Figure 3A**). La production de NO par les MDSC a été confirmée par des marquages immunohistologiques de cellules isolées et par immunofluorescence dans les reins

greffés d'animaux tolérants (**Figure 1C**). Le NO semble donc être un facteur soluble indispensable au pouvoir régulateur des MDSC, à la différence du mécanisme d'induction de tolérance récemment décrit dans un modèle d'allogreffe cardiaque et nécessitant la combinaison deIDO et de NO (Hill, Zagani et al. 2007). Ces éléments suggèrent que plusieurs mécanismes de régulation peuvent coexister afin de permettre le maintien de la tolérance en transplantation.

En cancérologie, l'accumulation intratumorale des MDSC constitue un mécanisme néfaste majeur chez les rongeurs et chez l'homme, dans la mesure où elle permet aux tumeurs d'échapper à la destruction par les lymphocytes T (Serafini, De Santo et al. 2004). A l'inverse, l'accumulation des MDSC serait bénéfique en transplantation et empêcherait le développement du rejet de greffe. Lors de notre étude, nous avons démontré une augmentation du nombre absolu de cellules non-T NKR $P-1^+$ B7 $^+$ chez les animaux tolérants en comparaison aux animaux syngéniques, non-traités, utilisés comme contrôle 100 jours après la transplantation (**Figure 2E**). Dans le but d'analyser si le traitement d'induction à la tolérance par l'anti-CD28 joue un rôle dans l'accumulation des MDSC chez les animaux tolérants, nous avons effectué une cinétique de comptage des MDSC chez des animaux naïfs ayant reçu exactement le même traitement d'induction que les tolérants (**Figure 18**).

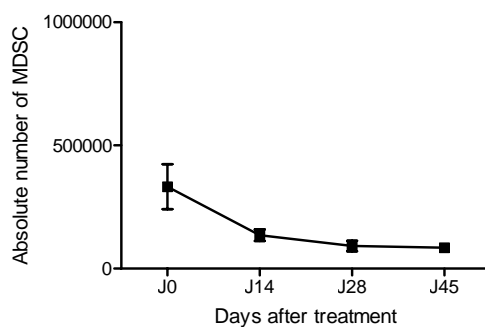


Figure 18 Des rats LEW.1A sont traités de J0 à J7 avec 4mg/kg d'anti-CD28 (JJ319). Les MDSC sont alors quantifiées dans le sang de ces animaux à différents temps.

Aucune accumulation de MDSC n'a pu être détectée chez ces animaux dont la valeur est même inférieure à celle trouvée chez les animaux syngéniques. L'inflammation engendrée suite à une greffe favoriserait donc l'accumulation des MDSC mais leur développement n'apparaît pas être sous le contrôle du blocage de la molécule CD28 uniquement.

Pour identifier les molécules responsables de l'interaction entre MDSC et lymphocytes T, nous avons testé l'effet de plusieurs anticorps bloquant : anti-classe I, anti-SIRP α , anti-CD40 ou anti-B7. Aucun de ces anticorps n'a modifié la suppression. Cependant, les tests de

Transwell réalisés démontrent qu'un contact membranaire, en plus d'un facteur soluble, est indispensable à l'activité suppressive des MDSC. En effet, placés dans la chambre supérieure du Transwell, lymphocytes T et MDSC entre en contact et produisent un facteur soluble, qui, seul, est incapable d'inhiber la prolifération de lymphocytes T placés dans la chambre inférieure (**Figure 4**).

Nous avons voulu identifier la localisation des MDSC ainsi que l'endroit exact de la rencontre entre lymphocytes T activés et MDSC. De plus, nous avons voulu déterminer si des cellules des autres compartiments tels que la rate, la moelle osseuse ou les ganglions mésentériques, avec le même phénotype que les MDSC extraites du compartiment sanguin, présentaient les mêmes propriétés régulatrices. Ces résultats montrent que seules les cellules non-T NKRP-1⁺ B7⁺ définies comme de véritables MDSC, issues des compartiments de la moelle osseuse et du sang, sont capables de supprimer la réponse proliférative de lymphocytes T stimulés. En revanche, des cellules de même phénotype extraites de la rate ou des ganglions mésentériques ne présentent pas de pouvoir régulateur *in vitro* dans la mesure où elles ne bloquent pas la réponse allogénique (**Figure 2D**). Par une analyse en Western Blot, nous avons démontré que iNOS est induit *in vitro* lorsque les MDSC du sang sont cultivées en présence de cellules T activées, alors que cette enzyme n'est pas induite lorsque des cellules de même phénotype extraites de la rate ou des ganglions mésentériques sont utilisées (**Figure 19**). Ces résultats confirment donc l'absence d'activité régulatrice de cellules avec un phénotype comparable aux MDSC du sang dans des compartiments tels que la rate ou les ganglions mésentériques.

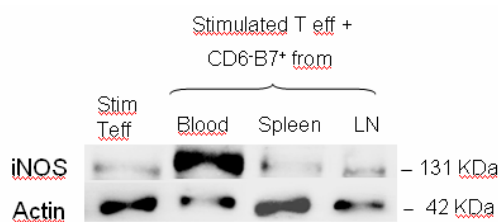


Figure 19 L'expression de la protéine iNOS a été analysée en Western Blot suite à la culture de lymphocytes T stimulés anti-CD3/CD28 en présence de MDSC de différentes origines.

Dans le but de déterminer la présence et la localisation des MDSC dans le greffon des animaux tolérants, nous avons réalisé des immunofluorescences en triple marquage CD11b, HIS48, iNOS en comparaison à des reins d'animaux syngéniques. Ainsi des cellules CD11b HIS48 et iNOS peuvent être détectées chez les animaux tolérants dans le parenchyme et dans les vaisseaux contrairement à la situation contrôle. En effet, dans les vaisseaux sanguins, elles paraissent « tapisser » les cellules endothéliales au niveau de la lumière des vaisseaux (**Figure**

6A). Une hypothèse, qui demande confirmation, peut dès lors être émise: les lymphocytes T alloréactifs activés des animaux tolérants seraient bloqués par la régulation locale occasionnée par les MDSC lors de leur migration transendothéliale au niveau du greffon. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence que les cellules identifiées en immunofluorescence sont capables de supprimer la prolifération de lymphocytes T même si le phénotype de ces cellules est compatible avec la présence de MDSC au sein du greffon. Les analyses effectuées en TaqMan montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm d'iNOS dans le sang et le greffon des animaux tolérants, confirmant les résultats obtenus par immunofluorescence et suggérant que les MDSC du sang contrôlent les lymphocytes T au sein du greffon (**Figure 6B**).

Lors du mécanisme de suppression, les MDSC semblent contrôler et non pas éliminer les lymphocytes T puisque suite à la déplétion des MDSC *in vitro* à partir de sang total, les lymphocytes T sont toujours capables de répondre à une stimulation allogénique (**Figure 1A**). En effet, l'analyse de l'apoptose, de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T stimulés et cultivés pendant 2 jours avec des MDSC par FACS montre que les MDSC bloquent la prolifération des cellules T mais pas leur activation. De plus, l'augmentation de l'expression de l'annexine V montre que les MDSC favorisent l'apoptose des lymphocytes T suggérant un certain renouvellement des lymphocytes T qui sont sous le contrôle des MDSC dans le sang ou la moelle osseuse (**Figure 5A**).

Alors que l'équipe chinoise dirigé par Roden montre que, dans un modèle de tumeur chez la souris, les MDSC déclenchent leur pouvoir régulateur suite à l'interaction de B7-1 avec le CTLA-4 des cellules T régulatrices (Yang, Cai et al. 2006), nous avons pu montrer dans notre modèle, que les cellules T régulatrices n'ont pas la capacité d'activer les MDSC et que l'expression du B7 n'a aucun rôle. En effet, alors que dans notre étude, les MDSC bloquent totalement la prolifération des cellules T stimulées, elles semblent très peu bloquer la prolifération de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (**Figure 5B**). L'analyse de l'activité suppressive des MDSC dans ces différentes conditions est confirmée par Western Blot via l'expression de la protéine iNOS. En effet, alors que l'interaction entre cellules T régulatrices CD4⁺CD25^{high} et MDSC ne permet pas de détecter la protéine iNOS en Western Blot, l'interaction entre lymphocytes T effecteurs et MDSC permet la production efficace d'iNOS (**Figure 4B**). Par l'intermédiaire de ces résultats, nous avons démontré que ce sont les MDSC qui produisent iNOS après leur contact avec les cellules T effectrices dans la mesure

où seuls, les MDSC comme les lymphocytes T au repos ou après leur stimulation ne sont pas capables de produire iNOS.

La production des cytokines sécrétées par ces deux populations de lymphocytes T est différemment modifiée suite à leur contact avec les MDSC. En effet, lors de l'interaction des cellules T effectrices activées avec les MDSC, on peut observer une diminution de la production d'IFN γ en corrélation avec l'inhibition de la prolifération. Cependant, la production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ est augmentée par les MDSC. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'IL-2 sécrétée par les cellules T activées reste dans le milieu de culture et n'est pas consommée du fait de l'inhibition de la prolifération en présence de MDSC (**Figure 5C**). En ce qui concerne les taux de cytokines produites par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25^{high} en présence de MDSC, on a démontré une très faible production d'IL-2 et une augmentation de la sécrétion d'IFN γ (**Figure 5C**).

Afin d'établir une relation entre MDSC et tolérance *in vivo*, nous avons testé le transfert adoptif de MDSC à des rats recevant une allogreffe rénale. Ni le transfert de cellules totales du sang, de cellules non-T du sang ou de cellules non-T B7⁺ du sang ou de la moelle osseuse ne nous a permis d'induire la tolérance ni même de prolonger la survie à l'allogreffe rénale. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : le phénotype immature des MDSC peut être modifié *in vivo* et ces cellules peuvent devenir des cellules dendritiques matures capables d'activer efficacement la réponse immune. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'analyser par FACS le phénotype des MDSC plusieurs jours après leur injection *in vivo* en utilisant des marqueurs de maturation tels que le CMH de classe II, le CD40 ou CD103. De plus, on peut penser que le nombre de cellules injectées est trop faible pour permettre d'avoir un effet *in vivo*. L'irradiation des receveurs la veille de la greffe et du transfert, de même que le transfert répété de MDSC à J0, J3, J4 et J7 à partir du jour de la greffe, ne modifie pas l'incidence du rejet (**Tableau 4**).

| Cells transferred | Day of transfer | Number of cells | Survival (days) |
|-------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| / | N.A. | / | 11 ±0.5 (n>10) |
| Splenocytes | 0 | 200x10 ⁶ | 10, 11, 13, 14 |
| Total blood | 0 | 25x10 ⁶ | 11, 12 |
| Non-T from blood | 0 | 15x10 ⁶ | 11, 12 |
| MDSC from blood | 0 | 2x10 ⁶ | 12, 14 |
| MDSC from BM | 0 | 6x10 ⁶ | 14, 16 |
| MDSC from blood | 0+3+4+7 | 10 ⁶ | 7, 11 |

Tableau 4 Résumé des différents types de transferts effectués après une allogreffe de rein chez le rat.

Etant donné que nous n'avons pas réussi à démontrer le pouvoir régulateur des MDSC *in vivo* par la méthode de transfert, nous avons utilisé un modèle de GVHD (Haspot, Villemain et al. 2002). En effet, ce système permet de suivre, par FACS, la prolifération de lymphocytes T allogéniques marquées au CFSE, suite au co-transfert de MDSC dans des rats LEW.1W irradiés. Ces résultats démontrent ainsi *in vivo* l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T allogéniques en présence de MDSC (**Figure 2F**).

Enfin, dans le but d'analyser l'effet des MDSC sur le maintien et non pas son rôle dans l'induction de la tolérance à une allogreffe rénale chez le rat, nous avons testé l'utilisation d'un inhibiteur de NO *in vivo*, l'aminoguanidine, injecté deux fois par jour à 100 mg/kg à des rats tolérants de plus de 100 jours (**Figure 7**). Le rejet de greffe apparaît en moins de 10 jours suggérant que la phase de maintien de la tolérance dans ce modèle d'allogreffe rénale chez le rat nécessite la synthèse active de NO.

Une autre expérimentation possible serait d'inhiber la réponse allogénique initiale à l'aide d'agent immunosuppresseurs comme la rapamycine et de co-injecter des MDSC plus tardivement. L'induction d'un état de tolérance ou une prolongation de survie à l'allogreffe rénale suite à l'arrêt des immunosuppresseurs permettrait d'identifier un rôle régulateur de la réponse immune par les MDSC *in vivo*.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence pour la première fois le rôle des MDSC en transplantation. Cependant, davantage d'expérimentations seraient nécessaires pour approfondir le mécanisme d'action de ces cellules. En effet, il serait intéressant d'identifier le type d'interaction existant entre lymphocytes T effecteurs activées et MDSC pour permettre la

production de NO en comparaison avec le type d'interaction existant entre lymphocytes T régulateurs et MDSC. D'après certaines études réalisées en cancérologie, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les MDSC se traduit par la perte de la chaîne CD3 ζ du TCR (Otsuji, Kimura et al. 1996; Ezernitchi, Vaknin et al. 2006) de façon dépendante du métabolisme de la L-arginine (Rodriguez, Zea et al. 2002; Rodriguez, Quiceno et al. 2007). Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de la chaîne CD3 ζ suite au contact entre lymphocytes T et MDSC ainsi que l'expression de l'arginase I dans ce contexte. Enfin, l'étude de l'interaction des MDSC avec les cellules endothéliales du greffon suite à leur localisation au niveau des vaisseaux permettrait l'identification de nouveaux mécanismes de régulation.

V- Article 2

Etude de la surexpression de DKK-3 dans la tolérance à l'allogreffe rénale induite par un anticorps anti-CD28 chez le rat

Résultats encore non publiés

V-1- Introduction : La voie Wnt

V-1-1- Identification

L'existence de molécules de signalisation jouant un rôle dans le développement et permettant le contrôle d'événements clés de l'embryogénèse a été mise en évidence. Depuis les 20 à 30 dernières années, plusieurs familles de molécules de ce type ont été identifiées et leur mécanismes d'action élucidés. Ainsi, la voie Wnt qui contrôle une variété de processus biologiques incluant l'embryogénèse, la migration, la polarisation et la différenciation cellulaire est particulièrement bien conservée dans tout le règne animal (Cadigan and Nusse 1997). Le gène Wnt a été identifié en premier lieu en tant que gène impliqué dans la morphogénèse chez la drosophile. En effet, la signalisation wingless joue un rôle prépondérant au cours du développement de l'aile de la drosophile. Les molécules Wnts constituent une famille de plus de 19 glycoprotéines sécrétées chez l'homme, utilisées par les cellules pendant le développement pour influencer le devenir ou le comportement de cellules avoisinantes (Cadigan and Nusse 1997; Wodarz and Nusse 1998; Logan and Nusse 2004).

Des études génétiques et moléculaires ont permis d'identifier l'ensemble des molécules impliquées dans la cascade de signalisation de Wnt et en particulier, les récepteurs des protéines WNT, des protéines transmembranaires de la famille Frizzled (Fz) (Bhanot, Brink et al. 1996), la β -caténine, une molécule multifonctionnelle capable de contrôler à la fois l'adhésion cellulaire (Tickenbrock, Schwable et al. 2006) et de participer à la transmission du signal, ainsi que de multiples régulateurs négatifs de la voie tels que GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), l'APC (adenomatosis polyposis coli) ou l'axine.

V-1-2- Cascade de signalisation de Wnt

En se liant à Fz (Brown and Moon 1998; Mikels and Nusse 2006) qui forme un hétérodimère avec les co-récepteurs LRP5 ou LRP6 (Lipoprotein receptor related-protein coreceptors) (Brennan, Gonzalez-Sancho et al. 2004), Wnt peut activer 4 voies de signalisation majeures: la voie canonique dépendante de la β -caténine et la voie non-canonique indépendante de la β -caténine (Du, Purcell et al. 1995) (Shimizu, Julius et al. 1997) (Kuhl, Sheldahl et al. 2000)

mais aussi une voie non-canonique, la PCP (planar cell polarity) guidant les mouvements cellulaires (Mlodzik 2002) ainsi qu'une voie impliquant la protéine kinase A et jouant un rôle dans la myogénèse (Chen, Ginty et al. 2005).

Lors de la voie canonique, la protéine WNT se fixe sur son récepteur frizzled qui se charge de transmettre le message dans le cytoplasme via une kinase appelée dishevelled. La molécule Dishevelled (Dsh) bloque l'activation de la GSK-3 (Papkoff, Rubinfeld et al. 1996; Papkoff 1997; Young, Kitamura et al. 1998) empêchant ainsi la phosphorylation de la β -caténine (He, Semenov et al. 2004). Accumulée dans le cytoplasme, la β -caténine entre alors dans le noyau pour se lier aux facteurs LEF-1 (Lymphoid Enhancer Factor) / TCF (T-cell factor) (Eastman and Grosschedl 1999) où elle agit comme facteur de transcription nécessaire à la synthèse de gènes cibles (Willert and Nusse 1998; Omer, Miller et al. 1999; Steel, Puddicombe et al. 2005) tels que c-myc impliqué dans la prolifération cellulaire (Cadoret, Ovejero et al. 2001), la cycline D1 ou la cyclooxygénase 2 (COX-2) (**Figure 20A**). En absence de WNT, Dsh ne peut plus bloquer l'action de la GSK-3. Dans ce cas, la β -caténine intracellulaire est phosphorylée par le complexe multiprotéique contenant la GSK-3, l'APC et l'axine (Ikeda, Kishida et al. 1998) auquel elle s'associe pour être rapidement dégradée par le protéasome (Nusse 2005). Dans le noyau, en absence de β -caténine, les membres de la famille des TCF (T-cell factor) bloquent la transcription des gènes cibles de la voie Wnt (**Figure 20B**).

Contrairement à la voie canonique, la voie non-canonique est calcium-dépendante et nécessite l'activation de petites protéines G permettant l'activation de la phospholipase C et la transcription de gènes contrôlés par le facteur de transcription NFATc1. En effet, lors de la voie non-canonique, la protéine WNT se fixe sur son récepteur Frizzled, favorise le relargage du calcium intracellulaire via l'activation de petites protéines G et induit l'activation de PKC (protéine kinase C) et de PLC (phospholipase C). Les taux élevés de Ca^{2+} activent la phosphatase calcineurine qui déphosphoryle le facteur de transcription NFAT et permet son accumulation dans le noyau induisant la transcription de gènes cibles de la voie tels que c-myc ou MMP7 (Jovanovic, Dugast et al. 2008). Elle permet également de réguler l'adhésion et la motilité cellulaire (Kuhl, Sheldahl et al. 2000).

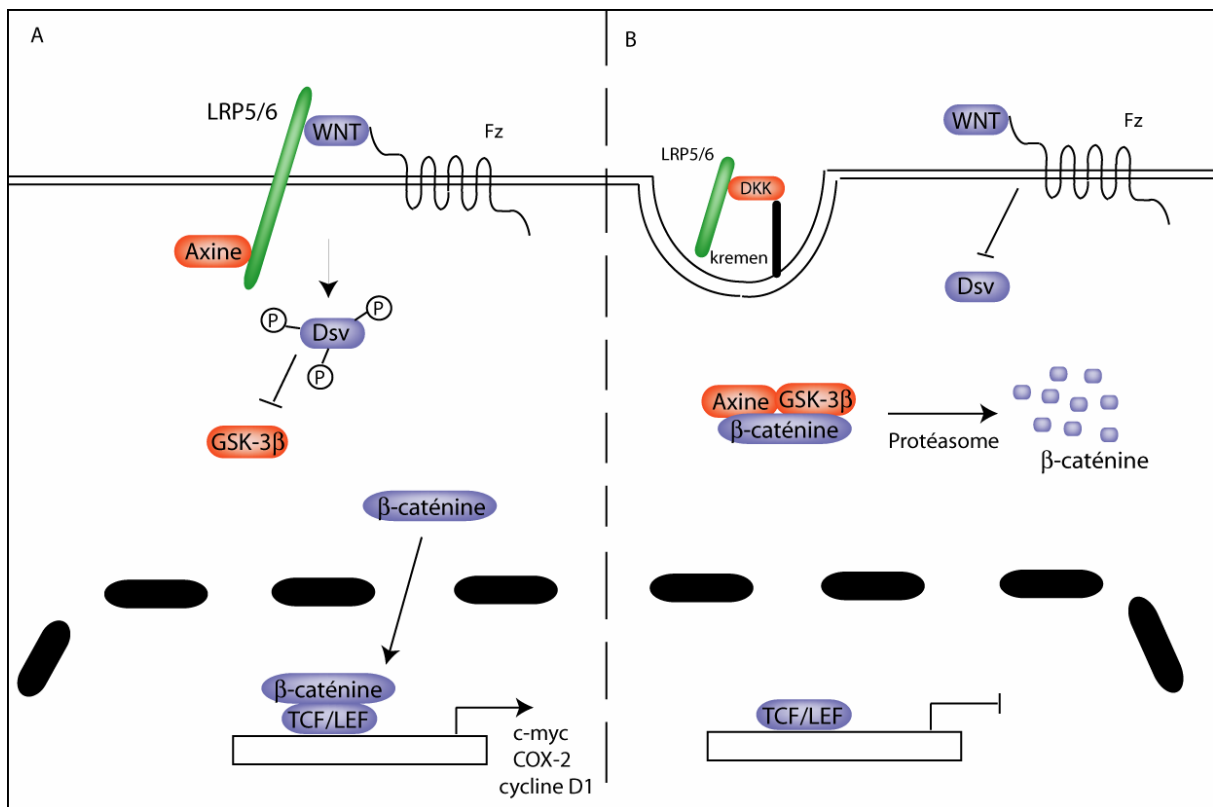


Figure 20 Cascade de signalisation de la voie canonique de Wnt

A, Activation de la voie Wnt. La protéine WNT se fixe sur son récepteur Frizzled et son co-récepteur LRP5/6 afin de transmettre le message par l'activation de la kinase Dishevelled. Dsh bloque l'activation de la GSK-3 empêchant la phosphorylation de la β -caténine qui peut alors entrer dans le noyau et se lier à TCF/LEF pour activer la transcription de gènes cibles tels que c-myc, COX-2 ou cycline D1. B, Inhibition de la voie Wnt. La molécule DKK se fixe à LRP5/6 empêchant sa liaison avec WNT. Dsh, inactive, ne bloque plus l'action de la GSK-3 qui forme un complexe avec l'axine et la β -caténine pour phosphoryler la β -caténine et permettre sa dégradation par le protéasome. En absence de la β -caténine, les facteurs de transcription TCF/LEF du noyau, bloquent l'activation de la transcription.

V-1-3- Rôle de la voie Wnt

Quelques études ont montré l'implication de la voie Wnt dans le contrôle et le maintien de cellules souches adultes (Baba, Yokota et al. 2006). De plus, une activation inappropriée de cette cascade de signalisation conduit au développement de cancers (Polakis 2000) (van Es, Barker et al. 2003) (Gregorieff and Clevers 2005) (Korinek, Barker et al. 1997) (Morin, Sparks et al. 1997) (van de Wetering, Sancho et al. 2002) (Logan and Nusse 2004). Cependant, son implication dans la tolérance en transplantation est encore inconnue malgré quelques observations suggérant son rôle dans l'immunité. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Wnt a permis de démontrer que celle-ci était essentielle au développement des lymphocytes T dans le thymus (Staal and Clevers 2003; Weerkamp, Baert et al. 2006). Davantage d'études ont montré que Wnt était en effet impliquée dans la différenciation des thymocytes en cellules double positives (Gounari, Aifantis et al. 2001), dans leur survie (Ioannidis, Beermann et al. 2001) ainsi que dans la génération de thymocytes T CD8⁺ (Mulroy, Xu et al. 2003). Une étude a pu mettre en évidence que l'expression de la β -caténine permettait la régulation du nombre de thymocytes matures CD8 simple positifs (Yu and Sen 2007) et la régulation de l'expression du CD4 dans les cellules double positives (Huang, Xie et al. 2006). Suite à la rencontre d'un antigène, les lymphocytes T CD8⁺ diminuent l'expression des isoformes inhibiteurs des facteurs de transcription LEF/TCF-1 et favorisent ainsi l'activation de la cascade de signalisation de Wnt (Willinger, Freeman et al. 2006). Les lymphocytes T de souris chimériques, portant une forme constitutivement active de la GSK-3 exprimée par un vecteur rétroviral, réduisent leur prolifération et leur production d'IL-2, suggérant un rôle négatif de GSK-3 dans la régulation de la réponse cellulaire (Ohteki, Parsons et al. 2000). Récemment, une étude a permis de montrer que GSK-3 était un facteur proapoptotique jouant un rôle décisif dans l'élimination des lymphocytes T après leur activation (Sengupta, Jayaraman et al. 2007) alors que la β -caténine et TCF augmentaient l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-x_L (Ioannidis, Beermann et al. 2001), régulant la survie des thymocytes. De plus, la molécule GSK-3, régulateur intracellulaire de la voie Wnt, semble contrôler les propriétés proinflammatoires des cellules dendritiques (Rodionova, Conzelmann et al. 2007). D'autres observations ont montré que suite à la stimulation par un superantigène, les cellules T anergiques présentent une inhibition de leur voie Wnt (Kurella, Yaciuk et al. 2005).

V-1-4- Les molécules antagonistes de Wnt

Cinq familles de molécules extracellulaires antagonistes de Wnt sont aujourd'hui connues (Kawano and Kypta 2003) : les sFRP (secreted frizzled-related protein), Wif1 (Wnt inhibitory factor 1), *xenopus cerberus*, *wise* et la famille des molécules dickkopf (Dkk). Les molécules Dkk sont des molécules sécrétées connues pour contrôler la cascade de signalisation Wnt/ β -caténine. Quatre membres de la famille Dkk ont été identifiées : DKK-1 à 4. L'utilisation d'anticorps anti-Dkk-1 chez des embryons de *Xenopus* ou l'étude de souris KO pour Dkk-1 montre un rôle essentiel de cette molécule dans la formation de la tête chez les vertébrés (Glinka, Wu et al. 1998) (Mukhopadhyay, Shtrom et al. 2001). En se liant à Lrp5/Lrp6 et leur corécepteur Kremen (Mao, Wu et al. 2002), DKK-1 (de la même façon que DKK-4) internalise le complexe ternaire empêchant l'association de WNT avec son corécepteur LRP et bloquant ainsi l'activation de la voie Wnt (Bafico, Liu et al. 2001) (Mao, Wu et al. 2001) (Semenov, Tamai et al. 2001). En réponse à des signaux de stress, Dkk-1 bloque l'activation de la voie Wnt en favorisant l'activation de la molécule c-jun *in vivo* (Grotewold and Ruther 2002). DKK-2, quant à lui, peut agir aussi bien en tant qu'agoniste qu'en tant qu'antagoniste de Lrp6 en fonction du type cellulaire dans lequel il est exprimé. Des souris KO pour Dkk-2 montrent un défaut dans la différenciation des ostéoblastes et dans la minéralisation osseuse (Li, Liu et al. 2005). En ce qui concerne la molécule Dkk-3, elle semble intervenir dans la formation de l'axe dorsal chez le Xénope et dans la formation du mésoderme. Elle apparaît être un inhibiteur de l'interaction Wnt7aA/LRP6 dans des cellules PC12 (Caricasole, Ferraro et al. 2003). De même, la réduction du taux de β -caténine cytoplasmique mesurée dans des lignées cellulaires d'ostéocarcinome 2 indique que Dkk-3 inhibe l'activation de la voie Wnt (Hoang, Kubo et al. 2004). DKK-3, aussi connu sous le nom de REIC (Reduced Expression in Immortalized Cells), agit comme une molécule « suppresseur de tumeur » lorsqu'il est surexprimé (Tsuji, Miyazaki et al. 2000) en induisant l'apoptose de cellules tumorales de façon spécifique (Hoang, Kubo et al. 2004; Roman-Gomez, Jimenez-Velasco et al. 2004; Abarzua, Sakaguchi et al. 2007). L'utilisation de siRNA permettant l'extinction de l'expression de DKK-3 dans des lignées de cellules tumorales de poumon est suffisante pour favoriser la prolifération cellulaire, la translocation dans le noyau de la β -caténine et l'expression de c-myc, suggérant que l'inactivation de Dkk-3 favorise l'activation de la voie Wnt et la progression tumorale (Yue, Sun et al. 2008). Cependant, ces observations semblent dépendantes du type cellulaire (Niehrs 2006). En effet, d'autres études ont montré que Dkk-3

pouvait également avoir une action agoniste sur la voie Wnt sans interagir avec les co-récepteurs LRP ou Kremen (Mao, Wu et al. 2002) (Mao, Wu et al. 2001) (Krupnik, Sharp et al. 1999). De plus, Dkk-3 ne semble pas bloquer l'activation des facteurs de transcription Tcf/Lef dans des lignées de cellules cancéreuses de la prostate (Kawano, Kitaoka et al. 2006). Dans des cellules HEK293, Dkk-3 est capable de réduire l'activité des caspases et d'empêcher l'apoptose cellulaire (Nakamura, Hunter et al. 2007). Des études ont montré que DKK-3 jouait un rôle dans la trans-différenciation et la régénération cellulaire et tissulaire du pancréas et du foie (Kano, Ishiyama et al. 2008) (Yang, Li et al. 2002; Yamada, Terada et al. 2005). Dkk-3 semble fortement exprimé dans les cellules endothéliales tumorales et spécifiquement dans les vaisseaux tumoraux indiquant qu'il est un marqueur de l'activation des cellules endothéliales pendant l'angiogénèse. L'utilisation d'un adénovirus surexprimant le gène Dkk-3 ne modifie ni la prolifération cellulaire ni la migration des cellules endothéliales *in vitro* mais favorise la formation des tubes/capillaires (Untergasser, Steurer et al. 2008). Récemment, il a été rapporté que DKK-3 était exprimé pendant le développement embryogénique de certains organes comme l'épithélium neural, le cœur ou les os (Monaghan, Kioschis et al. 1999; Suwa, Chen et al. 2003; Fjeld, Kettunen et al. 2005). Il est aussi exprimé dans des tissus adultes avec des taux élevés dans le cœur et dans le cerveau (Krupnik, Sharp et al. 1999) et dans des cellules beta du pancréas chez l'homme (Hermann, Pirkebner et al. 2007). Le rôle de Dkk-3 dans les réponses immunes est encore peu connu. Des souris KO pour le gène Dkk-3 présentent cependant des taux élevés d'anticorps anti-IgM dans le sang (Barrantes Idel, Montero-Pedrazuela et al. 2006).

Nous avons préalablement démontré que lors d'une allogreffe de rein chez le rat, l'injection de 8 mg, par voie intrapéritonéale, d'un anticorps anti-CD28, le JJ319, induit la survie à long terme du greffon sans aucun développement de rejet chronique (Haspot, Seveno et al. 2005). Lors de notre étude, nous avons analysé le transcriptome des greffons 100 jours après la transplantation chez des rats tolérants en comparaison avec des animaux syngéniques contrôles afin d'explorer les mécanismes responsables de leur état de tolérance. Suite à cette analyse, nous avons été capable d'identifier un ensemble de gènes impliqués dans différentes voies de signalisation et en particulier ceux de la voie Wnt (Wingless Type). Récemment, nous avons montré que MMP-7, un gène contrôlé par la voie non canonique de Wnt, était surexprimé dans les reins tolérants leur greffon suite au traitement par un sérum anti-classe II du donneur le jour de la transplantation (Jovanovic, Lair et al. 2007). Lors de notre étude nous

avons pu observer l'augmentation de l'expression d'un inhibiteur de la voie canonique de Wnt, la molécule Dkk-3.

Etant donné que les réponses immunes périphériques semblent dépendante de la voie Wnt et que DKK-3 peut moduler l'activation de cette voie, le but de mon projet a été d'étudier si l'expression de DKK-3 avait un rôle direct dans la régulation des réponses lymphocytaires T et dans le maintien de la tolérance suite à une allogreffe de rein chez le rat.

V-2- Matériels et méthodes

V-2-1- Induction de tolérance

La greffe hétérotopique de rein de rat LEW.1W est réalisée au laboratoire comme précédemment décrite (Soulillou, Carpenter et al. 1976). L'anticorps anti-CD28, le JJ319, purifié à partir du surnageant d'un hybridome maintenu en culture est administré à des receveurs LEW.1A par une injection intrapéritonéale de 1mg/kg par jour pendant 8 jours à partir du jour de la transplantation. En absence de traitement, les greffons sont rejetés 11 jours après la transplantation. Les greffes syngéniques (LEW.1A sur LEW.1A) sont utilisées comme contrôles.

V-2-2- Préparations des échantillons

Le prélèvement des organes s'effectue au bout de 100 jours et l'ARN total est extrait des échantillons de reins de rats tolérants (n=3) ou syngéniques (n=3) en utilisant la méthode d'extraction au Trizol. Qualité et quantité d'ARN obtenus sont systématiquement déterminés en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop et le bioanalyseur Agilent 2100. Les puces à ADN (Applied Biosystems) sont utilisées pour analyser individuellement le génome d'un rat. Elles contiennent 26 857 sondes d'oligonucléotides de 60 nucléotides ce qui représente 27 088 gènes. 3400 spots utilisés pour contrôle sont présents sur la puce afin de couvrir l'ensemble des variations obtenues suite au processus d'hybridation. Les cRNA marqués à la digoxigénine UTP sont générés et amplifiés à partir de 0.5 µg d'ARN total pour chaque échantillon en utilisant un kit (Applied Biosystems NanoAmp chemiluminescent reverse transcriptase-in vitro transcription (RT-IVT)). L'hybridation est réalisée pendant 16 heures à 55°C. La détection par chemiluminescence, l'acquisition de l'image et l'analyse sont réalisées en utilisant le protocole du fabricant (Applied Biosystems chemiluminescence detection kit, analyzer et version 1.1 analyzer software).

V-2-3- L'analyse des puces à ADN

Les résultats obtenus sont analysés en utilisant le logiciel R (Free software foundation www.r-project.org). Les gènes quant à eux sont identifiés en utilisant le logiciel Panther Protein Classification System Probe ID. Les résultats bruts sont analysés et classés selon la valeur de p et des FC (Fold Changes). Le FC correspond au ratio entre l'intensité du signal du gène obtenu chez des rats tolérants sur l'intensité du signal de ce même gène obtenu chez les rats syngéniques. Le FC est calculé pour chaque gène remplissant les critères de significativité, soit $p < 0.05$ et les informations sont traitées sur le site www.pantherdb.org. Les gènes sont alors classés selon leur voie de signalisation, leur fonction moléculaire et leur processus biologique. Les résultats sont ensuite vérifiés par TaqMan en utilisant les sondes ou les amorces correspondantes.

V-2-4- Clonage de DKK-3 et construction de l'adénovirus

L'ARN a été extrait à partir de cœur de rat selon la méthode d'extraction au Trizol, rétrotranscrit et amplifié en utilisant les amorces suivantes : rDKK-3 Up2 Not 5'-ATA TGC GGC CGC ACA TGC AGT GGC TCC GG-3' et rDKK-3 low Not 5'-ATA TGC GGC CGC CTA AAT CTT CTC TCC ACC T-3'. L'ADNc amplifié codant pour la protéine Dkk-3 (1.1 kb) a été cloné dans un vecteur pSC-A (Stratagène, Amsterdam, Pays-Bas) selon le protocole du fabricant. Le plasmide contenant le produit PCR Dkk-3 est transformé dans des bactéries compétentes *E. coli* TOP10. L'ADN plasmidique des clones positifs est extrait et vérifié par digestion enzymatique. Après séquençage, l'ADN codant pour DKK-3 ressorti du pSC-A par NotI est inséré dans un plasmide pAdénotrackCMV ouvert en NotI et déphosphorylé. Après leur ligation, les plasmides sont transformés dans des bactéries compétentes STBL4. Le plasmide pAdéno-DKK-3 a été testé après transfection en cellules COS par Western Blot. La préparation de l'adénovirus a ensuite été confiée au laboratoire de thérapie génique (Plateforme de production de vecteurs viraux pré-cliniques du CHU de Nantes, Inserm UMR 649) qui nous a fourni une préparation de l'adénovirus DKK-3 produit dans la lignée HEK293 et sous le contrôle du promoteur fort CMV.

V-2-5- Infection cellulaire avec l'adénovirus

Dans le but de mettre au point les conditions optimales pour l'infection de cellules adhérentes capables de sécréter la protéine DKK-3, nous avons testé différentes la multiplicité d'infection avec le vecteur adénoviral (MOI : multiplicity of infection). Pour cela, 500 000 cellules HELA/ puits sont mises en culture dans des plaques 6 puits 24 heures avant l'infection. Les cellules sont infectées dans 600 μ L de milieu DMEM dépourvu en sérum en présence d'adénovirus dilué à différentes MOI 10, 20 40, 80, 160. Après 4 heures d'infection à 37°C sous agitation, les cellules sont lavées avec du milieu 10% SVF et incubées 48 heures dans 3 mL de milieu DMEM complet 10% de SVF à 37°C et 5% de CO₂. Le pourcentage de cellules GFP positives détecté en microscopie à fluorescence correspond au nombre de cellules infectées par l'adénovirus. Les surnageants des cellules infectées, contenant la molécule DKK-3 sécrétée, sont prélevés pour d'une part vérifier en Western Blot la présence de DKK-3 et d'autre part tester l'effet de DKK-3 sur la prolifération de cellules en MLR.

V-2-6- Détection de l'adénovirus DKK-3

Afin de permettre le transfert de gènes Dkk-3 chez les animaux LEW.1A ayant reçu une allogreffe de coeur, l'adénovirus recombinant est injecté le jour de la greffe en intraveineuse (4.5×10^{10} de particules infectieuses (PI) dans 500 μ L de liquide de Ringer).

Afin de déterminer la cinétique d'extinction de l'expression de l'adénovirus présent dans le sérum de ces animaux, nous avons utilisé la technique de Western Blot.

V-2-7- Analyse par Western Blot

Les protéines du sérum (10 μ L de sérum dilué au 1/500^{ème}) des animaux ayant reçu l'injection d'adénovirus sont séparées par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE 10%, et transférées sur membrane de nitrocellulose (ECL HybondTM ; Amersham Biotech, Little Chalfont, UK). Les membranes sont saturées pendant 2 heures en TBS Tween contenant 5% de Lait écrémé. L'incubation avec l'anticorps primaire de lapin anti-DKK-3 d'origine humaine, dilué au 1/200 dans du TBT Tween contenant 1% de lait est réalisée à 4°C pendant une nuit. Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS Tween, l'anticorps fixé est révélé à l'aide d'un anticorps

secondaire anti-lapin couplé à la peroxidase (dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS Tween contenant 1% de lait) (Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK). Les anticorps sont détectés par le système de détection ECLTM (Amersham Biotech).

V-2-8- ELISA

Les sérums des animaux ayant reçu une injection d'adénovirus (4.5×10^{10} PI) sont prélevés à différents temps après l'injection. La quantité d'adénovirus DKK-3 présent dans le sérum a été détectée en utilisant un test ELISA sandwich. Après saturation des puits d'une plaque ELISA, un anticorps de chèvre anti-DKK-3 d'origine humaine est utilisé pour coater les puits. Les sérums dilués au 1/500^{ème} sont déposés et un anticorps de lapin anti-DKK-3 d'origine humaine est utilisé pour la détection.

V-2-9- RT-PCR quantitative en temps réel

Les ARN totaux des échantillons de sang ou des broyats de rein d'animaux tolérants à une greffe de rein et d'animaux syngéniques à 100 jours ont été extraits par la méthode d'extraction au TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) puis traités à la Dnase (Roche Indianapolis, IN). Les ARNm sont rétrotranscrits en utilisant l'enzyme spécifique la *reverse transcriptase* MMLV-1 (Invitrogen, France). Les PCR quantitatives ont été réalisées en utilisant un système de détection GenAmp 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) à l'aide de sonde DKK-3 (Ref : Rn00593415_m1) et HPRT (Ref : Rn01527838_g1) (Applied Biosystems, Foster City, CA).

V-2-10- Réponses cellulaires

Des PBMC humains ont été stimulés avec des PBMC allogéniques irradiés (35 Gy) en présence de doses croissantes de la protéine recombinante humaine DKK-3 (R&D systems, Lille, France). Des splénocytes de rat ou de souris sont stimulés avec des splénocytes irradiés allogéniques en présence d'anticorps de souris anti-Dkk-3 (R&D systems). Dans les deux cas, la prolifération est mesurée au bout de 5 jours suite à l'incorporation de ³H thymidine.

V-2-11- Immunohistologie

Des coupes de rein de rats syngéniques et de rats tolérants leur greffe depuis plus de 100 jours sont réalisées au cryostat et fixées à l'acétone. Les coupes sont marquées avec l'anticorps primaire de lapin anti-DKK-3 d'origine humaine. Le marquage est détecté par immunofluorescence suite à l'incubation des coupes avec l'anticorps secondaire FITC. Les sections tissulaires sont ensuite montées en utilisant un liquide de montage (Dako).

V-3- Résultats (encore non publiés)

Analyse de l'expression génique de rats tolérants leur greffe de rein en comparaison à des animaux syngéniques.

Nous avons préalablement démontré que l'administration par voie intrapéritonéale de 4mg/kg/jour pendant 8 jours d'un anticorps anti-CD28 à des rats LEW.1A ayant reçu une allogreffe de rein, permet d'induire une tolérance à long terme sans développement de signes histologiques de rejet chronique (Haspot, Seveno et al. 2005). Afin de mieux caractériser cet état de tolérance, j'ai pu étudier lors de ma thèse le pattern d'expression génique de trois de ces animaux en comparaison à trois animaux syngéniques 100 jours après la greffe, en utilisant des puces pangénomiques de chez Applied Biosystems (part no. 4337467). Sur les 27 000 gènes présents sur la puce et analysés par le logiciel R, 433 gènes ont été trouvés différemment exprimés entre les deux situations biologiques ($p < 0.05$) avec un FC (Fold change) > 2 . Parmi ces 433 gènes, 220 gènes sont surexprimés chez les animaux tolérants par rapport aux animaux syngéniques et 212 sont sous exprimés (**Figure 21**).

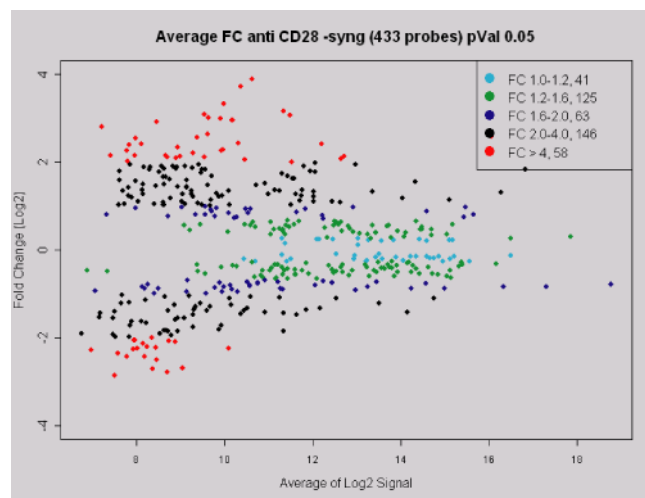


Figure 21 *Différence d'expression génique entre rats tolérants et syngéniques suite à une allogreffe de rein.*

Visualisation de l'expression des 433 gènes différemment exprimés entre deux situations biologiques analysées par puces à ADN : Trois rats LEW.1A tolérants à une allogreffe de rein après traitement par un anticorps anti-CD28 et trois rats syngéniques utilisés comme contrôle plus de 100 jours après la transplantation. Les analyses statistiques sont réalisées en fonction

du FC (fold change) correspondant au ratio de l'intensité du signal d'un gène chez les rats tolérants par rapport à l'intensité du signal de ce même gène chez les rats syngéniques.

L'analyse de ces 433 gènes en utilisant le système de classification du logiciel Panther nous a permis de les organiser selon leur voie de signalisation, leur fonction moléculaire et leur processus biologique. En fonction de cette analyse, les gènes dont l'expression est la plus significativement augmentée ou sous régulée dans la tolérance appartiennent à la famille des chemokines, interleukines, cytokines, aux protéines de la matrice extracellulaire, à la famille des immunoglobulines, à des facteurs de croissance, à des gènes contrôlant l'activation de monocytes ou à la famille de la voie WNT (Wingless iNTEGRation site).

Etude de la voie de signalisation de WNT distincte entre les animaux syngéniques et tolérants leur greffe de rein

Lors de ma thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la voie WNT, voie de signalisation impliquée dans le contrôle de l'embryogénèse et de la prolifération de cellules tumorales. En effet, l'inhibition de la voie WNT chez nos animaux traités avec l'anti-CD28 suite à une greffe de rein, pourrait jouer un rôle dans l'induction ou le maintien de la tolérance. Nous avons donc analysé la régulation de l'expression des gènes de la voie WNT dans nos puces à ADN réalisées sur 3 animaux tolérants en comparaison à 3 animaux syngéniques.

Parmi l'ensemble des gènes impliqués dans la voie de signalisation de WNT, certains gènes tels que Dickkopf homolog 3 (FC>15) ou l'axine (FC>7), des molécules antagonistes de la voie, ont une expression augmentée par rapport à la situation contrôle alors que le gène Wnt2, un agoniste de la voie, est sous exprimé par rapport à l'expression de ce gène chez les syngéniques (**Figure 22**).

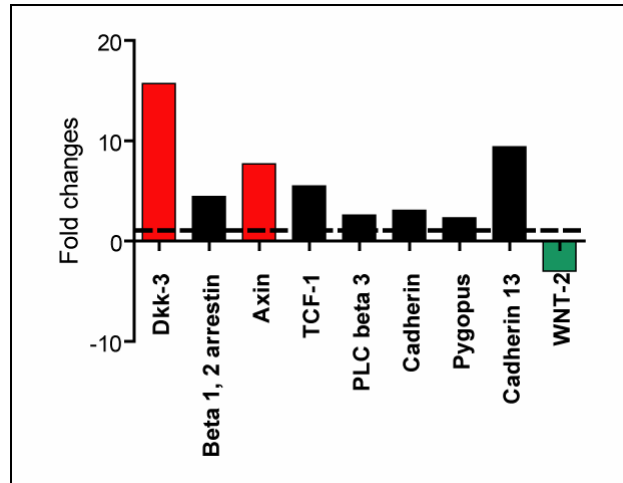


Figure 22 Expression des gènes impliqués dans la voie WNT après l'analyse par puces pangénomiques.

L'expression des gènes chez les rats tolérants une greffe de rein 100 jours après la transplantation est rapportée à l'expression de ces mêmes gènes chez les animaux syngéniques. En rouge, l'expression des gènes antagonistes à la voie WNT et en vert, les gènes agonistes de la voie. Ces résultats sont la moyenne de trois analyses individuelles.

Lors de cette analyse, nous avons pu observer que les animaux tolérant leur greffe de rein surexpriment fortement la protéine Dkk-3 (FC>15) en comparaison à des animaux syngéniques. Nous avons pu confirmer ces résultats par l'analyse en PCR quantitative en temps réel dans le rein. Comme montré **Figure 23**, l'ARN messager de Dkk-3 est seulement détecté dans le rein des animaux tolérants et très faiblement exprimé dans les autres compartiments (sang et rate) supposant une expression spécifique du rein de la molécule (**Figure 23**).

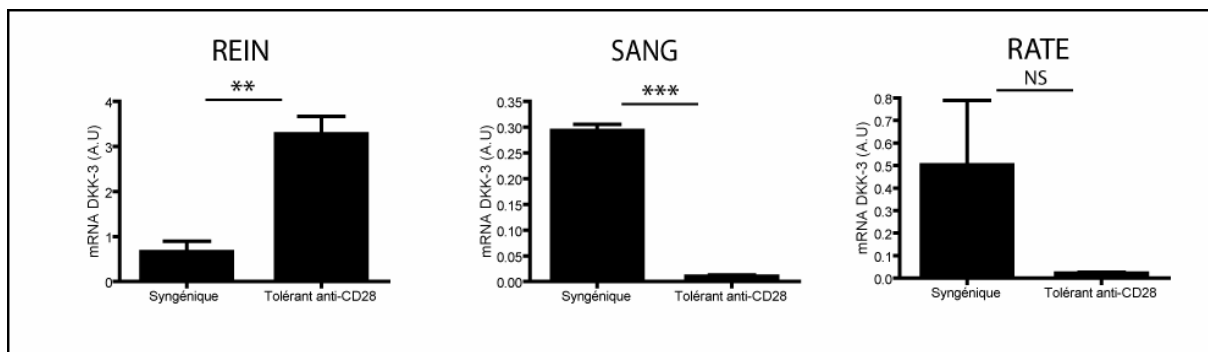


Figure 23 Expression de Dkk-3 dans le rein, le sang et la rate en comparaison avec des animaux syngéniques 100 jours après la transplantation. (N= 3, ** : p<0.01 et *** :

$p < 0.001$) L'analyse est réalisée en TaqMAN et les résultats sont exprimés en unité arbitraire (AU) normalisés à l'HPRT.

L'analyse de ces résultats confirme d'une part l'augmentation de l'expression de l'ARN messager de Dkk-3 dans le rein des animaux tolérants leur greffe suite au traitement d'induction par l'anti-CD28 et d'autre part montrent une absence de Dkk-3 dans le sang et la rate de ces mêmes animaux. Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que les cellules produisant DKK-3 disparaissaient du sang et de la rate des animaux tolérants pour se retrouver dans le greffon.

De même, nous avons pu confirmer l'augmentation de l'expression de l'ARN messager d'autres molécules impliquées dans la voie de signalisation de WNT dans le rein des animaux tolérants incluant l'axine, la β -arrestine (deux molécules membres du complexe de destruction de la β -caténine dans le cytoplasme), la cadhérine 13 (un activateur de la voie) et Tcf7 (un facteur de transcription suppresseur de la voie en absence de la formation de son complexe avec la β -caténine dans le noyau) (**Figure 24**). Cependant, nous n'avons pas pu confirmer l'inhibition de l'expression de l'ARNm de Wnt2 dans le rein des animaux tolérants (résultats non montrés).

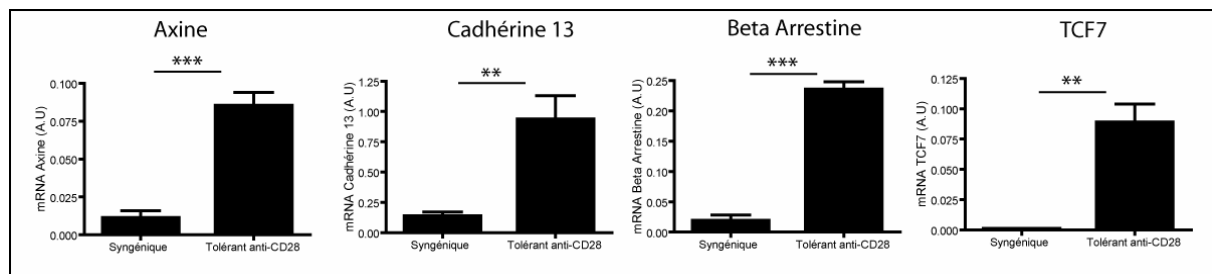


Figure 24 Expression des gènes impliqués dans la voie WNT dans le rein de rats tolérants leur greffe de rein ($n=6$) en comparaison à des animaux syngéniques ($n=4$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 100 jours après la transplantation. L'analyse est réalisée en TaqMan et normalisée avec l'HPRT.

Afin de déterminer si l'expression des molécules de la voie WNT, autres que Dkk-3, est aussi spécifique du tissu rénal, l'analyse de l'expression de leur ARN messager a été réalisée dans d'autres compartiments tels que la rate et le sang. Nous avons ainsi pu observer que le profil d'expression des différentes molécules étudiées est similaire dans le sang ou la rate des animaux tolérants. En effet, l'augmentation de l'expression de l'ARN messager de l'axine et

de la β -arrestine chez les animaux tolérants en comparaison aux animaux syngéniques, 100 jours après la transplantation, n'est pas significative. L'expression de l'ARNm de Tcf7 n'est pas significativement différente dans la rate alors qu'elle semble réduite dans le sang des animaux tolérants par rapport à des animaux syngéniques. La réduction de la cadhérine 13 chez les animaux tolérants est significative dans le sang et pas dans la rate (**Figure 25 et 26**).

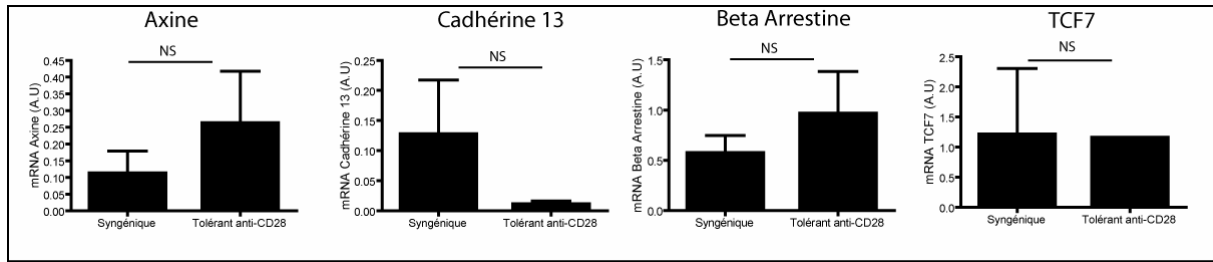


Figure 25 Expression des gènes impliqués dans la voie WNT dans **la rate** de rats tolérants leur greffe de rein ($n=3$) en comparaison à des animaux syngéniques ($n=3$) 100 après la transplantation. L'analyse est réalisée par TaqMan et normalisée avec l'HPRT.

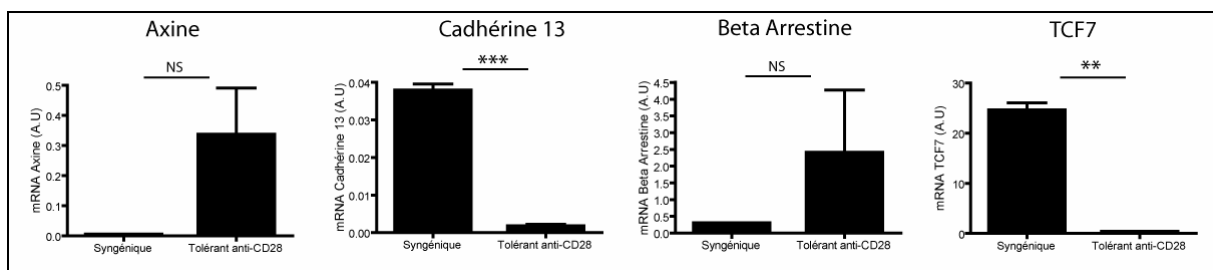


Figure 26 Expression des gènes impliqués dans la voie WNT dans **le sang** de rats tolérants leur greffe de rein ($n=3$) en comparaison à des animaux syngéniques ($n=3$) 100 après la transplantation (** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$). L'analyse est réalisée par TaqMan et normalisée avec l'HPRT.

Régulation de l'expression de Dkk-3 selon différents protocoles de tolérance suite à une greffe de rein ou de cœur

Etant donné que l'augmentation de l'expression de l'ARN messager de Dkk-3 a aussi été détectée dans le rein après induction de tolérance par administration de sérum anti-classe II (Jovanovic, Dugast et al. 2008), nous nous sommes demandés si cette augmentation était spécifique de la greffe rénale. Pour cela, nous avons analysé les transcrits Dkk-3 dans plusieurs modèles de tolérance à l'allogreffe de cœur utilisés à l'INSERM UMR643. Ces protocoles incluent : l'administration pendant 20 jours d'un analogue de la deoxyspergualine, le LF015-095 induisant la tolérance sans aucun signe de rejet chronique, la transfusion de sang du donneur (DST (donor specific transfusion)) 7 et 14 jours avant la transplantation ou le traitement par la molécule de fusion CD40-Ig. Ces deux derniers modèles présentent des signes histologiques de rejet chronique. Les résultats obtenus montrent clairement une absence de l'expression de l'ARNm de Dkk-3 dans les cœurs greffés des receveurs traités par

DST, LF015-095 ou CD40-Ig, suggérant que Dkk-3 est spécifique de la tolérance à l'allogreffe de rein (**Figure 27**).

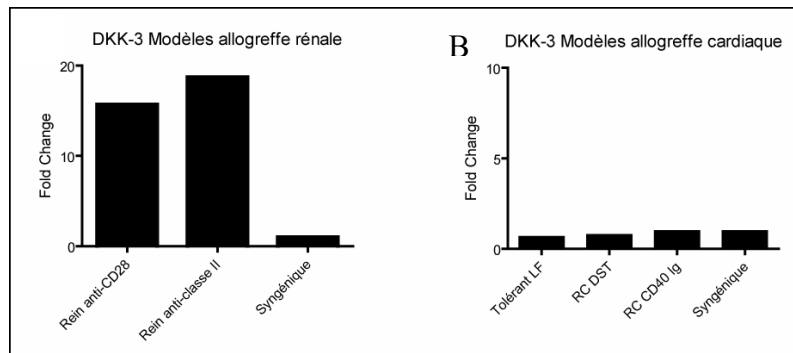


Figure 27 Comparaison de l'expression des transcrits *Dkk-3* dans différents modèles de tolérance après puces à ADN. A, L'expression de l'ARN messager de *Dkk-3* a été analysée dans les reins d'animaux tolérants ($n=3$) dans 2 protocoles d'induction suite à une allogreffe rénale en comparaison avec des animaux syngéniques ($n=3$). B, L'expression de l'ARN messager de *Dkk-3a* a été analysée dans les cœurs d'animaux tolérants (LF ; $n=3$) ou développant un rejet chronique (DST, CD40Ig ; $n=3$) suite à une allogreffe cardiaque dans les mêmes combinaisons de souches de rat.

Analyse du type de cellules exprimant les molécules de la voie WNT

Afin de déterminer la nature des cellules participant à l'activation de la voie WNT, nous avons analysé l'expression de l'ARN messager des molécules impliquées dans cette voie dans différentes sous populations de lymphocytes avant et après leur stimulation. Les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ surexpriment l'ARN messager de *Dkk-3* après 24 heures de stimulation polyclonale anti-CD3/CD28, contrairement aux autres molécules de la voie analysée ci-dessous. Seule l'expression de l'ARN messager de la β -arrestine semble exprimée dans les monocytes suite à leur activation par le LPS (**Figure 28**).

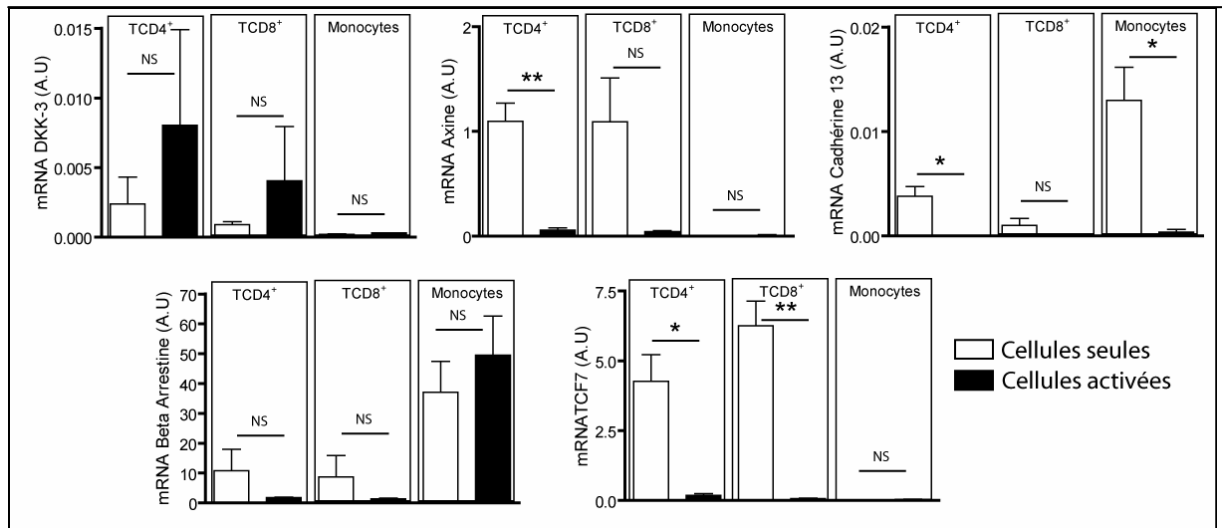


Figure 28 Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la voie WNT dans les sous populations de cellules T CD4⁺, T CD8⁺ et les monocytes au repos ou après 24 heures d'activation (anti-CD3/CD28, LPS). Les analyses sont réalisées par PCR quantitative et normalisées à l'HPRT. N=5.

Analyse de la localisation des cellules sécrétant Dkk-3

L'analyse de l'expression de l'ARN messager de Dkk-3 dans les différents compartiments cellulaires tels que le sang, la rate, le thymus ou les ganglions, nous a permis d'étudier la localisation des cellules participant à la sécrétion de DKK-3. Comme indiquée sur la figure ci-dessous, l'ARN messager de Dkk-3 est détecté dans les ganglions mésentériques d'animaux naïfs, suggérant que les cellules des ganglions mésentériques sécrètent Dkk-3 (**Figure 29**).

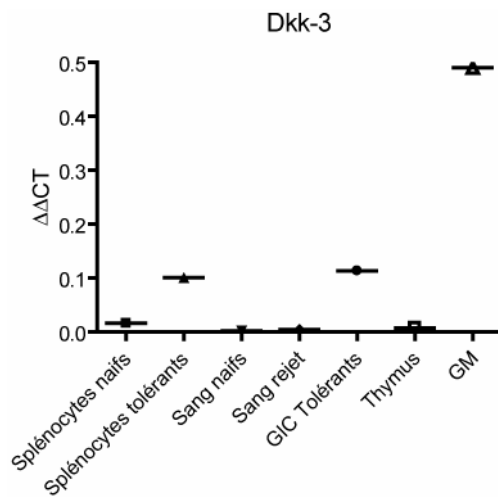


Figure 29 Analyse de l'expression de l'ARN messager de *Dkk-3* dans différents compartiments cellulaires d'animaux naïfs et tolérants 100 jours après la transplantation.

Des résultats préliminaires ont permis de montrer que suite au double marquage DKK-3/DAPI, les cellules DKK-3 positives sont présentes dans le parenchyme du rein de nos animaux tolérants (**Figure 30**).

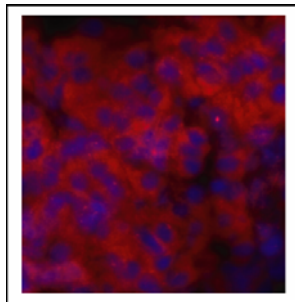


Figure 30 Coupes de rein d'animaux tolérants anti-CD28 marquées avec DKK-3 (en rouge) et au DAPI (en bleu) réalisées par immunofluorescence.

Cependant, davantage d'analyse en double marquage par immunofluorescence de différentes sous populations cellulaires permettra de mieux caractériser les cellules capables de sécréter *Dkk-3* et de mieux distinguer leur localisation.

Lien entre surexpression de la molécule DKK-3 et réponses immunes in vitro

Une étude fonctionnelle de la protéine DKK-3 a été réalisée *in vitro* dans un test de prolifération en MLR sur des cellules humaines suite à l'utilisation de la protéine recombinante humaine DKK-3. Utilisée à différentes concentrations, la protéine recombinante DKK-3 permet le blocage de façon dose dépendante de la prolifération cellulaire, suggérant un rôle inhibiteur de la molécule sur le développement de la réponse immune (**Figure 31**).

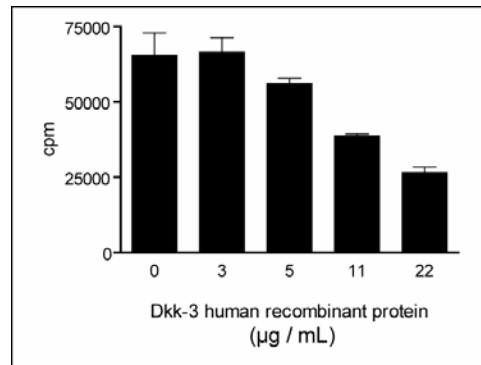


Figure 31 MLR utilisant des PBMC humains stimulés par des PBMC irradiés allogéniques en présence de dose croissante de protéine recombinante DKK-3 ou d'excipient (0).

Dans le but de caractériser l'inhibition de la prolifération observée en MLR, nous avons infecté des cellules adhérentes HELA avec un adénovirus recombinant Dkk-3 de rat. Nous avons en effet cloné le gène de Dkk-3 dans un plasmide pAdénotrack sous le contrôle d'un promoteur fort CMV et son amplification a été réalisée au sein du laboratoire de thérapie génique dans des lignées de cellules HEK 293. Nous avons ainsi obtenu des aliquots de 6.5×10^{11} pi/mL. La positivité des surnageants de culture des cellules HELA infectées à différentes MOI a été contrôlée en Western Blot en utilisant un anticorps anti-souris DKK-3 cross-réagissant avec le rat. Le surnageant de culture de cellules non infectées sert de contrôle négatif (**Figure 32**).

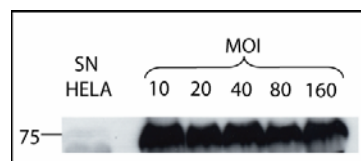


Figure 32 Analyse de l'expression de la protéine DKK-3 dans le surnageant de culture de cellules HELA transfectées avec l'adénovirus recombinant DKK-3 à différentes MOI.

Les surnageants de culture des cellules HELA expriment parfaitement la protéine DKK-3 pour les différentes MOI utilisées pour l'infection. Ces surnageants seront utilisés ultérieurement pour tester l'effet de l'expression de la protéine recombinante DKK-3 de rat en MLR ou suite à une stimulation polyclonale.

Analyse de la surexpression de la molécule DKK-3 sur le développement de réponses immunes in vivo

Etant donné que la surexpression de DKK-3 semble réguler le développement de la réponse immune *in vitro*, nous avons voulu savoir si la surexpression observée chez nos rats tolérant leur greffe de rein était responsable de leur état de tolérance immunologique. L'analyse par Western Blot du sérum de deux animaux naïfs ayant chacun reçu deux doses différentes d'adénovirus (2.25×10^{10} pi (A) et 7.5×10^9 pi (B)) a permis d'identifier la cinétique d'extinction de l'expression de la protéine *in vivo* (Figure 33).

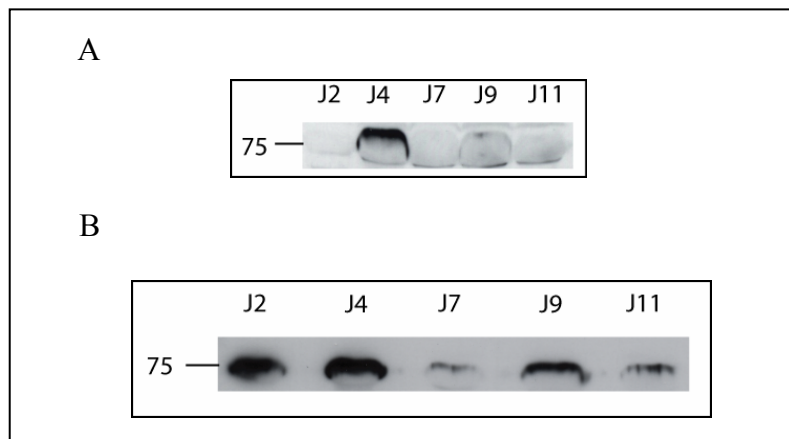


Figure 33 Analyse de la cinétique d'expression de la protéine DKK-3 dans le sérum de rat naïfs ayant reçu (A) 2.25×10^{10} pi et (B) 7.5×10^9 pi en intraveineuse. Les sérums ont été prélevés à J2, J4, J7, J9 et J11 après l'injection.

Après ces différents tests consistant à déterminer la dose et le type d'administration de l'adénovirus, nous avons choisi d'injecter à des rats LEW.1A greffés avec le cœur d'animaux LEW.1W, $4,5 \times 10^{10}$ pi (particules infectieuses) d'adénovirus DKK-3 ou d'adénovirus contrôle CMV vide en intraveineuse. Le rejet dans ce modèle de greffe a servi de contrôle pour de nombreuses autres études et survient au bout de 5 jours. Même si, suite à l'injection

d'adénovirus contrôle, le greffon rejette en 9 jours (n=3), l'injection d'adénovirus DKK-3 prolonge significativement la survie du greffon jusqu'à J20 chez 3 animaux (**Tableau 5**).

| Traitement | N | Survie (Jours) |
|---------------------|-----|----------------|
| Rejet | >10 | 5.5 |
| Adénovirus CMV null | 3 | 9 |
| Adénovirus DKK-3 | 3 | 20 |

Tableau 5 Survie de rats LEW.1A ayant reçu une allogreffe de cœur et traités en intraveineuse avec l'adénovirus recombinant de rat DKK-3 ou avec l'adénovirus CMV null comme contrôle.

L'expression de la protéine DKK-3 dans le sérum de rats Lewis 1A greffés avec un cœur de rat Lewis 1W et traités à J0 avec l'AdDKK-3 a été analysée par Western Blot à différents temps après la greffe. Une bande aux environs de 75 KDa correspond à la taille de la protéine DKK-3 lorsqu'elle est glycosylée (**Figure 34**).

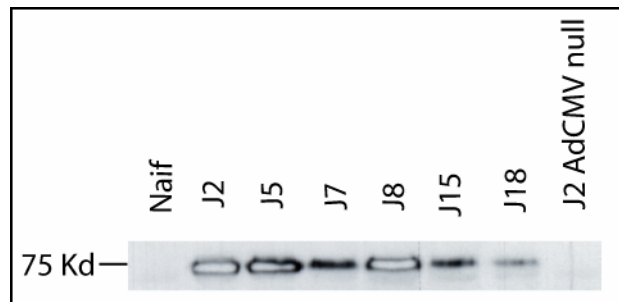


Figure 34 Analyse par Western Blot de la cinétique d'expression de la protéine DKK-3 dans le sérum de rats suite à une allogreffe cardiaque et traités à J0 avec l'AdDKK-3 (4.5×10^{10} pi) n=3.

V-4- Perspectives et discussions

Lors de cette étude, nous avons voulu explorer les mécanismes impliqués dans le maintien de la tolérance suite à une allogreffe rénale chez le rat, induits par l'administration par voie intrapéritonéale d'un anticorps anti-CD28 (JJ319) pendant 8 jours. L'analyse, par la technique de puces à ADN, du profil d'expression génique du greffon d'animaux tolérants comparé à celui d'animaux syngéniques, 100 jours après la transplantation, nous a permis d'identifier de nombreuses voies de signalisation et de processus biologiques capables de jouer un rôle dans le maintien de la tolérance. Nous avons révélé un rôle important de la voie WNT en transplantation, et tout particulièrement d'une protéine sécrétée impliquée dans la régulation de cette voie, la molécule DKK-3, dont l'expression est augmentée de 5 (résultats par RT-PCR ; **Figure 23**) à 15 fois (résultats par puces ; **Figure 22**) chez nos animaux tolérants. Ces résultats nous ont conduits à étudier le rôle de la voie WNT et en particulier de la molécule DKK-3 dans le maintien de la tolérance en transplantation.

La formation d'un complexe suite à la liaison de la molécule WNT avec le récepteur a sept domaines transmembranaires, Frizzled (Bhanot, Brink et al. 1996), et de ses co-récepteurs LRP5/LRP6 (Li and Bu 2005), induit l'activation de la cascade de signalisation connue pour être impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation (Staal and Clevers 2005). Deux voies majeures de signalisation de WNT sont aujourd'hui décrites dans la littérature : la plus classique est dénommée la voie canonique et la seconde, la voie non-canonique. Bien que largement décrit en cancérologie, le rôle de la signalisation via WNT est encore peu connu dans la tolérance en transplantation. Cependant, quelques études ont permis d'établir le rôle de la voie canonique de WNT dans l'immunité : 1) en association avec la β -caténine, la molécule TCF-1 régule la différenciation et la survie des thymocytes double positifs (Gounari, Aifantis et al. 2001; Ioannidis, Beermann et al. 2001), 2) la génération de souris déficientes pour le gène de la β -caténine dans des lignées de lymphocytes T, permet l'identification d'un rôle de cette molécule dans le développement des cellules T (Xu, Banerjee et al. 2003), 3) l'activation de cellules T CD8⁺ réduit l'expression d'isoformes inhibiteurs de facteurs de transcription de la voie WNT (LEF/TCF-1), suggérant que la voie WNT joue non seulement un rôle spécifique dans les cellules T immatures mais aussi dans les cellules matures (Willinger, Freeman et al. 2006), 4) GSK-3 contrôle les propriétés pro-inflammatoires des cellules dendritiques (Rodionova, Conzelmann et al. 2007), 5) la voie

WNT favorise la migration des cellules T au niveau du site inflammatoire (Wu, Crampton et al. 2007).

Alors que l'expression de Dkk-3 est réduite dans de nombreux types de cancers, sa surexpression semble être un facteur bénéfique pour inhiber la croissance tumorale (Kawano, Kitaoka et al. 2006). En transplantation, suite à l'analyse du profil d'expression génique de rats tolérant une allogreffe rénale par la technique de puces à ADN, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'ARNm de Dkk-3 dans le rein de nos animaux tolérants. De plus, l'absence de l'expression de l'ARN messager de Dkk-3 dans 3 modèles de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat (DST, CD40-Ig ou LF-015095) d'une part, et sa surexpression dans un second modèle de tolérance à la greffe de rein chez le rat d'autre part, suggère que Dkk-3 est spécifique de la tolérance à l'allogreffe rénale. Afin de mieux corréler l'expression de DKK-3 avec l'état de tolérance, nous analyserons l'expression de DKK-3 avant la greffe, en phase d'induction puis en phase de maintien de la tolérance dans le rein de nos animaux greffés.

Le but de notre étude a été de caractériser le rôle de cette molécule dans la régulation de la voie WNT et ainsi dans le maintien de la tolérance rénale en transplantation.

Afin de déterminer la localisation des cellules sécrétant la molécule DKK-3 dans ce modèle, nous avons tout d'abord comparé l'expression de l'ARN messager de Dkk-3 dans différents compartiments cellulaires. Alors que Dkk-3 est augmenté dans le rein de nos animaux tolérants, l'apparition d'une diminution de cette expression dans d'autres compartiments, tels que le sang et la rate, nous a permis de supposer que suite à leur activation, les cellules produisant DKK-3 migreraient du sang vers le greffon, afin d'agir au centre du site de l'inflammation et empêcher le rejet de greffe. En effet, en comparant l'expression de l'ARN messager de Dkk-3 dans différentes sous-populations lymphocytaires, triées par FACS ARIA, au repos et après 24 heures d'activation, nous avons observé que la stimulation anti-CD3/anti-CD28 des sous-populations T CD4⁺ et T CD8⁺ induit l'augmentation de l'expression de l'ARN messager de Dkk-3 (**Figure 28**). On peut donc supposer que suite à leur activation, les lymphocytes T, qu'ils soient CD4⁺ ou CD8⁺, sont capables de sécréter DKK-3 et favoriser le développement d'un état de tolérance. L'évaluation de l'expression de Dkk-3 dans différentes sous-populations de cellules régulatrices permettrait d'établir un lien solide entre la molécule DKK-3 et les mécanismes de tolérance. L'immunofluorescence en double marquage (un anticorps de souris DKK-3 cross-réagissant avec le rat et un marqueur spécifique de chaque type de population cellulaire) sur des coupes de rein d'animaux tolérants en comparaison à

des animaux syngéniques ou ayant rejeté leur greffe seraient cependant nécessaires à l'identification du type de cellules produisant la molécule DKK-3.

Pour exercer leur fonction antagoniste, les molécules DKK-1 et DKK-2 se lient aux co-récepteurs LRP5/LRP6 inhibant ainsi leur liaison avec WNT (Mao, Wu et al. 2001; Mao, Wu et al. 2002). Une autre étude a démontré que la liaison de DKK-3 sur LRP5/LRP6 module spécifiquement la voie WNT dans des cellules PC12 (Caricasole, Ferraro et al. 2003). Dans le contexte d'une réponse immune à l'allogreffe, il serait donc informatif d'identifier la cible moléculaire de DKK-3 ainsi que le type de cellules de l'immunité (lymphocytes ou cellules dendritiques) répondant à cette interaction. L'immunisation de souris avec l'adénovirus DKK-3 de rat permettra, en collaboration avec une plate-forme de production d'anticorps, la génération d'anticorps monoclonaux de rat spécifiques de la molécule DKK-3 nécessaires à l'identification par immunoprécipitation du récepteur de DKK-3. En supposant que DKK-3 se fixe sur le co-récepteur LRP6, l'utilisation d'un anticorps anti-LRP6 et de la protéine de fusion DKK-3-Ig produite au laboratoire permettrait par analyse fluorométrique de déterminer l'affinité de DKK-3 pour son récepteur et le nombre de sites de liaison sur les cellules cibles.

Contrairement aux molécules DKK-1, DKK-2 ou DKK-4 qui ont la capacité de moduler la voie de signalisation WNT/ β -caténine, le rôle biologique de DKK-3 reste encore peu connu (Niehrs 2006). En cancérologie, tandis que certaines études montrent que la surexpression de DKK-3 favorise l'inhibition de la prolifération et l'apoptose de cellules tumorales (Caricasole, Ferraro et al. 2003) (Hoang, Kubo et al. 2004) (Tsuji, Miyazaki et al. 2000) (Yue, Sun et al. 2008), d'autres démontrent néanmoins une action agoniste de la molécule (Mao, Wu et al. 2001) (Mao, Wu et al. 2002) (Krupnik, Sharp et al. 1999) (Kawano, Kitaoka et al. 2006). Cependant, aucune étude réalisée n'a établi un rôle de la molécule DKK-3 dans la régulation de la réponse immune. Lors de notre étude, nous avons pu observer que l'ajout de doses croissantes de la protéine recombinante humaine DKK-3 dans une MLR humaine *in vitro*, inhibe de façon dose dépendante la prolifération cellulaire, suggérant un rôle de DKK-3 dans l'inhibition de la réponse immunitaire (**Figure 31**). La production d'un adénovirus DKK-3 de rat nous a permis d'infecter des cellules HELA capables de sécréter la protéine. Nous avons ainsi pu contrôler la positivité de l'infection pour différentes MOI par Western Blot en utilisant un anticorps anti-DKK-3 de souris cross réagissant avec le rat (**Figure 32**). Dans le but de déterminer si l'inhibition de la prolifération obtenue résulte d'un blocage du cycle cellulaire ou d'une augmentation de l'apoptose, des expériences complémentaires permettront de mesurer tout d'abord la prolifération des lymphocytes T en MLR ou suite à une stimulation

polyclonale, après incorporation de ^3H thymidine, en présence ou non de surnageant de cellules HELA infectées. Dans un second temps, nous mesurerons l'apoptose des cellules répondeuses par cytométrie en flux par un marquage à l'annexine V, ou par Western Blot par mesure de l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl2 ou Bcl-x_L.

L'inhibition de la voie WNT est caractérisée par l'activation de la molécule GSK-3, mesurée par son taux de phosphorylation ainsi que la phosphorylation de la β -caténine, rapidement dégradé par le protéasome (Ikeda, Kishida et al. 1998; Nusse 2005). L'utilisation d'un inhibiteur de la GSK-3 *in vitro*, le chlorure de lithium (LiCl), favorise l'activation de la voie WNT et restaure la prolifération cellulaire (Rao, Zhang et al. 2005). Cet inhibiteur nous permettra de tester l'hypothèse d'une action de Dkk-3 sur cette voie. Afin d'identifier le rôle de DKK-3 dans les différentes voies de signalisation impliquant WNT, nous évaluerons le taux intracellulaire de β -caténine par Western Blot (voie canonique), le flux de calcium (voie non-canonique) ainsi que le taux d'expression des protéines Bcl2 et Bcl_{xL} (voie d'apoptose alternative) 9 jours après l'injection d'adénovirus DKK-3 ou d'adénovirus contrôle.

La prolongation de survie obtenue *in vivo* dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat après administration d'un adénovirus recombinant de rat DKK-3 conforte notre hypothèse que DKK-3 serait lié au maintien de la tolérance en transplantation rénale.

Afin d'analyser les effets de DKK-3 sur le développement des réponses immunes et la production d'anticorps *in vivo*, nous allons immuniser des rats à la KLH suite à l'injection en intraveineuse d'adénovirus DKK-3 ou d'adénovirus contrôle. Les cellules des ganglions drainant seront récoltées afin d'analyser leur capacité à répondre à une seconde stimulation 11 jours après l'immunisation. De même, le taux d'anticorps anti-IgG et anti-IgM sera évalué en ELISA dans les différents groupes.

L'utilisation d'anticorps anti-CD28 permet de bloquer spécifiquement la voie de costimulation CD28/B7 tout en laissant libre l'interaction CTLA-4/B7 nécessaire pour le développement de la tolérance (Grohmann, Orabona et al. 2002) et pour le fonctionnement de cellules régulatrices (Tsai, Ho et al. 2004). En transplantation, chez le rat, l'anticorps anti-CD28 (JJ319) induit la tolérance dans un modèle d'allogreffe de rein (Haspot, Seveno et al. 2005) et le développement du rejet chronique dans un modèle de tolérance à l'allogreffe de cœur (Dengler, Szabo et al. 1999; Dong, Yuan et al. 2002). La surexpression de DKK-3 après transplantation en même temps que le blocage spécifique de CD28, permettrait peut être de renforcer les mécanismes régulateurs nécessaires à l'induction de la tolérance et empêcher le développement du rejet chronique dans ce modèle.

V-5- Bibliographie

- Abarzua, F., M. Sakaguchi, et al. (2007). "Heat shock proteins play a crucial role in tumor-specific apoptosis by REIC/Dkk-3." Int J Mol Med **20**(1): 37-43.
- Baba, Y., T. Yokota, et al. (2006). "Constitutively active beta-catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture." J Immunol **177**(4): 2294-303.
- Bafico, A., G. Liu, et al. (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." Nat Cell Biol **3**(7): 683-6.
- Barrantes Idel, B., A. Montero-Pedrazuela, et al. (2006). "Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice." Mol Cell Biol **26**(6): 2317-26.
- Bhanot, P., M. Brink, et al. (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." Nature **382**(6588): 225-30.
- Brennan, K., J. M. Gonzalez-Sancho, et al. (2004). "Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins." Oncogene **23**(28): 4873-84.
- Brown, J. D. and R. T. Moon (1998). "Wnt signaling: why is everything so negative?" Curr Opin Cell Biol **10**(2): 182-7.
- Cadigan, K. M. and R. Nusse (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." Genes Dev **11**(24): 3286-305.
- Cadoret, A., C. Ovejero, et al. (2001). "Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin." Cancer Res **61**(8): 3245-9.
- Caricasole, A., T. Ferraro, et al. (2003). "Functional characterization of WNT7A signaling in PC12 cells: interaction with A FZD5 x LRP6 receptor complex and modulation by Dickkopf proteins." J Biol Chem **278**(39): 37024-31.
- Chen, A. E., D. D. Ginty, et al. (2005). "Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins." Nature **433**(7023): 317-22.
- Dengler, T. J., G. Szabo, et al. (1999). "Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation." Transplantation **67**(3): 392-8.
- Dong, V. M., X. Yuan, et al. (2002). "Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection." Transplantation **73**(8): 1310-7.

- Du, S. J., S. M. Purcell, et al. (1995). "Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos." Mol Cell Biol **15**(5): 2625-34.
- Eastman, Q. and R. Grosschedl (1999). "Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 233-40.
- Fjeld, K., P. Kettunen, et al. (2005). "Dynamic expression of Wnt signaling-related Dickkopf1, -2, and -3 mRNAs in the developing mouse tooth." Dev Dyn **233**(1): 161-6.
- Glinka, A., W. Wu, et al. (1998). "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." Nature **391**(6665): 357-62.
- Gounari, F., I. Aifantis, et al. (2001). "Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development." Nat Immunol **2**(9): 863-9.
- Gregorieff, A. and H. Clevers (2005). "Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer." Genes Dev **19**(8): 877-90.
- Grohmann, U., C. Orabona, et al. (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." Nat Immunol **3**(11): 1097-101.
- Grotewold, L. and U. Ruther (2002). "The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death." Embo J **21**(5): 966-75.
- Haspot, F., C. Seveno, et al. (2005). "Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells." Am J Transplant **5**(10): 2339-48.
- He, X., M. Semenov, et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." Development **131**(8): 1663-77.
- Hermann, M., D. Pirkebner, et al. (2007). "Dickkopf-3 is expressed in a subset of adult human pancreatic beta cells." Histochem Cell Biol **127**(5): 513-21.
- Hoang, B. H., T. Kubo, et al. (2004). "Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway." Cancer Res **64**(8): 2734-9.
- Huang, Z., H. Xie, et al. (2006). "Transcriptional regulation of CD4 gene expression by T cell factor-1/beta-catenin pathway." J Immunol **176**(8): 4880-7.
- Ikeda, S., S. Kishida, et al. (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin." Embo J **17**(5): 1371-84.

- Ioannidis, V., F. Beermann, et al. (2001). "The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival." Nat Immunol **2**(8): 691-7.
- Jovanovic, V., A. S. Dugast, et al. (2008). "Implication of matrix metalloproteinase 7 and the noncanonical wntless-type signaling pathway in a model of kidney allograft tolerance induced by the administration of anti-donor class II antibodies." J Immunol **180**(3): 1317-25.
- Jovanovic, V., D. Lair, et al. (2007). "Transfer of tolerance to heart and kidney allografts in the rat model." Transpl Int.
- Kano, J., T. Ishiyama, et al. (2008). "Differentially expressed genes in a porcine adult hepatic stem-like cell line and their expression in developing and regenerating liver." Lab Invest **88**(2): 132-43.
- Kawano, Y., M. Kitaoka, et al. (2006). "Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3." Oncogene **25**(49): 6528-37.
- Kawano, Y. and R. Kypta (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." J Cell Sci **116**(Pt 13): 2627-34.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-7.
- Krupnik, V. E., J. D. Sharp, et al. (1999). "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family." Gene **238**(2): 301-13.
- Kuhl, M., L. C. Sheldahl, et al. (2000). "The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." Trends Genet **16**(7): 279-83.
- Kurella, S., J. C. Yaciuk, et al. (2005). "Transcriptional modulation of TCR, Notch and Wnt signaling pathways in SEB-energized CD4+ T cells." Genes Immun **6**(7): 596-608.
- Li, X., P. Liu, et al. (2005). "Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation." Nat Genet **37**(9): 945-52.
- Li, Y. and G. Bu (2005). "LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis." Future Oncol **1**(5): 673-81.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." Nature **417**(6889): 664-7.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." Nature **411**(6835): 321-5.

- Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." Oncogene **25**(57): 7461-8.
- Mlodzik, M. (2002). "Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation?" Trends Genet **18**(11): 564-71.
- Monaghan, A. P., P. Kioschis, et al. (1999). "Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages." Mech Dev **87**(1-2): 45-56.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science **275**(5307): 1787-90.
- Mukhopadhyay, M., S. Shtrom, et al. (2001). "Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse." Dev Cell **1**(3): 423-34.
- Mulroy, T., Y. Xu, et al. (2003). "beta-Catenin expression enhances generation of mature thymocytes." Int Immunol **15**(12): 1485-94.
- Nakamura, R. E., D. D. Hunter, et al. (2007). "Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina." BMC Cell Biol **8**: 52.
- Niehrs, C. (2006). "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators." Oncogene **25**(57): 7469-81.
- Nusse, R. (2005). "Wnt signaling in disease and in development." Cell Res **15**(1): 28-32.
- Ohteki, T., M. Parsons, et al. (2000). "Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3." J Exp Med **192**(1): 99-104.
- Omer, C. A., P. J. Miller, et al. (1999). "Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding." Biochem Biophys Res Commun **256**(3): 584-90.
- Papkoff, J. (1997). "Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src." J Biol Chem **272**(7): 4536-43.
- Papkoff, J., B. Rubinfeld, et al. (1996). "Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes." Mol Cell Biol **16**(5): 2128-34.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-51.
- Rao, R., M. Z. Zhang, et al. (2005). "Lithium treatment inhibits renal GSK-3 activity and promotes cyclooxygenase 2-dependent polyuria." Am J Physiol Renal Physiol **288**(4): F642-9.
- Rodionova, E., M. Conzelmann, et al. (2007). "GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells." Blood **109**(4): 1584-92.

- Roman-Gomez, J., A. Jimenez-Velasco, et al. (2004). "Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia." Br J Cancer **91**(4): 707-13.
- Semenov, M. V., K. Tamai, et al. (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." Curr Biol **11**(12): 951-61.
- Sengupta, S., P. Jayaraman, et al. (2007). "Unrestrained glycogen synthase kinase-3 beta activity leads to activated T cell death and can be inhibited by natural adjuvant." J Immunol **178**(10): 6083-91.
- Shimizu, H., M. A. Julius, et al. (1997). "Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin." Cell Growth Differ **8**(12): 1349-58.
- Soullillou, J. P., C. B. Carpenter, et al. (1976). "The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement." J Exp Med **143**(2): 405-21.
- Staal, F. J. and H. C. Clevers (2003). "Wnt signaling in the thymus." Curr Opin Immunol **15**(2): 204-8.
- Staal, F. J. and H. C. Clevers (2005). "WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation." Nat Rev Immunol **5**(1): 21-30.
- Steel, M. D., S. M. Puddicombe, et al. (2005). "Beta-catenin/T-cell factor-mediated transcription is modulated by cell density in human bronchial epithelial cells." Int J Biochem Cell Biol **37**(6): 1281-95.
- Suwa, T., M. Chen, et al. (2003). "Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex." J Endocrinol **178**(1): 149-58.
- Tickenbrock, L., J. Schwable, et al. (2006). "Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes." J Leukoc Biol **79**(6): 1306-13.
- Tsai, M. K., H. N. Ho, et al. (2004). "The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis." Transplantation **77**(1): 48-54.
- Tsuji, T., M. Miyazaki, et al. (2000). "A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines." Biochem Biophys Res Commun **268**(1): 20-4.
- Untergasser, G., M. Steurer, et al. (2008). "The Dickkopf-homolog 3 is expressed in tumor endothelial cells and supports capillary formation." Int J Cancer **122**(7): 1539-47.
- van de Wetering, M., E. Sancho, et al. (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." Cell **111**(2): 241-50.

- van Es, J. H., N. Barker, et al. (2003). "You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway." Curr Opin Genet Dev **13**(1): 28-33.
- Weerkamp, F., M. R. Baert, et al. (2006). "Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3322-6.
- Willert, K. and R. Nusse (1998). "Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling." Curr Opin Genet Dev **8**(1): 95-102.
- Willinger, T., T. Freeman, et al. (2006). "Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and in vivo." J Immunol **176**(3): 1439-46.
- Wodarz, A. and R. Nusse (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 59-88.
- Wu, B., S. P. Crampton, et al. (2007). "Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration." Immunity **26**(2): 227-39.
- Xu, Y., D. Banerjee, et al. (2003). "Deletion of beta-catenin impairs T cell development." Nat Immunol **4**(12): 1177-82.
- Yamada, S., K. Terada, et al. (2005). "Differentiation of adult hepatic stem-like cells into pancreatic endocrine cells." Cell Transplant **14**(9): 647-53.
- Yang, L., S. Li, et al. (2002). "In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8078-83.
- Young, C. S., M. Kitamura, et al. (1998). "Wnt-1 induces growth, cytosolic beta-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts." Mol Cell Biol **18**(5): 2474-85.
- Yu, Q. and J. M. Sen (2007). "Beta-catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment." J Immunol **178**(8): 5028-34.
- Yue, W., Q. Sun, et al. (2008). "Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer." Carcinogenesis **29**(1): 84-92.

Conclusion

En transplantation, des souris dépourvues de lymphocytes T sont capables de tolérer leur greffon, suggérant qu'ils sont les effecteurs majeurs du rejet de greffe (Bolton, Gracie et al. 1989). Afin d'activer un lymphocyte T de façon efficace, deux signaux sont nécessaires: un signal antigénique et un signal de costimulation. Le CD28 fait partie des molécules majeures nécessaires à l'induction du signal de costimulation. Dans notre équipe, notre stratégie a été de tester le blocage spécifique de la molécule CD28 dans un modèle d'allogreffe rénale, en utilisant un anticorps modulant anti-CD28, le clone JJ319, permettant ainsi la conservation de l'interaction CTLA-4/B7 et des signaux régulateurs nécessaires à l'induction de la tolérance.

Bien que le CD28 semble être important pour le développement de cellules T régulatrices, le blocage de l'interaction CD28/B7 par un anticorps anti-CD28 permet le développement de cellules non-T régulatrices dont le mécanisme de suppression a été étudié dans l'**article 1**.

Ces cellules non-T B7⁺ du sang, exprimant fortement CD172a et HIS48, sont désignées comme étant des MDSC capables de supprimer spécifiquement la réponse allogénique de lymphocytes T effecteurs par un mécanisme dépendant du NO. Des cellules avec un phénotype comparable sont retrouvées dans la rate et les ganglions mésentériques mais ne présentent pas de pouvoir régulateur *in vitro* et ne synthétisent pas de NO. La présence de cellules CD11b⁺ HIS48⁺ produisant NO au niveau des vaisseaux sanguins, suggère que les lymphocytes T alloréactifs activés des animaux tolérants seraient bloqués par la régulation locale occasionnée par les MDSC lors de leur migration transendothéliale au niveau du greffon.

Il reste cependant d'autres points intéressants à étudier et d'autres expérimentations à réaliser dans le but de comprendre plus précisément les mécanismes régulateurs de ces cellules tels que l'analyse des différentes interactions possibles entre lymphocytes T activés et MDSC ainsi que le rôle des MDSC dans le maintien de la tolérance *in vivo*.

Dans le but de mieux caractériser l'état de tolérance, nous avons analysé chez le rat le transcriptome d'allogreffes de rein tolérées à la suite d'un traitement d'induction par un anticorps anti-CD28. L'analyse des 433 gènes différemment exprimés entre les deux situations biologiques nous a conduit à étudier la voie de signalisation WNT et tout particulièrement la molécule DKK-3 connu pour être un régulateur de la voie et augmentée plus de 15 fois chez nos animaux tolérants. L'ARNm de Dkk-3 semble cependant spécifique

des allogreffes de rein dans la mesure où il n'est pas détecté dans des puces à ADN réalisées dans des modèles de tolérance à l'allogreffe de cœur chez le rat. Nos résultats, lors de cette étude, suggèrent que les cellules produisant DKK-3 migrent du sang vers le greffon pour agir directement au niveau du site de l'inflammation et réguler l'activation du système immunitaire. De plus, la construction d'un adénovirus recombinant de rat DKK-3 prolonge la survie d'une allogreffe de cœur chez le rat pour atteindre 20 jours. Les investigations sur le rôle de Dkk-3 dans la réponse immune à l'allogreffe seront poursuivies dans mon équipe de recherche avant leur publication.

Les résultats obtenus lors de ma thèse ont permis de mettre en évidence des mécanismes régulateurs induits par l'inhibition spécifique du CD28 dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat. La suppression occasionnée par la population de MDSC reste cependant à mieux définir. De même, l'analyse de la surexpression de la molécule DKK-3 suite à une allogreffe cardiaque chez le rat et l'induction de la tolérance reste à caractériser.

Bibliographie

- Abarzua, F., M. Sakaguchi, et al. (2007). "Heat shock proteins play a crucial role in tumor-specific apoptosis by REIC/Dkk-3." *Int J Mol Med* **20**(1): 37-43.
- Acuto, O., S. Mise-Omata, et al. (2003). "Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor." *Immunol Rev* **192**: 21-31.
- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." *Blood* **105**(4): 1815-22.
- Agnello, D., C. S. Lankford, et al. (2003). "Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights." *J Clin Immunol* **23**(3): 147-61.
- Ait-Oufella, H., B. L. Salomon, et al. (2006). "Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice." *Nat Med* **12**(2): 178-80.
- Akaike, T. and H. Maeda (2000). "Nitric oxide and virus infection." *Immunology* **101**(3): 300-8.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-68.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- Albina, J. E., M. D. Caldwell, et al. (1989). "Regulation of macrophage functions by L-arginine." *J Exp Med* **169**(3): 1021-9.
- Alegre, M. L., P. J. Noel, et al. (1996). "Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells." *J Immunol* **157**(11): 4762-70.
- Almand, B., J. I. Clark, et al. (2001). "Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer." *J Immunol* **166**(1): 678-89.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* **298**(5597): 1395-401.
- Angulo, I., J. Rullas, et al. (2000). "Early myeloid cells are high producers of nitric oxide upon CD40 plus IFN-gamma stimulation through a mechanism dependent on endogenous TNF-alpha and IL-1alpha." *Eur J Immunol* **30**(5): 1263-71.
- Anjos-Afonso, F. and D. Bonnet (2007). "Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment." *Blood* **109**(3): 1298-306.
- Apolloni, E., V. Bronte, et al. (2000). "Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes." *J Immunol* **165**(12): 6723-30.
- Arpinati, M., G. Chirumbolo, et al. (2003). "Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Transpl Immunol* **11**(3-4): 345-56.
- Aschenbrenner, K., L. M. D'Cruz, et al. (2007). "Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells." *Nat Immunol* **8**(4): 351-8.
- Ashour, H. M. and J. Y. Niederkorn (2006). "Gammadelta T cells promote anterior chamber-associated immune deviation and immune privilege through their production of IL-10." *J Immunol* **177**(12): 8331-7.

- Ashton-Chess, J., M. Giral, et al. (2007). "Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation." Transplantation **84**(10): 1215-9.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, et al. (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." Nat Immunol **2**(12): 1144-50.
- Auchincloss, H., Jr., R. Lee, et al. (1993). "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 **90**(8): 3373-7.
- Aulak, K. S., M. Miyagi, et al. (2001). "Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12056-61.
- Austyn, J. M. and C. P. Larsen (1990). "Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation." Transplantation **49**(1): 1-7.
- Azuma, H., A. Chandraker, et al. (1996). "Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12439-44.
- Baba, Y., T. Yokota, et al. (2006). "Constitutively active beta-catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture." J Immunol **177**(4): 2294-303.
- Babcock, T. A. and J. M. Carlin (2000). "Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells." Cytokine **12**(6): 588-94.
- Bacchetta, R., M. Bigler, et al. (1994). "High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells." J Exp Med **179**(2): 493-502.
- Bacchetta, R., L. Passerini, et al. (2006). "Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations." J Clin Invest **116**(6): 1713-22.
- Bacchetta, R., C. Sartirana, et al. (2002). "Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines." Eur J Immunol **32**(8): 2237-45.
- Baeten, D., S. Louis, et al. (2006). "Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients." J Am Soc Nephrol **17**(1): 294-304.
- Bafico, A., G. Liu, et al. (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." Nat Cell Biol **3**(7): 683-6.
- Baker, R. J., M. P. Hernandez-Fuentes, et al. (2001). "Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy." J Immunol **167**(12): 7199-206.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Barrantes Idel, B., A. Montero-Pedrazuela, et al. (2006). "Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice." Mol Cell Biol **26**(6): 2317-26.
- Barry, F. P., J. M. Murphy, et al. (2005). "Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft." Stem Cells Dev **14**(3): 252-65.
- Bartholomew, A., C. Sturgeon, et al. (2002). "Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo." Exp Hematol **30**(1): 42-8.
- Bashuda, H., M. Kimikawa, et al. (2005). "Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates." J Clin Invest **115**(7): 1896-902.
- Bauer, M., V. Redecke, et al. (2001). "Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells." J Immunol **166**(8): 5000-7.

- Bauer, T. M., L. P. Jiga, et al. (2005). "Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo." *Transpl Int* **18**(1): 95-100.
- Becker, S. and E. G. Daniel (1990). "Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production." *Cell Immunol* **129**(2): 351-62.
- Bendelac, A., M. N. Rivera, et al. (1997). "Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function." *Annu Rev Immunol* **15**: 535-62.
- Benichou, G. (1999). "Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection." *Front Biosci* **4**: D476-80.
- Benichou, G., A. Valujskikh, et al. (1999). "Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice." *J Immunol* **162**(1): 352-8.
- Benlagha, K., T. Kyin, et al. (2002). "A thymic precursor to the NK T cell lineage." *Science* **296**(5567): 553-5.
- Bevan, M. J. (1977). "In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells." *Nature* **269**(5627): 417-8.
- Beyersdorf, N., S. Gaupp, et al. (2005). "Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med* **202**(3): 445-55.
- Beyth, S., Z. Borovsky, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness." *Blood* **105**(5): 2214-9.
- Bhanot, P., M. Brink, et al. (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." *Nature* **382**(6588): 225-30.
- Bickerstaff, A. A., A. M. VanBuskirk, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta and interleukin-10 subvert alloreactive delayed type hypersensitivity in cardiac allograft acceptor mice." *Transplantation* **69**(7): 1517-20.
- Bieback, K., S. Kern, et al. (2004). "Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." *Stem Cells* **22**(4): 625-34.
- Billingham, R. E., L. Brent, et al. (1953). "Actively acquired tolerance of foreign cells." *Nature* **172**(4379): 603-6.
- Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, et al. (1998). "Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway." *J Immunol* **160**(12): 5729-34.
- Bjorndahl, J. M., S. S. Sung, et al. (1989). "Human T cell activation: differential response to anti-CD28 as compared to anti-CD3 monoclonal antibodies." *Eur J Immunol* **19**(5): 881-7.
- Blair, P. J., J. L. Riley, et al. (1998). "CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction." *J Immunol* **160**(1): 12-5.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, et al. (1999). "Opposing roles of CD28:B7 and CTLA-4:B7 pathways in regulating in vivo alloresponses in murine recipients of MHC disparate T cells." *J Immunol* **162**(11): 6368-77.
- Boasso, A., J. P. Herbeuval, et al. (2005). "Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells." *Blood* **105**(4): 1574-81.
- Bobbe, P., K. Benihoud, et al. (1999). "Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction." *Blood* **94**(3): 1028-37.

- Boden, E., Q. Tang, et al. (2003). "The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Novartis Found Symp* **252**: 55-63; discussion 63-6, 106-14.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." *Nat Immunol* **2**(10): 907-16.
- Boise, L. H., A. J. Minn, et al. (1995). "Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5491-5.
- Boise, L. H., A. J. Minn, et al. (1995). "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." *Immunity* **3**(1): 87-98.
- Bolton, E. M., J. A. Gracie, et al. (1989). "Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat." *J Exp Med* **169**(6): 1931-46.
- Bonecchi, R., S. Sozzani, et al. (1998). "Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses." *Blood* **92**(8): 2668-71.
- Bonneville, M., J. F. Moreau, et al. (1988). "T lymphocyte cloning from rejected human kidney allograft. Recognition repertoire of alloreactive T cell clones." *J Immunol* **141**(12): 4187-95.
- Boonen, G. J., A. M. van Dijk, et al. (1999). "CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes." *Eur J Immunol* **29**(3): 789-98.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, et al. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." *J Exp Med* **197**(1): 101-9.
- Bouso, P., N. R. Bhakta, et al. (2002). "Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy." *Science* **296**(5574): 1876-80.
- Bradshaw, J. D., P. Lu, et al. (1997). "Interaction of the cytoplasmic tail of CTLA-4 (CD152) with a clathrin-associated protein is negatively regulated by tyrosine phosphorylation." *Biochemistry* **36**(50): 15975-82.
- Braud, C., D. Baeten, et al. (2007). "Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: I. blood gene expression statistical analysis." *J Cell Biochem*.
- Braudeau, C., M. Racape, et al. (2007). "Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome." *Transpl Int* **20**(10): 845-55.
- Brennan, K., J. M. Gonzalez-Sancho, et al. (2004). "Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins." *Oncogene* **23**(28): 4873-84.
- Brenner, M. B., J. McLean, et al. (1986). "Identification of a putative second T-cell receptor." *Nature* **322**(6075): 145-9.
- Brito, C., M. Naviliat, et al. (1999). "Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death." *J Immunol* **162**(6): 3356-66.
- Bronte, V., E. Apolloni, et al. (2000). "Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells." *Blood* **96**(12): 3838-46.
- Bronte, V., D. B. Chappell, et al. (1999). "Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation." *J Immunol* **162**(10): 5728-37.

- Bronte, V., T. Kasic, et al. (2005). "Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers." *J Exp Med* **201**(8): 1257-68.
- Bronte, V., P. Serafini, et al. (2003). "IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* **170**(1): 270-8.
- Bronte, V., M. Wang, et al. (1998). "Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells." *J Immunol* **161**(10): 5313-20.
- Bronte, V. and P. Zanovello (2005). "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 641-54.
- Brooks, J. C. and D. W. Hoskin (1994). "The inhibitory effect of cyclophosphamide-induced MAC-1+ natural suppressor cells on IL-2 and IL-4 utilization in MLR." *Transplantation* **58**(10): 1096-103.
- Brouard, S., A. Dupont, et al. (2005). "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation." *Am J Transplant* **5**(2): 330-40.
- Brown, J. D. and R. T. Moon (1998). "Wnt signaling: why is everything so negative?" *Curr Opin Cell Biol* **10**(2): 182-7.
- Bruder, D., M. Probst-Kepper, et al. (2004). "Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells." *Eur J Immunol* **34**(3): 623-30.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* **27**(1): 68-73.
- Brunner, M. C., C. A. Chambers, et al. (1999). "CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation." *J Immunol* **162**(10): 5813-20.
- Buhler, L. H., T. R. Spitzer, et al. (2002). "Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease." *Transplantation* **74**(10): 1405-9.
- Bunt, S. K., L. Yang, et al. (2007). "Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression." *Cancer Res* **67**(20): 10019-26.
- Cadigan, K. M. and R. Nusse (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." *Genes Dev* **11**(24): 3286-305.
- Cadore, A., C. Ovejero, et al. (2001). "Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin." *Cancer Res* **61**(8): 3245-9.
- Caricasole, A., T. Ferraro, et al. (2003). "Functional characterization of WNT7A signaling in PC12 cells: interaction with A FZD5 x LRP6 receptor complex and modulation by Dickkopf proteins." *J Biol Chem* **278**(39): 37024-31.
- Carreno, B. M., F. Bennett, et al. (2000). "CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression." *J Immunol* **165**(3): 1352-6.
- Carrier, Y., J. Yuan, et al. (2007). "Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice." *J Immunol* **178**(1): 179-85.
- Carroll, R. G., J. L. Riley, et al. (1997). "Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells." *Science* **276**(5310): 273-6.
- Cauley, L. S., E. E. Miller, et al. (2000). "Superantigen-induced CD4 T cell tolerance mediated by myeloid cells and IFN-gamma." *J Immunol* **165**(11): 6056-66.
- Cavani, A., F. Nasorri, et al. (2000). "Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses." *J Invest Dermatol* **114**(2): 295-302.

- Cederbom, L., H. Hall, et al. (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." *Eur J Immunol* **30**(6): 1538-43.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, et al. (2003). "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." *Nat Cell Biol* **5**(7): 675-9.
- Cella, M., F. Facchetti, et al. (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." *Nat Immunol* **1**(4): 305-10.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." *Nat Med* **5**(8): 919-23.
- Chai, J. G., I. Bartok, et al. (1999). "Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo." *Eur J Immunol* **29**(2): 686-92.
- Chambers, C. A., M. S. Kuhns, et al. (2001). "CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy." *Annu Rev Immunol* **19**: 565-94.
- Chambers, C. A., T. J. Sullivan, et al. (1997). "Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells." *Immunity* **7**(6): 885-95.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, et al. (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." *Nat Immunol* **3**(3): 237-43.
- Chang, M. D., J. W. Pollard, et al. (1993). "Mouse placental macrophages have a decreased ability to present antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(2): 462-6.
- Chen, A. E., D. D. Ginty, et al. (2005). "Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins." *Nature* **433**(7023): 317-22.
- Chen, W., J. Diao, et al. (2007). "Both infiltrating regulatory T cells and insufficient antigen presentation are involved in long-term cardiac xenograft survival." *J Immunol* **179**(3): 1542-8.
- Chen, W., M. S. Ford, et al. (2003). "Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival." *J Immunol* **170**(4): 1846-53.
- Chen, W., M. S. Ford, et al. (2003). "Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice." *Transplant Proc* **35**(7): 2479-80.
- Chen, W., M. S. Ford, et al. (2004). "The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses." *Cell Mol Immunol* **1**(5): 328-35.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* **198**(12): 1875-86.
- Chen, Y., J. Inobe, et al. (1995). "Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression." *J Immunol* **155**(2): 910-6.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." *Science* **265**(5176): 1237-40.
- Chess, L. and H. Jiang (2004). "Resurrecting CD8+ suppressor T cells." *Nat Immunol* **5**(5): 469-71.
- Chua, K. F., F. W. Alt, et al. (2002). "The function of AID in somatic mutation and class switch recombination: upstream or downstream of DNA breaks." *J Exp Med* **195**(9): F37-41.
- Chuang, E., K. M. Lee, et al. (1999). "Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases." *J Immunol* **162**(3): 1270-7.
- Cilio, C. M., M. R. Daws, et al. (1998). "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 is induced in the thymus upon in vivo activation and its blockade prevents anti-CD3-mediated depletion of thymocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1239-46.

- Ciubotariu, R., J. Li, et al. (2001). "Human xenospecific T suppressor cells inhibit T helper cell proliferation to porcine aortic endothelial cells, and NF-kappaB activity in porcine APC." *Hum Immunol* **62**(5): 470-8.
- Ciubotariu, R., Z. Liu, et al. (1998). "Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts." *J Clin Invest* **101**(2): 398-405.
- Collins, R. A., D. Werling, et al. (1998). "Gammadelta T cells present antigen to CD4+ alphabeta T cells." *J Leukoc Biol* **63**(6): 707-14.
- Colovai, A. I., Z. Liu, et al. (2000). "Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells." *Transplantation* **69**(7): 1304-10.
- Colovai, A. I., M. Mirza, et al. (2003). "Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients." *Hum Immunol* **64**(1): 31-7.
- Colson, Y. L., A. Y. Abou El-Ezz, et al. (1999). "Positive and negative selection of alphabetaTCR+ T cells in thymectomized adult radiation bone marrow chimeras." *Transplantation* **68**(3): 403-10.
- Corcione, A., F. Benvenuto, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions." *Blood* **107**(1): 367-72.
- Cortesini, R., J. LeMaout, et al. (2001). "CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity." *Immunol Rev* **182**: 201-6.
- Cortesini, R. and N. Suci-Foca (2004). "The concept of "partial" clinical tolerance." *Transpl Immunol* **13**(2): 101-4.
- Cottrez, F. and H. Groux (2004). "Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells." *Transplantation* **77**(1 Suppl): S12-5.
- Cottrez, F., S. D. Hurst, et al. (2000). "T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo." *J Immunol* **165**(9): 4848-53.
- Coupel, S., M. Giral-Classe, et al. (2003). "Ten-year survival of second kidney transplants: impact of immunologic factors and renal function at 12 months." *Kidney Int* **64**(2): 674-80.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2002). "CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy." *Curr Opin Immunol* **14**(6): 771-8.
- Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, et al. (2004). "CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion." *J Immunol* **173**(12): 7259-68.
- Curotto de Lafaille, M. A., S. Muriglan, et al. (2001). "Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes." *J Exp Med* **194**(9): 1349-59.
- Cuturi, M. C., R. Josien, et al. (1994). "Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats." *Eur J Immunol* **24**(7): 1627-31.
- Dai, W. and S. L. Gupta (1990). "Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha." *J Biol Chem* **265**(32): 19871-7.
- Dai, Z., B. T. Konieczny, et al. (1998). "Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice." *J Immunol* **161**(4): 1659-63.
- Damle, N. K., L. V. Doyle, et al. (1988). "Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes." *J Immunol* **140**(6): 1753-61.
- Daniel, C., S. Horvath, et al. (1998). "A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR." *Immunity* **8**(5): 543-52.

- de Waal Malefyt, R., C. G. Figdor, et al. (1993). "Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10." *J Immunol* **151**(11): 6370-81.
- Deans, R. J. and A. B. Moseley (2000). "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses." *Exp Hematol* **28**(8): 875-84.
- Degauque, N., D. Lair, et al. (2007). "Development of CD25- regulatory T cells following heart transplantation: evidence for transfer of long-term survival." *Eur J Immunol* **37**(1): 147-56.
- Degauque, N., D. Lair, et al. (2006). "Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells." *J Immunol* **176**(7): 3915-22.
- Dengler, T. J., G. Szabo, et al. (1999). "Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation." *Transplantation* **67**(3): 392-8.
- Derbinski, J., J. Gabler, et al. (2005). "Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels." *J Exp Med* **202**(1): 33-45.
- Devitt, A., O. D. Moffatt, et al. (1998). "Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells." *Nature* **392**(6675): 505-9.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, et al. (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." *Blood* **99**(10): 3838-43.
- Diehn, M., A. A. Alizadeh, et al. (2002). "Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11796-801.
- Ding, L. and E. M. Shevach (1994). "Activation of CD4+ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation)." *Eur J Immunol* **24**(4): 859-66.
- Djouad, F., P. Ponce, et al. (2003). "Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals." *Blood* **102**(10): 3837-44.
- Dong, V. M., X. Yuan, et al. (2002). "Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection." *Transplantation* **73**(8): 1310-7.
- Du, S. J., S. M. Purcell, et al. (1995). "Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2625-34.
- Dzionek, A., Y. Inagaki, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions." *Hum Immunol* **63**(12): 1133-48.
- Dzionek, A., Y. Sohma, et al. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." *J Exp Med* **194**(12): 1823-34.
- Eastman, Q. and R. Grosschedl (1999). "Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals." *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 233-40.
- Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." *Immunity* **16**(1): 23-35.
- Egen, J. G., M. S. Kuhns, et al. (2002). "CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy." *Nat Immunol* **3**(7): 611-8.
- Egerton, M., R. Scollay, et al. (1990). "Kinetics of mature T-cell development in the thymus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(7): 2579-82.

- Ezernitchi, A. V., I. Vaknin, et al. (2006). "TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs." *J Immunol* **177**(7): 4763-72.
- Fallarino, F., C. Asselin-Paturel, et al. (2004). "Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement." *J Immunol* **173**(6): 3748-54.
- Fallarino, F., S. Gizzi, et al. (2007). "Tryptophan catabolism in IDO+ plasmacytoid dendritic cells." *Curr Drug Metab* **8**(3): 209-16.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1206-12.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2002). "T cell apoptosis by tryptophan catabolism." *Cell Death Differ* **9**(10): 1069-77.
- Fallarino, F., C. Vacca, et al. (2002). "Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells." *Int Immunol* **14**(1): 65-8.
- Fangmann, J., R. Dalchau, et al. (1992). "Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides." *J Exp Med* **175**(6): 1521-9.
- Faria, A. M. and H. L. Weiner (2005). "Oral tolerance." *Immunol Rev* **206**: 232-59.
- Ferber, I., G. Schonrich, et al. (1994). "Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen." *Science* **263**(5147): 674-6.
- Ferkol, T., E. Eckman, et al. (2000). "Transport of bifunctional proteins across respiratory epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor." *Am J Respir Crit Care Med* **161**(3 Pt 1): 944-51.
- Fibbe, W. E., A. J. Nauta, et al. (2007). "Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells." *Ann N Y Acad Sci* **1106**: 272-8.
- Field, E. H., D. Matesic, et al. (2001). "CD4+CD25+ regulatory cells in acquired MHC tolerance." *Immunol Rev* **182**: 99-112.
- Finger, E. B. and J. A. Bluestone (2002). "When ligand becomes receptor--tolerance via B7 signaling on DCs." *Nat Immunol* **3**(11): 1056-7.
- Fischer, K., S. Voelkl, et al. (2005). "Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells." *Blood* **105**(7): 2828-35.
- Fjeld, K., P. Kettunen, et al. (2005). "Dynamic expression of Wnt signaling-related Dickkopf1, -2, and -3 mRNAs in the developing mouse tooth." *Dev Dyn* **233**(1): 161-6.
- Fluck, N., O. Witzke, et al. (1999). "Indirect allorecognition is involved in both acute and chronic allograft rejection." *Transplant Proc* **31**(1-2): 842-3.
- Fontenot, J. D., J. L. Dooley, et al. (2005). "Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny." *J Exp Med* **202**(7): 901-6.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-6.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, et al. (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." *Nat Immunol* **6**(11): 1142-51.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, et al. (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." *Immunity* **22**(3): 329-41.
- Forster, I., R. Hirose, et al. (1995). "Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen." *Immunity* **2**(6): 573-85.
- Freedman, A. S., G. Freeman, et al. (1987). "B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells." *J Immunol* **139**(10): 3260-7.

- Freedman, B. D., Q. H. Liu, et al. (1999). "Receptor avidity and costimulation specify the intracellular Ca²⁺ signaling pattern in CD4(+)CD8(+) thymocytes." *J Exp Med* **190**(7): 943-52.
- Freeman, G. J., J. G. Gribben, et al. (1993). "Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation." *Science* **262**(5135): 909-11.
- Friberg, M., R. Jennings, et al. (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection." *Int J Cancer* **101**(2): 151-5.
- Frumento, G., R. Rotondo, et al. (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Exp Med* **196**(4): 459-68.
- Fu, F., Y. Li, et al. (1996). "Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients." *Transplantation* **62**(5): 659-65.
- Fujigaki, S., K. Saito, et al. (2001). "Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism." *Eur J Immunol* **31**(8): 2313-8.
- Fukaura, H., S. C. Kent, et al. (1996). "Antigen-specific TGF-beta1 secretion with bovine myelin oral tolerization in multiple sclerosis." *Ann N Y Acad Sci* **778**: 251-7.
- Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, et al. (2002). "Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function." *J Exp Med* **196**(6): 851-7.
- Furtado, G. C., D. Olivares-Villagomez, et al. (2001). "Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis." *Immunol Rev* **182**: 122-34.
- Gabrilovich, D. (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." *Nat Rev Immunol* **4**(12): 941-52.
- Gabrilovich, D. I. (2007). "Molecular mechanisms and therapeutic reversal of immune suppression in cancer." *Curr Cancer Drug Targets* **7**(1): 1.
- Gabrilovich, D. I., M. P. Velders, et al. (2001). "Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells." *J Immunol* **166**(9): 5398-406.
- Gallina, G., L. Dolcetti, et al. (2006). "Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells." *J Clin Invest* **116**(10): 2777-90.
- Gang, E. J., D. Bosnakovski, et al. (2007). "SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow." *Blood* **109**(4): 1743-51.
- Gao, J. L., T. A. Wynn, et al. (1997). "Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1." *J Exp Med* **185**(11): 1959-68.
- Gavanescu, I., B. Kessler, et al. (2007). "Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11): 4583-7.
- Gershon, R. K. (1975). "A disquisition on suppressor T cells." *Transplant Rev* **26**: 170-85.
- Ghansah, T., K. H. Paraiso, et al. (2004). "Expansion of myeloid suppressor cells in SHIP-deficient mice represses allogeneic T cell responses." *J Immunol* **173**(12): 7324-30.
- Ghiringhelli, F., C. Menard, et al. (2005). "CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner." *J Exp Med* **202**(8): 1075-85.
- Glennie, S., I. Soeiro, et al. (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells." *Blood* **105**(7): 2821-7.
- Glinka, A., W. Wu, et al. (1998). "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." *Nature* **391**(6665): 357-62.
- Goerdts, S. and C. E. Orfanos (1999). "Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells." *Immunity* **10**(2): 137-42.

- Goldrath, A. W. and M. J. Bevan (1999). "Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire." *Nature* **402**(6759): 255-62.
- Goni, O., P. Alcaide, et al. (2002). "Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells." *Int Immunol* **14**(10): 1125-34.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." *Nat Rev Immunol* **3**(1): 23-35.
- Gordon, S., I. Fraser, et al. (1992). "Macrophages in tissues and in vitro." *Curr Opin Immunol* **4**(1): 25-32.
- Gounari, F., I. Aifantis, et al. (2001). "Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development." *Nat Immunol* **2**(9): 863-9.
- Graca, L., S. P. Cobbold, et al. (2002). "Identification of regulatory T cells in tolerated allografts." *J Exp Med* **195**(12): 1641-6.
- Graca, L., S. Thompson, et al. (2002). "Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance." *J Immunol* **168**(11): 5558-65.
- Gray, D. H., N. Seach, et al. (2006). "Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells." *Blood* **108**(12): 3777-85.
- Greenfield, E. A., K. A. Nguyen, et al. (1998). "CD28/B7 costimulation: a review." *Crit Rev Immunol* **18**(5): 389-418.
- Greenwald, R. J., V. A. Boussiotis, et al. (2001). "CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo." *Immunity* **14**(2): 145-55.
- Gregorieff, A. and H. Clevers (2005). "Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer." *Genes Dev* **19**(8): 877-90.
- Gregory, C. D. (2000). "CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system." *Curr Opin Immunol* **12**(1): 27-34.
- Grohmann, U., C. Orabona, et al. (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." *Nat Immunol* **3**(11): 1097-101.
- Gross, J. A., E. Callas, et al. (1992). "Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse." *J Immunol* **149**(2): 380-8.
- Grotewold, L. and U. Ruther (2002). "The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death." *Embo J* **21**(5): 966-75.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* **185**(6): 1101-11.
- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389**(6652): 737-42.
- Guidos, C. (2006). "Thymus and T-lymphocyte development: what is new in the 21st century?" *Immunol Rev* **209**: 5-9.
- Guillonnet, C., V. Aubry, et al. (2005). "Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade." *Transplantation* **80**(4): 546-54.
- Guillonnet, C., M. Hill, et al. (2007). "CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Clin Invest* **117**(4): 1096-106.
- Guillonnet, C., C. Seveno, et al. (2007). "Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients." *J Immunol* **179**(12): 8164-71.
- Guillot, C., C. Guillonnet, et al. (2002). "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* **168**(4): 1600-9.

- Guillot, C., S. Menoret, et al. (2003). "Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig." *Blood* **101**(8): 3325-33.
- Hackstein, H., A. E. Morelli, et al. (2001). "Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles." *Trends Immunol* **22**(8): 437-42.
- Hall, B. M., N. W. Pearce, et al. (1990). "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action." *J Exp Med* **171**(1): 141-57.
- Hara, M., C. I. Kingsley, et al. (2001). "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." *J Immunol* **166**(6): 3789-96.
- Harding, F. A., J. G. McArthur, et al. (1992). "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." *Nature* **356**(6370): 607-9.
- Harrison, L. C., M. Dempsey-Collier, et al. (1996). "Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes." *J Exp Med* **184**(6): 2167-74.
- Haspot, F., C. Seveno, et al. (2005). "Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells." *Am J Transplant* **5**(10): 2339-48.
- Haspot, F., F. Villemain, et al. (2002). "Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses." *Blood* **99**(6): 2228-34.
- Hassanain, H. H., S. Y. Chon, et al. (1993). "Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor." *J Biol Chem* **268**(7): 5077-84.
- Hathcock, K. S., G. Laszlo, et al. (1994). "Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function." *J Exp Med* **180**(2): 631-40.
- Hawiger, D., K. Inaba, et al. (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." *J Exp Med* **194**(6): 769-79.
- Hawrylowicz, C. M. and A. O'Garra (2005). "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma." *Nat Rev Immunol* **5**(4): 271-83.
- He, X., M. Semenov, et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." *Development* **131**(8): 1663-77.
- Heeger, P. S. (2003). "T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update." *Am J Transplant* **3**(5): 525-33.
- Hermann, M., D. Pirkebner, et al. (2007). "Dickkopf-3 is expressed in a subset of adult human pancreatic beta cells." *Histochem Cell Biol* **127**(5): 513-21.
- Hernandez-Fuentes, M. P. and R. I. Lechler (2005). "Chronic graft loss. Immunological and non-immunological factors." *Contrib Nephrol* **146**: 54-64.
- Herold, K. C., J. Lu, et al. (1997). "Regulation of C-C chemokine production by murine T cells by CD28/B7 costimulation." *J Immunol* **159**(9): 4150-3.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, et al. (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." *J Immunol* **173**(8): 4828-37.
- Hesse, M., M. Modolell, et al. (2001). "Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism." *J Immunol* **167**(11): 6533-44.
- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, et al. (1987). "Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite." *Science* **235**(4787): 473-6.

- Hill, M., R. Zagani, et al. (2007). "Nitric oxide and indoleamine 2,3-dioxygenase mediate CTLA4Ig-induced survival in heart allografts in rats." *Transplantation* **84**(8): 1060-3.
- Hoang, B. H., T. Kubo, et al. (2004). "Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway." *Cancer Res* **64**(8): 2734-9.
- Hogger, P., J. Dreier, et al. (1998). "Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163)." *J Immunol* **161**(4): 1883-90.
- Hogquist, K. A. and M. J. Bevan (1996). "The nature of the peptide/MHC ligand involved in positive selection." *Semin Immunol* **8**(2): 63-8.
- Holan, V., J. Pindjakova, et al. (2006). "Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism." *Transplantation* **81**(12): 1708-15.
- Holmdahl, R., M. Andersson, et al. (1990). "Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis." *Immunol Rev* **118**: 193-232.
- Holscher, C., R. A. Atkinson, et al. (2001). "A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection." *J Immunol* **167**(12): 6957-66.
- Holt, P. G., M. A. Schon-Hegrad, et al. (1988). "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* **167**(2): 262-74.
- Hombach, A. A., D. Kofler, et al. (2007). "Effective proliferation of human regulatory T cells requires a strong costimulatory CD28 signal that cannot be substituted by IL-2." *J Immunol* **179**(11): 7924-31.
- Honjo, K., X. Xu, et al. (2004). "CD4+ T-cell receptor transgenic T cells alone can reject vascularized heart transplants through the indirect pathway of alloantigen recognition." *Transplantation* **77**(3): 452-5.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Hornick, P. I., P. D. Mason, et al. (2000). "Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection." *Circulation* **101**(20): 2405-10.
- Hornick, P. I., P. D. Mason, et al. (1998). "Assessment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejection in humans." *Circulation* **97**(13): 1257-63.
- Hourmant, M., A. Cesbron-Gautier, et al. (2005). "Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation." *J Am Soc Nephrol* **16**(9): 2804-12.
- Hu, D., K. Ikizawa, et al. (2004). "Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice." *Nat Immunol* **5**(5): 516-23.
- Huang, B., P. Y. Pan, et al. (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." *Cancer Res* **66**(2): 1123-31.
- Huang, C. A., Y. Fuchimoto, et al. (2000). "Stable mixed chimerism and tolerance using a nonmyeloablative preparative regimen in a large-animal model." *J Clin Invest* **105**(2): 173-81.
- Huang, C. T., C. J. Workman, et al. (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." *Immunity* **21**(4): 503-13.
- Huang, D., D. T. Cai, et al. (2008). "Nitric-oxide synthase 2 interacts with CD74 and inhibits its cleavage by caspase during dendritic cell development." *J Biol Chem* **283**(3): 1713-22.

- Huang, J., P. F. Lo, et al. (2002). "CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9369-73.
- Huang, J. F., Y. Yang, et al. (1999). "TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells." *Science* **286**(5441): 952-4.
- Huang, Z., H. Xie, et al. (2006). "Transcriptional regulation of CD4 gene expression by T cell factor-1/beta-catenin pathway." *J Immunol* **176**(8): 4880-7.
- Hundt, M., H. Tabata, et al. (2006). "Impaired activation and localization of LAT in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect." *Immunity* **24**(5): 513-22.
- Hunig, T. (2007). "Manipulation of regulatory T-cell number and function with CD28-specific monoclonal antibodies." *Adv Immunol* **95**: 111-48.
- Hunig, T. and K. Dennehy (2005). "CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential." *Immunol Lett* **100**(1): 21-8.
- Hurwitz, A. A., T. J. Sullivan, et al. (1997). "Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **73**(1-2): 57-62.
- Hwu, P., M. X. Du, et al. (2000). "Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation." *J Immunol* **164**(7): 3596-9.
- Iida, T., H. Ohno, et al. (2000). "Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells." *J Immunol* **165**(9): 5062-8.
- Ikeda, S., S. Kishida, et al. (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin." *Embo J* **17**(5): 1371-84.
- Ikemizu, S., R. J. Gilbert, et al. (2000). "Structure and dimerization of a soluble form of B7-1." *Immunity* **12**(1): 51-60.
- Imai, T., M. Nagira, et al. (1999). "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine." *Int Immunol* **11**(1): 81-8.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, et al. (2004). "Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta." *Stem Cells* **22**(7): 1338-45.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, et al. (2003). "Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation." *Blood* **102**(4): 1548-9.
- Inaba, K., S. Turley, et al. (1998). "Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells." *J Exp Med* **188**(11): 2163-73.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, et al. (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." *J Exp Med* **180**(5): 1849-60.
- Ioannidis, V., F. Beermann, et al. (2001). "The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival." *Nat Immunol* **2**(8): 691-7.
- Ito, T., M. Inaba, et al. (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." *J Immunol* **163**(3): 1409-19.
- Iwashima, M., B. A. Irving, et al. (1994). "Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases." *Science* **263**(5150): 1136-9.
- Jenkins, M. K. and R. H. Schwartz (1987). "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo." *J Exp Med* **165**(2): 302-19.
- Jiang, H. and L. Chess (2000). "The specific regulation of immune responses by CD8+ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1." *Annu Rev Immunol* **18**: 185-216.

- Jiang, H., S. I. Zhang, et al. (1992). "Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." *Science* **256**(5060): 1213-5.
- Jiang, S., O. Herrera, et al. (2004). "New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance." *Curr Opin Immunol* **16**(5): 550-7.
- Jiang, S., S. Tugulea, et al. (1998). "Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro." *Hum Immunol* **59**(11): 690-9.
- Jiang, X., T. Shimaoka, et al. (2005). "Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance." *J Immunol* **175**(4): 2051-5.
- Jones, R. G., A. R. Elford, et al. (2002). "CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly." *J Exp Med* **196**(3): 335-48.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." *J Exp Med* **192**(9): 1213-22.
- Josien, R., P. Douillard, et al. (1998). "A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance." *J Clin Invest* **102**(11): 1920-6.
- Jovanovic, V., A. S. Dugast, et al. (2008). "Implication of matrix metalloproteinase 7 and the noncanonical wingless-type signaling pathway in a model of kidney allograft tolerance induced by the administration of anti-donor class II antibodies." *J Immunol* **180**(3): 1317-25.
- Jovanovic, V., D. Lair, et al. (2007). "Transfer of tolerance to heart and kidney allografts in the rat model." *Transpl Int*.
- Kambayashi, T., C. O. Jacob, et al. (1996). "IL-4 and IL-13 modulate IL-10 release in endotoxin-stimulated murine peritoneal mononuclear phagocytes." *Cell Immunol* **171**(1): 153-8.
- Kane, L. P., J. Lin, et al. (2002). "It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation." *Trends Immunol* **23**(8): 413-20.
- Kano, J., T. Ishiyama, et al. (2008). "Differentially expressed genes in a porcine adult hepatic stem-like cell line and their expression in developing and regenerating liver." *Lab Invest* **88**(2): 132-43.
- Karandikar, N. J., C. L. Vanderlugt, et al. (1998). "Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease." *J Neuroimmunol* **89**(1-2): 10-8.
- Kawai, K., A. Shahinian, et al. (1996). "Skin allograft rejection in CD28-deficient mice." *Transplantation* **61**(3): 352-5.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, et al. (1995). "Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys." *Transplantation* **59**(2): 256-62.
- Kawano, Y., M. Kitaoka, et al. (2006). "Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3." *Oncogene* **25**(49): 6528-37.
- Kawano, Y. and R. Kypta (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." *J Cell Sci* **116**(Pt 13): 2627-34.
- Khan, Q., J. M. Penninger, et al. (1999). "Regulation of apoptosis in mature alphabeta+CD4-CD8- antigen-specific suppressor T cell clones." *J Immunol* **162**(10): 5860-7.
- Kilshaw, P. J., L. Brent, et al. (1975). "Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts." *Nature* **255**(5508): 489-91.
- Kingsley, C. I., M. Karim, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." *J Immunol* **168**(3): 1080-6.
- Kishimoto, H. and J. Sprent (1999). "Strong TCR ligation without costimulation causes rapid onset of Fas-dependent apoptosis of naive murine CD4+ T cells." *J Immunol* **163**(4): 1817-26.

- Kissmeyer-Nielsen, F., S. Olsen, et al. (1966). "Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells." *Lancet* **2**(7465): 662-5.
- Kitani, A., K. Chua, et al. (2000). "Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells." *J Immunol* **165**(2): 691-702.
- Kiyomoto, T., T. Ito, et al. (2005). "The potent role of graft-derived NKR-P1+TCRalpha+ T (NKT) cells in the spontaneous acceptance of rat liver allografts." *Transplantation* **80**(12): 1749-55.
- Koblish, H. K., C. A. Hunter, et al. (1998). "Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon gamma induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect." *J Exp Med* **188**(9): 1603-10.
- Kodelja, V., C. Muller, et al. (1998). "Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern." *J Immunol* **160**(3): 1411-8.
- Koh, D. R., W. P. Fung-Leung, et al. (1992). "Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice." *Science* **256**(5060): 1210-3.
- Kolb, H. and V. Kolb-Bachofen (1998). "Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator?" *Immunol Today* **19**(12): 556-61.
- Konieczny, B. T., Z. Dai, et al. (1998). "IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways." *J Immunol* **160**(5): 2059-64.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." *Science* **275**(5307): 1784-7.
- Kovacs, B., R. V. Parry, et al. (2005). "Ligation of CD28 by its natural ligand CD86 in the absence of TCR stimulation induces lipid raft polarization in human CD4 T cells." *J Immunol* **175**(12): 7848-54.
- Krabbe, C., J. Zimmer, et al. (2005). "Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells-- a critical review." *Apmis* **113**(11-12): 831-44.
- Krampera, M., S. Glennie, et al. (2003). "Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide." *Blood* **101**(9): 3722-9.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, et al. (2002). "Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion." *J Immunol* **169**(11): 6154-61.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, et al. (2002). "Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition." *Nat Med* **8**(3): 233-9.
- Kristiansen, M., J. H. Graversen, et al. (2001). "Identification of the haemoglobin scavenger receptor." *Nature* **409**(6817): 198-201.
- Kronenberg, M. (2005). "Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes." *Annu Rev Immunol* **23**: 877-900.
- Kronin, V., K. Winkel, et al. (1996). "A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production." *J Immunol* **157**(9): 3819-27.
- Kronin, V., L. Wu, et al. (2000). "DEC-205 as a marker of dendritic cells with regulatory effects on CD8 T cell responses." *Int Immunol* **12**(5): 731-5.
- Krummel, M. F. and J. P. Allison (1996). "CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells." *J Exp Med* **183**(6): 2533-40.

- Krupnick, A. S., A. E. Gelman, et al. (2005). "Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells." *J Immunol* **175**(10): 6265-70.
- Krupnik, V. E., J. D. Sharp, et al. (1999). "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family." *Gene* **238**(2): 301-13.
- Kuhl, M., L. C. Sheldahl, et al. (2000). "The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." *Trends Genet* **16**(7): 279-83.
- Kukreja, A., G. Costi, et al. (2002). "NKT cell defects in NOD mice suggest therapeutic opportunities." *J Autoimmun* **19**(3): 117-28.
- Kurella, S., J. C. Yaciuk, et al. (2005). "Transcriptional modulation of TCR, Notch and Wnt signaling pathways in SEB-energized CD4+ T cells." *Genes Immun* **6**(7): 596-608.
- Kuroda, N., T. Mitani, et al. (2005). "Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice." *J Immunol* **174**(4): 1862-70.
- Kurts, C., W. R. Heath, et al. (1998). "The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1)." *J Exp Med* **188**(2): 415-20.
- Kurts, C., H. Kosaka, et al. (1997). "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells." *J Exp Med* **186**(2): 239-45.
- Kusmartsev, S., F. Cheng, et al. (2003). "All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination." *Cancer Res* **63**(15): 4441-9.
- Kusmartsev, S. and D. I. Gabrilovich (2003). "Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species." *J Leukoc Biol* **74**(2): 186-96.
- Kusmartsev, S., Y. Nefedova, et al. (2004). "Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species." *J Immunol* **172**(2): 989-99.
- Kusmartsev, S. A., Y. Li, et al. (2000). "Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation." *J Immunol* **165**(2): 779-85.
- Kyewski, B. and J. Derbinski (2004). "Self-representation in the thymus: an extended view." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 688-98.
- Lafferty, K. J., A. Bootes, et al. (1976). "Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice." *Transplantation* **22**(2): 138-49.
- Laflamme, M. A. and C. E. Murry (2005). "Regenerating the heart." *Nat Biotechnol* **23**(7): 845-56.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, et al. (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." *Nat Med* **6**(6): 686-8.
- Lamb, J. R., B. J. Skidmore, et al. (1983). "Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin." *J Exp Med* **157**(5): 1434-47.
- Lanzavecchia, A., S. Abrignani, et al. (1988). "Antibodies as antigens. The use of mouse monoclonal antibodies to focus human T cells against selected targets." *J Exp Med* **167**(2): 345-52.
- Lanzavecchia, A., G. Lezzi, et al. (1999). "From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior." *Cell* **96**(1): 1-4.
- Laskowski, I. A., J. Pratschke, et al. (2002). "Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats." *J Am Soc Nephrol* **13**(2): 519-27.

- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient." *J Exp Med* **156**(6): 1835-41.
- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells." *J Exp Med* **155**(1): 31-41.
- Lee, C. G., R. J. Homer, et al. (2001). "Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1)." *J Exp Med* **194**(6): 809-21.
- Lee, G. K., H. J. Park, et al. (2002). "Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division." *Immunology* **107**(4): 452-60.
- Lee, J., H. Ryu, et al. (2003). "Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4843-8.
- Lee, K. M., E. Chuang, et al. (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." *Science* **282**(5397): 2263-6.
- Lee, M. K. t., D. J. Moore, et al. (2004). "Promotion of allograft survival by CD4+CD25+ regulatory T cells: evidence for in vivo inhibition of effector cell proliferation." *J Immunol* **172**(11): 6539-44.
- Lejeune, P., P. Lagadec, et al. (1994). "Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression." *J Immunol* **152**(10): 5077-83.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, et al. (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." *Annu Rev Immunol* **14**: 233-58.
- Leung, H. T., J. Bradshaw, et al. (1995). "Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail." *J Biol Chem* **270**(42): 25107-14.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, et al. (2001). "IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells." *J Immunol* **166**(9): 5530-9.
- Li, B., A. Samanta, et al. (2006). "FOXP3 ensembles in T-cell regulation." *Immunol Rev* **212**: 99-113.
- Li, Q., P. Y. Pan, et al. (2004). "Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity." *Cancer Res* **64**(3): 1130-9.
- Li, X., P. Liu, et al. (2005). "Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation." *Nat Genet* **37**(9): 945-52.
- Li, X. C., Y. Li, et al. (1999). "Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis." *J Immunol* **163**(5): 2500-7.
- Li, Y. and G. Bu (2005). "LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis." *Future Oncol* **1**(5): 673-81.
- Li, Y., E. E. Tredget, et al. (2004). "Cell surface expression of MHC class I antigen is suppressed in indoleamine 2,3-dioxygenase genetically modified keratinocytes: implications in allogeneic skin substitute engraftment." *Hum Immunol* **65**(2): 114-23.
- Liew, F. Y. (1995). "Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide." *Curr Opin Immunol* **7**(3): 396-9.
- Liew, F. Y. and F. E. Cox (1991). "Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide." *Immunol Today* **12**(3): A17-21.
- Lin, C. H. and T. Hunig (2003). "Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist." *Eur J Immunol* **33**(3): 626-38.
- Lin, R. H., Y. W. Hwang, et al. (1997). "TNF receptor-2-triggered apoptosis is associated with the down-regulation of Bcl-xL on activated T cells and can be prevented by CD28 costimulation." *J Immunol* **158**(2): 598-603.

- Lindahl, K. F. and D. B. Wilson (1977). "Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors." J Exp Med **145**(3): 508-22.
- Linsley, P. S., J. Bradshaw, et al. (1996). "Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement." Immunity **4**(6): 535-43.
- Linsley, P. S., W. Brady, et al. (1991). "CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7." J Exp Med **174**(3): 561-9.
- Linsley, P. S., E. A. Clark, et al. (1990). "T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 5031-5.
- Linsley, P. S., P. M. Wallace, et al. (1992). "Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule." Science **257**(5071): 792-5.
- Liston, A., S. Lesage, et al. (2003). "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." Nat Immunol **4**(4): 350-4.
- Liu, Q., T. Sasaki, et al. (1999). "SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival." Genes Dev **13**(7): 786-91.
- Liu, Y., N. Chen, et al. (2007). "The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation." Transplant Proc **39**(10): 3396-403.
- Liu, Z., A. I. Colovai, et al. (1996). "Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection." J Clin Invest **98**(5): 1150-7.
- Liu, Z., S. Tugulea, et al. (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." Int Immunol **10**(6): 775-83.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Loke, P. and J. P. Allison (2003). "PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5336-41.
- Lombardi, G., S. Sidhu, et al. (1990). "Are primary alloresponses truly primary?" Int Immunol **2**(1): 9-13.
- Lou, Y., C. Liu, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses." J Immunol **178**(3): 1534-41.
- Louis, C. A., V. Mody, et al. (1999). "Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages." Am J Physiol **276**(1 Pt 2): R237-42.
- Louis, J., H. Himmelrich, et al. (1998). "Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice." Curr Opin Immunol **10**(4): 459-64.
- Louis, S., C. Braudeau, et al. (2006). "Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance." Transplantation **81**(3): 398-407.
- Lu, L., C. A. Bonham, et al. (2001). "Liver-derived DEC205+B220+CD19- dendritic cells regulate T cell responses." J Immunol **166**(12): 7042-52.
- Luhder, F., Y. Huang, et al. (2003). "Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists." J Exp Med **197**(8): 955-66.
- Luo, Z., M. Gotoh, et al. (2000). "Anergic T cells generated in vitro suppress rejection response to islet allografts." Transplantation **69**(10): 2144-8.
- Lusso, P., A. Garzino-Demo, et al. (1995). "Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection." J Exp Med **181**(4): 1303-10.
- Lutz, M. B., R. M. Suri, et al. (2000). "Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo." Eur J Immunol **30**(7): 1813-22.

- Lyddane, C., B. U. Gajewska, et al. (2006). "Cutting Edge: CD28 controls dominant regulatory T cell activity during active immunization." *J Immunol* **176**(6): 3306-10.
- Maccario, R., M. Podesta, et al. (2005). "Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype." *Haematologica* **90**(4): 516-25.
- Macian, F., F. Garcia-Cozar, et al. (2002). "Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance." *Cell* **109**(6): 719-31.
- Mackinnon, A. C., S. L. Farnworth, et al. (2008). "Regulation of Alternative Macrophage Activation by Galectin-3." *J Immunol* **180**(4): 2650-2658.
- Maeda, Y., P. Reddy, et al. (2005). "Critical role of host gammadelta T cells in experimental acute graft-versus-host disease." *Blood* **106**(2): 749-55.
- Maier, T., J. H. Holda, et al. (1989). "Natural suppressor cells." *Prog Clin Biol Res* **288**: 235-44.
- Makarenkova, V. P., V. Bansal, et al. (2006). "CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress." *J Immunol* **176**(4): 2085-94.
- Manavalan, J. S., S. Kim-Schulze, et al. (2004). "Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity." *Int Immunol* **16**(8): 1055-68.
- Manavalan, J. S., P. C. Rossi, et al. (2003). "High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells." *Transpl Immunol* **11**(3-4): 245-58.
- Mandelbrot, D. A., K. Kishimoto, et al. (2001). "Rejection of mouse cardiac allografts by costimulation in trans." *J Immunol* **167**(3): 1174-8.
- Mandelbrot, D. A., A. J. McAdam, et al. (1999). "B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)." *J Exp Med* **189**(2): 435-40.
- Mandelbrot, D. A., M. A. Oosterwegel, et al. (2001). "B7-dependent T-cell costimulation in mice lacking CD28 and CTLA4." *J Clin Invest* **107**(7): 881-7.
- Maniscalco, M., M. Sofia, et al. (2007). "Nitric oxide in upper airways inflammatory diseases." *Inflamm Res* **56**(2): 58-69.
- Mantovani, A., M. Locati, et al. (2001). "Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines." *Trends Immunol* **22**(6): 328-36.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." *Nature* **417**(6889): 664-7.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." *Nature* **411**(6835): 321-5.
- Marengere, L. E., P. Waterhouse, et al. (1996). "Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4." *Science* **272**(5265): 1170-3.
- Marra, L. E., Z. X. Zhang, et al. (2004). "IL-10 induces regulatory T cell apoptosis by up-regulation of the membrane form of TNF-alpha." *J Immunol* **172**(2): 1028-35.
- Marshall, M. A., D. Jankovic, et al. (2001). "Mice infected with *Schistosoma mansoni* develop a novel non-T-lymphocyte suppressor population which inhibits virus-specific CTL induction via a soluble factor." *Microbes Infect* **3**(13): 1051-61.
- Martin, M., H. Schneider, et al. (2001). "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function." *J Exp Med* **194**(11): 1675-81.
- Martin, P., G. M. Del Hoyo, et al. (2002). "Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential." *Blood* **100**(2): 383-90.

- Martinez-Pomares, L. and S. Gordon (1999). "Potential role of the mannose receptor in antigen transport." *Immunol Lett* **65**(1-2): 9-13.
- Martinez, C., T. J. Hofmann, et al. (2007). "Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs." *Blood* **109**(10): 4245-8.
- Mazzoni, A., V. Bronte, et al. (2002). "Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism." *J Immunol* **168**(2): 689-95.
- Meisel, R., A. Zibert, et al. (2004). "Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation." *Blood* **103**(12): 4619-21.
- Melani, C., C. Chiodoni, et al. (2003). "Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity." *Blood* **102**(6): 2138-45.
- Mellor, A. L., D. B. Keskin, et al. (2002). "Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses." *J Immunol* **168**(8): 3771-6.
- Mellor, A. L., D. Munn, et al. (2003). "Tryptophan catabolism and T cell responses." *Adv Exp Med Biol* **527**: 27-35.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (1999). "Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?" *Immunol Today* **20**(10): 469-73.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2000). "Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression." *Annu Rev Immunol* **18**: 367-91.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." *Nat Rev Immunol* **4**(10): 762-74.
- Mellstedt, H., J. Fagerberg, et al. (1999). "Augmentation of the immune response with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other hematopoietic growth factors." *Curr Opin Hematol* **6**(3): 169-75.
- Mencacci, A., C. Montagnoli, et al. (2002). "CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis." *J Immunol* **169**(6): 3180-90.
- Merkenschlager, M., H. Ikeda, et al. (1991). "Allorecognition of HLA-DR and -DQ transfectants by human CD45RA and CD45R0 CD4 T cells: repertoire analysis and activation requirements." *Eur J Immunol* **21**(1): 79-88.
- Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." *Oncogene* **25**(57): 7461-8.
- Miller, J. F. (1961). "Immunological function of the thymus." *Lancet* **2**: 748-9.
- Mills, C. D., K. Kincaid, et al. (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." *J Immunol* **164**(12): 6166-73.
- Mills, C. D., J. Shearer, et al. (1992). "Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer." *J Immunol* **149**(8): 2709-14.
- Mlodzik, M. (2002). "Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation?" *Trends Genet* **18**(11): 564-71.
- Mombaerts, P., J. Arnoldi, et al. (1993). "Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen." *Nature* **365**(6441): 53-6.
- Monaghan, A. P., P. Kioschis, et al. (1999). "Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages." *Mech Dev* **87**(1-2): 45-56.
- Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* **43**(2): 109-42.
- Mor, A., D. Planer, et al. (2007). "Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(4): 893-900.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." *Science* **275**(5307): 1787-90.

- Moron, G., G. Dadaglio, et al. (2004). "New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway." *Trends Immunol* **25**(2): 92-7.
- Morris, S. M., Jr. (2004). "Enzymes of arginine metabolism." *J Nutr* **134**(10 Suppl): 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.
- Morris, S. M., Jr., D. Kepka-Lenhart, et al. (1998). "Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells." *Am J Physiol* **275**(5 Pt 1): E740-7.
- Moseman, E. A., X. Liang, et al. (2004). "Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **173**(7): 4433-42.
- Moser, M. (2003). "Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?" *Immunity* **19**(1): 5-8.
- Mues, B., D. Langer, et al. (1989). "Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta." *Immunology* **67**(3): 303-7.
- Mukhopadhyay, M., S. Shtrom, et al. (2001). "Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse." *Dev Cell* **1**(3): 423-34.
- Mulroy, T., Y. Xu, et al. (2003). "beta-Catenin expression enhances generation of mature thymocytes." *Int Immunol* **15**(12): 1485-94.
- Munder, M., K. Eichmann, et al. (1998). "Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype." *J Immunol* **160**(11): 5347-54.
- Munder, M., K. Eichmann, et al. (1999). "Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells." *J Immunol* **163**(7): 3771-7.
- Munn, D. H., E. Shafizadeh, et al. (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism." *J Exp Med* **189**(9): 1363-72.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2004). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes." *J Clin Invest* **114**(2): 280-90.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." *Science* **297**(5588): 1867-70.
- Munn, D. H., M. Zhou, et al. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." *Science* **281**(5380): 1191-3.
- Murray, M. F. (2003). "Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis." *Lancet Infect Dis* **3**(10): 644-52.
- Nakamura, R. E., D. D. Hunter, et al. (2007). "Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina." *BMC Cell Biol* **8**: 52.
- Nakano, H., M. Yanagita, et al. (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **194**(8): 1171-8.
- Nasr, I. W., Y. Wang, et al. (2005). "Testicular immune privilege promotes transplantation tolerance by altering the balance between memory and regulatory T cells." *J Immunol* **174**(10): 6161-8.
- Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." *Cell* **78**(6): 915-8.
- Nathan, C. F. and J. B. Hibbs, Jr. (1991). "Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity." *Curr Opin Immunol* **3**(1): 65-70.
- Nauta, A. J., A. B. Kruisselbrink, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells." *J Immunol* **177**(4): 2080-7.

- Nauta, A. J., G. Westerhuis, et al. (2006). "Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting." Blood **108**(6): 2114-20.
- Nefedova, Y., M. Huang, et al. (2004). "Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer." J Immunol **172**(1): 464-74.
- Niedbala, W., B. Cai, et al. (2006). "Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions." Ann Rheum Dis **65 Suppl 3**: iii37-40.
- Niedbala, W., B. Cai, et al. (2007). "Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15478-83.
- Niedbala, W., X. Q. Wei, et al. (1999). "Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells." Eur J Immunol **29**(8): 2498-505.
- Niehrs, C. (2006). "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators." Oncogene **25**(57): 7469-81.
- Noel, P. J., L. H. Boise, et al. (1996). "CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation." J Immunol **157**(2): 636-42.
- Nunes, J., S. Klasen, et al. (1993). "CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events." Int Immunol **5**(3): 311-5.
- Nusse, R. (2005). "Wnt signaling in disease and in development." Cell Res **15**(1): 28-32.
- O'Doherty, U., M. Peng, et al. (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology **82**(3): 487-93.
- Oberle, N., N. Eberhardt, et al. (2007). "Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling." J Immunol **179**(6): 3578-87.
- Ochoa, A. C., A. H. Zea, et al. (2007). "Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **13**(2 Pt 2): 721s-726s.
- Oh, B. C., H. M. Lee, et al. (2006). "Effect of immature dendritic cell injection before heterotropic cardiac allograft." Transplant Proc **38**(10): 3189-92.
- Oh, K., S. Kim, et al. (2005). "Direct regulatory role of NKT cells in allogeneic graft survival is dependent on the quantitative strength of antigenicity." J Immunol **174**(4): 2030-6.
- Ohm, J. E. and D. P. Carbone (2001). "VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency." Immunol Res **23**(2-3): 263-72.
- Ohresser, M., D. Olive, et al. (2006). "Risk in drug trials." Lancet **368**(9554): 2205-6.
- Ohteki, T., M. Parsons, et al. (2000). "Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3." J Exp Med **192**(1): 99-104.
- Olsson, C., K. Riesbeck, et al. (1999). "CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kappaB and AP-1 activity in mouse T cell blasts." J Biol Chem **274**(20): 14400-5.
- Olweus, J., A. BitMansour, et al. (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12551-6.
- Omer, C. A., P. J. Miller, et al. (1999). "Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding." Biochem Biophys Res Commun **256**(3): 584-90.
- Orabona, C., U. Grohmann, et al. (2004). "CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86." Nat Immunol **5**(11): 1134-42.
- Otsuji, M., Y. Kimura, et al. (1996). "Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13119-24.

- Ozaki, Y., M. P. Edelstein, et al. (1988). "Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(4): 1242-6.
- Pak, A. S., M. A. Wright, et al. (1995). "Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Clin Cancer Res **1**(1): 95-103.
- Pan, P. Y., G. X. Wang, et al. (2008). "Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function." Blood **111**(1): 219-28.
- Papavasiliou, F. N. and D. G. Schatz (2002). "The activation-induced deaminase functions in a postcleavage step of the somatic hypermutation process." J Exp Med **195**(9): 1193-8.
- Papkoff, J. (1997). "Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src." J Biol Chem **272**(7): 4536-43.
- Papkoff, J., B. Rubinfeld, et al. (1996). "Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes." Mol Cell Biol **16**(5): 2128-34.
- Paraiso, K. H., T. Ghansah, et al. (2007). "Induced SHIP deficiency expands myeloid regulatory cells and abrogates graft-versus-host disease." J Immunol **178**(5): 2893-900.
- Pelaez, B., J. A. Campillo, et al. (2001). "Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism." J Immunol **166**(11): 6608-15.
- Peng, G., H. Y. Wang, et al. (2007). "Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway." Immunity **27**(2): 334-48.
- Peng, Y., Y. Laouar, et al. (2004). "TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4572-7.
- Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, et al. (2004). "B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse." Immunity **21**(3): 401-13.
- Perez, V. L., L. Van Parijs, et al. (1997). "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement." Immunity **6**(4): 411-7.
- Perrin, P. J., C. H. June, et al. (1999). "Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **163**(3): 1704-10.
- Perrin, P. J., J. H. Maldonado, et al. (1996). "CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis." J Immunol **157**(4): 1333-6.
- Perrin, P. J., D. Scott, et al. (1996). "Opposing effects of CTLA4-Ig and anti-CD80 (B7-1) plus anti-CD86 (B7-2) on experimental allergic encephalomyelitis." J Neuroimmunol **65**(1): 31-9.
- Perrin, P. J., D. Scott, et al. (1995). "Role of B7:CD28/CTLA-4 in the induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis." J Immunol **154**(3): 1481-90.
- Piccirillo, C. A. and E. M. Shevach (2001). "Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells." J Immunol **167**(3): 1137-40.
- Pietra, B. A., A. Wiseman, et al. (2000). "CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II." J Clin Invest **106**(8): 1003-10.
- Pimenta-Araujo, R., L. Mascarell, et al. (2001). "Embryonic thymic epithelium naturally devoid of APCs is acutely rejected in the absence of indirect recognition." J Immunol **167**(9): 5034-41.

- Pirenne, J., H. Kitade, et al. (2005). "Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion." *Transplantation* **79**(3 Suppl): S25-7.
- Pistillo, M. P., P. L. Tazzari, et al. (2003). "CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells." *Blood* **101**(1): 202-9.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-7.
- Poggio, E. D., M. Clemente, et al. (2004). "Alloreactivity in renal transplant recipients with and without chronic allograft nephropathy." *J Am Soc Nephrol* **15**(7): 1952-60.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." *Genes Dev* **14**(15): 1837-51.
- Porter, K. A. (1965). "Morphological Aspects of Renal Homograft Rejection." *Br Med Bull* **21**: 171-5.
- Powrie, F., M. W. Leach, et al. (1993). "Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice." *Int Immunol* **5**(11): 1461-71.
- Prasad, K. V., Y. C. Cai, et al. (1994). "T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(7): 2834-8.
- Priatel, J. J., O. Utting, et al. (2001). "TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells." *J Immunol* **167**(11): 6188-94.
- Probst, H. C., J. Lagnel, et al. (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance." *Immunity* **18**(5): 713-20.
- Puccetti, P. and F. Fallarino (2008). "Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism." *Blood Cells Mol Dis* **40**(1): 101-5.
- Racke, M. K., D. E. Scott, et al. (1995). "Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis." *J Clin Invest* **96**(5): 2195-203.
- Racusen, L. C., R. B. Colvin, et al. (2003). "Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection." *Am J Transplant* **3**(6): 708-14.
- Rao, R., M. Z. Zhang, et al. (2005). "Lithium treatment inhibits renal GSK-3 activity and promotes cyclooxygenase 2-dependent polyuria." *Am J Physiol Renal Physiol* **288**(4): F642-9.
- Rasmusson, I. (2006). "Immune modulation by mesenchymal stem cells." *Exp Cell Res* **312**(12): 2169-79.
- Raulet, D. H. (1994). "T-cell immunity. How gamma delta T cells make a living." *Curr Biol* **4**(3): 246-8.
- Razmara, M., B. Hilliard, et al. (2008). "CTLA-4{middle dot}Ig converts naive CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ regulatory T cells." *Int Immunol*.
- Read, S., R. Greenwald, et al. (2006). "Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo." *J Immunol* **177**(7): 4376-83.
- Read, S., S. Mauze, et al. (1998). "CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro." *Eur J Immunol* **28**(11): 3435-47.
- Rifle, G., C. Mousson, et al. (2005). "Donor-specific antibodies in allograft rejection: clinical and experimental data." *Transplantation* **79**(3 Suppl): S14-8.
- Rincon, M. and R. A. Flavell (1994). "AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes." *Embo J* **13**(18): 4370-81.

- Ringden, O., M. Uzunel, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease." *Transplantation* **81**(10): 1390-7.
- Rizzo, L. V., P. Silver, et al. (1996). "Establishment and characterization of a murine CD4+ T cell line and clone that induce experimental autoimmune uveoretinitis in B10.A mice." *J Immunol* **156**(4): 1654-60.
- Robinson, C. M., K. A. Shirey, et al. (2003). "Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha." *J Interferon Cytokine Res* **23**(8): 413-21.
- Robinson, S. P., S. Patterson, et al. (1999). "Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells." *Eur J Immunol* **29**(9): 2769-78.
- Rock, J., E. Schneider, et al. (2007). "CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2." *Eur J Immunol* **37**(12): 3564-75.
- Rodionova, E., M. Conzelmann, et al. (2007). "GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells." *Blood* **109**(4): 1584-92.
- Rodriguez-Palmero, M., A. Franch, et al. (2006). "Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody." *J Rheumatol* **33**(1): 110-8.
- Rodriguez-Palmero, M., T. Hara, et al. (1999). "Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo." *Eur J Immunol* **29**(12): 3914-24.
- Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, et al. (2007). "L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression." *Blood* **109**(4): 1568-73.
- Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, et al. (2004). "Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses." *Cancer Res* **64**(16): 5839-49.
- Rodriguez, P. C., A. H. Zea, et al. (2002). "Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine." *J Biol Chem* **277**(24): 21123-9.
- Rodriguez, P. C., A. H. Zea, et al. (2003). "L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes." *J Immunol* **171**(3): 1232-9.
- Roman-Gomez, J., A. Jimenez-Velasco, et al. (2004). "Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Cancer* **91**(4): 707-13.
- Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, et al. (2001). "Type 1 T regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 68-79.
- Roth, E., R. Steininger, et al. (1994). "L-Arginine deficiency after liver transplantation as an effect of arginase efflux from the graft. Influence on nitric oxide metabolism." *Transplantation* **57**(5): 665-9.
- Roussey-Kesler, G., M. Giral, et al. (2006). "Clinical operational tolerance after kidney transplantation." *Am J Transplant* **6**(4): 736-46.
- Rulifson, I. C., A. I. Sperling, et al. (1997). "CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines." *J Immunol* **158**(2): 658-65.
- Saadi, S., R. A. Holzknecht, et al. (1995). "Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium." *J Exp Med* **182**(6): 1807-14.
- Saio, M., S. Radoja, et al. (2001). "Tumor-infiltrating macrophages induce apoptosis in activated CD8(+) T cells by a mechanism requiring cell contact and mediated by both the cell-associated form of TNF and nitric oxide." *J Immunol* **167**(10): 5583-93.
- Sakaguchi, S. (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." *Cell* **101**(5): 455-8.

- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* **22**: 531-62.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." *Nat Immunol* **6**(4): 345-52.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol Rev* **182**: 18-32.
- Sakurai, K., J. P. Zou, et al. (2002). "Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **129**(1-2): 186-96.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-12.
- Salomon, B. and J. A. Bluestone (2001). "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation." *Annu Rev Immunol* **19**: 225-52.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-40.
- Sanchez-Fueyo, A. (2005). "[Immunological tolerance and liver transplantation]." *Gastroenterol Hepatol* **28**(4): 250-6.
- Sanui, H., T. M. Redmond, et al. (1989). "Identification of an immunodominant and highly immunopathogenic determinant in the retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)." *J Exp Med* **169**(6): 1947-60.
- Sarwal, M. M. and L. Li (2006). "Designer genes: Filling the gap in transplantation." *Transplantation* **82**(10): 1261-72.
- Sato, K., K. Ozaki, et al. (2007). "Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells." *Blood* **109**(1): 228-34.
- Sawitzki, B., M. Lehmann, et al. (2001). "Regulatory tolerance-mediating T cells in transplantation tolerance." *Transplant Proc* **33**(3): 2092-3.
- Schebesch, C., V. Kodelja, et al. (1997). "Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4⁺ T cells in vitro." *Immunology* **92**(4): 478-86.
- Scheipers, P. and H. Reiser (1998). "Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 10083-8.
- Schild, H., N. Mavaddat, et al. (1994). "The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells." *Cell* **76**(1): 29-37.
- Schmidt-Wolf, I. G., S. Dejbakhsh-Jones, et al. (1992). "T-cell subsets and suppressor cells in human bone marrow." *Blood* **80**(12): 3242-50.
- Schmidt, J., K. Elflein, et al. (2003). "Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies." *J Neuroimmunol* **140**(1-2): 143-52.
- Schneider, H., K. V. Prasad, et al. (1995). "CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells." *J Exp Med* **181**(1): 351-5.
- Schwartz, J. C., X. Zhang, et al. (2001). "Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex." *Nature* **410**(6828): 604-8.
- Schwartz, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." *Science* **248**(4961): 1349-56.

- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." *Annu Rev Immunol* **21**: 305-34.
- Schweitzer, A. N. and A. H. Sharpe (1998). "Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production." *J Immunol* **161**(6): 2762-71.
- Scollay, R. G., E. C. Butcher, et al. (1980). "Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice." *Eur J Immunol* **10**(3): 210-8.
- Sebastiani, S., P. Allavena, et al. (2001). "Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity." *J Immunol* **166**(2): 996-1002.
- Seder, R. A., T. Marth, et al. (1998). "Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production." *J Immunol* **160**(12): 5719-28.
- Seino, K. I., K. Fukao, et al. (2001). "Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2577-81.
- Semenov, M. V., K. Tamai, et al. (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." *Curr Biol* **11**(12): 951-61.
- Sengupta, S., P. Jayaraman, et al. (2007). "Unrestrained glycogen synthase kinase-3 beta activity leads to activated T cell death and can be inhibited by natural adjuvant." *J Immunol* **178**(10): 6083-91.
- Serafini, P., C. De Santo, et al. (2004). "Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells." *Cancer Immunol Immunother* **53**(2): 64-72.
- Serafini, P., K. Meckel, et al. (2006). "Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function." *J Exp Med* **203**(12): 2691-702.
- Serra, P., A. Amrani, et al. (2003). "CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." *Immunity* **19**(6): 877-89.
- Setoguchi, R., S. Hori, et al. (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." *J Exp Med* **201**(5): 723-35.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nat Rev Immunol* **2**(2): 116-26.
- Sherman, L. A. and S. Chattopadhyay (1993). "The molecular basis of allorecognition." *Annu Rev Immunol* **11**: 385-402.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 389-400.
- Shi, Z., M. Rifa'i, et al. (2008). "Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8(+)CD122(+) regulatory T cells." *Immunology*.
- Shiao, S. L., J. M. McNiff, et al. (2007). "Immunomodulatory properties of FK734, a humanized anti-CD28 monoclonal antibody with agonistic and antagonistic activities." *Transplantation* **83**(3): 304-13.
- Shimizu, H., M. A. Julius, et al. (1997). "Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin." *Cell Growth Differ* **8**(12): 1349-58.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol* **3**(2): 135-42.
- Shin, S., R. El-Diwany, et al. (2005). "Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors." *Science* **308**(5719): 252-5.
- Shiratori, T., S. Miyatake, et al. (1997). "Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2." *Immunity* **6**(5): 583-9.

- Silver, P. B., K. S. Hathcock, et al. (2000). "Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance." *J Immunol* **165**(9): 5041-7.
- Singer, G. G. and A. K. Abbas (1994). "The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice." *Immunity* **1**(5): 365-71.
- Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2007). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." *J Immunol* **179**(2): 977-83.
- Sloan-Lancaster, J., T. H. Steinberg, et al. (1996). "Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands." *J Exp Med* **184**(4): 1525-30.
- Smyth, M. J., M. W. Teng, et al. (2006). "CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer." *J Immunol* **176**(3): 1582-7.
- Solheim, J. C., A. J. Reber, et al. (2007). "Spleen but not tumor infiltration by dendritic and T cells is increased by intravenous adenovirus-Flt3 ligand injection." *Cancer Gene Ther* **14**(4): 364-71.
- Song, E., N. Ouyang, et al. (2000). "Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts." *Cell Immunol* **204**(1): 19-28.
- Sonoda, K. H., M. Taniguchi, et al. (2002). "Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells." *J Immunol* **168**(4): 2028-34.
- Sotiropoulou, P. A., S. A. Perez, et al. (2006). "Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells." *Stem Cells* **24**(1): 74-85.
- Soulillou, J. P., C. B. Carpenter, et al. (1976). "The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement." *J Exp Med* **143**(2): 405-21.
- Spaggiari, G. M., A. Capobianco, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2." *Blood* **111**(3): 1327-33.
- Spaggiari, G. M., A. Capobianco, et al. (2006). "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation." *Blood* **107**(4): 1484-90.
- Spitzer, T. R., F. Delmonico, et al. (1999). "Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism." *Transplantation* **68**(4): 480-4.
- Staal, F. J. and H. C. Clevers (2003). "Wnt signaling in the thymus." *Curr Opin Immunol* **15**(2): 204-8.
- Staal, F. J. and H. C. Clevers (2005). "WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation." *Nat Rev Immunol* **5**(1): 21-30.
- Stamper, C. C., Y. Zhang, et al. (2001). "Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses." *Nature* **410**(6828): 608-11.
- Stassen, M., S. Fondel, et al. (2004). "Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells." *Eur J Immunol* **34**(5): 1303-11.
- Steel, M. D., S. M. Puddicombe, et al. (2005). "Beta-catenin/T-cell factor-mediated transcription is modulated by cell density in human bronchial epithelial cells." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(6): 1281-95.

- Stein, M., S. Keshav, et al. (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." *J Exp Med* **176**(1): 287-92.
- Stein, P. H., J. D. Fraser, et al. (1994). "The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with phosphatidylinositol 3'-kinase." *Mol Cell Biol* **14**(5): 3392-402.
- Steinbrink, K., M. Wolfl, et al. (1997). "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells." *J Immunol* **159**(10): 4772-80.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **21**: 685-711.
- Stephens, L. A. and D. Mason (2000). "CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations." *J Immunol* **165**(6): 3105-10.
- Stout, R. D., C. Jiang, et al. (2005). "Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences." *J Immunol* **175**(1): 342-9.
- Strober, S. (1984). "Natural suppressor (NS) cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation: exploring obscure relationships." *Annu Rev Immunol* **2**: 219-37.
- Suciu-Foca, N., R. Ciubotariu, et al. (1998). "Indirect allorecognition of donor HLA-DR peptides in chronic rejection of heart allografts." *Transplant Proc* **30**(8): 3999-4000.
- Suciu-Foca, N., J. S. Manavalan, et al. (2003). "Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells." *Transpl Immunol* **11**(3-4): 235-44.
- Suntharalingam, G., M. R. Perry, et al. (2006). "Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412." *N Engl J Med* **355**(10): 1018-28.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, et al. (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." *J Immunol* **160**(3): 1212-8.
- Suss, G. and K. Shortman (1996). "A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis." *J Exp Med* **183**(4): 1789-96.
- Suwa, T., M. Chen, et al. (2003). "Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex." *J Endocrinol* **178**(1): 149-58.
- Sykes, M. and D. H. Sachs (1988). "Mixed allogeneic chimerism as an approach to transplantation tolerance." *Immunol Today* **9**(1): 23-7.
- Szanya, V., J. Ermann, et al. (2002). "The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7." *J Immunol* **169**(5): 2461-5.
- Tacke, M., G. J. Clark, et al. (1995). "Cellular distribution and costimulatory function of rat CD28. Regulated expression during thymocyte maturation and induction of cyclosporin A sensitivity of costimulated T cell responses by phorbol ester." *J Immunol* **154**(10): 5121-7.
- Tacke, M., G. Hanke, et al. (1997). "CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28." *Eur J Immunol* **27**(1): 239-47.
- Tai, X., M. Cowan, et al. (2005). "CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2." *Nat Immunol* **6**(2): 152-62.
- Takahama, Y. (2006). "Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection." *Nat Rev Immunol* **6**(2): 127-35.

- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-10.
- Takeuchi, M., P. Alard, et al. (1998). "TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells." J Immunol **160**(4): 1589-97.
- Takeuchi, M., M. M. Kosiewicz, et al. (1997). "On the mechanisms by which transforming growth factor-beta 2 alters antigen-presenting abilities of macrophages on T cell activation." Eur J Immunol **27**(7): 1648-56.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, et al. (2003). "Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **171**(7): 3348-52.
- Taylor, M. W. and G. S. Feng (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." Faseb J **5**(11): 2516-22.
- Terabe, M., S. Matsui, et al. (2000). "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway." Nat Immunol **1**(6): 515-20.
- Terness, P., T. M. Bauer, et al. (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." J Exp Med **196**(4): 447-57.
- Thiel, M. A., J. U. Steiger, et al. (2005). "Local or short-term systemic costimulatory molecule blockade prolongs rat corneal allograft survival." Clin Experiment Ophthalmol **33**(2): 176-80.
- Thompson, C. B. and J. P. Allison (1997). "The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator." Immunity **7**(4): 445-50.
- Thompson, C. B., T. Lindsten, et al. (1989). "CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1333-7.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-96.
- Tickenbrock, L., J. Schwable, et al. (2006). "Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes." J Leukoc Biol **79**(6): 1306-13.
- Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19446-51.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." Immunity **3**(5): 541-7.
- Togel, F., Z. Hu, et al. (2005). "Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms." Am J Physiol Renal Physiol **289**(1): F31-42.
- Toyofuku, A., Y. Yasunami, et al. (2006). "Natural killer T-cells participate in rejection of islet allografts in the liver of mice." Diabetes **55**(1): 34-9.
- Tsai, M. K., H. N. Ho, et al. (2004). "The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis." Transplantation **77**(1): 48-54.
- Tsang, J. Y., J. G. Chai, et al. (2003). "Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion?" Blood **101**(7): 2704-10.
- Tse, W. T., J. D. Pendleton, et al. (2003). "Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation." Transplantation **75**(3): 389-97.

- Tseng, S. Y., M. Liu, et al. (2005). "CD80 cytoplasmic domain controls localization of CD28, CTLA-4, and protein kinase Ctheta in the immunological synapse." *J Immunol* **175**(12): 7829-36.
- Tsuji, T., M. Miyazaki, et al. (2000). "A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines." *Biochem Biophys Res Commun* **268**(1): 20-4.
- Tzachanis, D., A. Berezovskaya, et al. (2002). "Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses." *Blood* **99**(4): 1465-73.
- Ubaldi, V., L. Gatta, et al. (2003). "CTLA-4 engagement inhibits Th2 but not Th1 cell polarisation." *Clin Dev Immunol* **10**(1): 13-7.
- Uccelli, A., L. Moretta, et al. (2006). "Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells." *Eur J Immunol* **36**(10): 2566-73.
- Ueda, Y., B. L. Levine, et al. (1995). "Both CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) activate phosphatidylinositol 3-kinase, and wortmannin reveals heterogeneity in the regulation of T cell IL-2 secretion." *Int Immunol* **7**(6): 957-66.
- Untergasser, G., M. Steurer, et al. (2008). "The Dickkopf-homolog 3 is expressed in tumor endothelial cells and supports capillary formation." *Int J Cancer* **122**(7): 1539-47.
- Urakami, H., D. V. Ostanin, et al. (2006). "Combination of donor-specific blood transfusion with anti-CD28 antibody synergizes to prolong graft survival in rat liver transplantation." *Transplant Proc* **38**(10): 3244-6.
- Vacchio, M. S. and R. J. Hodes (2003). "CD28 costimulation is required for in vivo induction of peripheral tolerance in CD8 T cells." *J Exp Med* **197**(1): 19-26.
- van't Hof, R. J. and S. H. Ralston (2001). "Nitric oxide and bone." *Immunology* **103**(3): 255-61.
- van Besouw, N. M., J. M. Zijderwijk, et al. (2005). "The direct and indirect allogeneic presentation pathway during acute rejection after human cardiac transplantation." *Clin Exp Immunol* **141**(3): 534-40.
- van de Wetering, M., E. Sancho, et al. (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." *Cell* **111**(2): 241-50.
- van der Merwe, P. A., D. L. Bodian, et al. (1997). "CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics." *J Exp Med* **185**(3): 393-403.
- van Es, J. H., N. Barker, et al. (2003). "You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway." *Curr Opin Genet Dev* **13**(1): 28-33.
- van Vlasselaer, P., J. Punnonen, et al. (1992). "Transforming growth factor-beta directs IgA switching in human B cells." *J Immunol* **148**(7): 2062-7.
- van Wissen, M., M. Snoek, et al. (2002). "IFN-gamma amplifies IL-6 and IL-8 responses by airway epithelial-like cells via indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Immunol* **169**(12): 7039-44.
- VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, et al. (2000). "Human allograft acceptance is associated with immune regulation." *J Clin Invest* **106**(1): 145-55.
- Vandenberghe, P., J. Delabie, et al. (1993). "In situ expression of B7/BB1 on antigen-presenting cells and activated B cells: an immunohistochemical study." *Int Immunol* **5**(3): 317-21.
- Vanhove, B., G. Laflamme, et al. (2003). "Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody." *Blood* **102**(2): 564-70.
- Vella, J. P., M. Spadafora-Ferreira, et al. (1997). "Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction." *Transplantation* **64**(6): 795-800.

- Vendetti, S., J. G. Chai, et al. (2000). "Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells." *J Immunol* **165**(3): 1175-81.
- Venuprasad, K., P. Parab, et al. (2001). "Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression." *Eur J Immunol* **31**(5): 1536-43.
- Vieira, P. L., J. R. Christensen, et al. (2004). "IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **172**(10): 5986-93.
- Vincent, M. S., J. E. Gumperz, et al. (2003). "Understanding the function of CD1-restricted T cells." *Nat Immunol* **4**(6): 517-23.
- Viola, A. and A. Lanzavecchia (1996). "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." *Science* **273**(5271): 104-6.
- Vlad, G., E. K. Ho, et al. (2007). "Anti-CD25 treatment and FOXP3-positive regulatory T cells in heart transplantation." *Transpl Immunol* **18**(1): 13-21.
- Vladutiu, A. O. (1995). "Role of nitric oxide in autoimmunity." *Clin Immunol Immunopathol* **76**(1 Pt 1): 1-11.
- Wakkach, A., N. Fournier, et al. (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." *Immunity* **18**(5): 605-17.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker, et al. (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." *J Exp Med* **183**(6): 2541-50.
- Ward, S. G., J. Westwick, et al. (1993). "Ligation of CD28 receptor by B7 induces formation of D-3 phosphoinositides in T lymphocytes independently of T cell receptor/CD3 activation." *Eur J Immunol* **23**(10): 2572-7.
- Watanabe, N., Y. H. Wang, et al. (2005). "Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus." *Nature* **436**(7054): 1181-5.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4." *Science* **270**(5238): 985-8.
- Weerkamp, F., M. R. Baert, et al. (2006). "Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3322-6.
- Weiner, H. L. (2001). "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells." *Microbes Infect* **3**(11): 947-54.
- Weiser, M. R., J. P. Williams, et al. (1996). "Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement." *J Exp Med* **183**(5): 2343-8.
- Weiss, A. and D. R. Littman (1994). "Signal transduction by lymphocyte antigen receptors." *Cell* **76**(2): 263-74.
- Welch, J. S., L. Escoubet-Lozach, et al. (2002). "TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism." *J Biol Chem* **277**(45): 42821-9.
- Wetzel, S. A., T. W. McKeithan, et al. (2002). "Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation." *J Immunol* **169**(11): 6092-101.
- Willert, K. and R. Nusse (1998). "Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling." *Curr Opin Genet Dev* **8**(1): 95-102.
- Williams, G. M., D. M. Hume, et al. (1968). "'Hyperacute' renal-homograft rejection in man." *N Engl J Med* **279**(12): 611-8.
- Willinger, T., T. Freeman, et al. (2006). "Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and in vivo." *J Immunol* **176**(3): 1439-46.

- Wodarz, A. and R. Nusse (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 59-88.
- Woerly, G., N. Roger, et al. (1999). "Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes." J Exp Med **190**(4): 487-95.
- Wu, B., S. P. Crampton, et al. (2007). "Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration." Immunity **26**(2): 227-39.
- Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." Biochem J **336 (Pt 1)**: 1-17.
- Xia, Y., L. J. Roman, et al. (1998). "Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain." J Biol Chem **273**(35): 22635-9.
- Xia, Y. and J. L. Zweier (1997). "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6954-8.
- Xu, Y., D. Banerjee, et al. (2003). "Deletion of beta-catenin impairs T cell development." Nat Immunol **4**(12): 1177-82.
- Xystrakis, E., P. Cavailles, et al. (2004). "Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat." J Immunol **173**(5): 3140-7.
- Xystrakis, E., A. S. Dejean, et al. (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." Blood **104**(10): 3294-301.
- Yamada, K., P. R. Gianello, et al. (1997). "Role of the thymus in transplantation tolerance in miniature swine. I. Requirement of the thymus for rapid and stable induction of tolerance to class I-mismatched renal allografts." J Exp Med **186**(4): 497-506.
- Yamada, S., K. Terada, et al. (2005). "Differentiation of adult hepatic stem-like cells into pancreatic endocrine cells." Cell Transplant **14**(9): 647-53.
- Yamazaki, S., A. J. Bonito, et al. (2007). "Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors." Blood **110**(13): 4293-302.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, et al. (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." J Exp Med **198**(2): 235-47.
- Yang, L., S. Li, et al. (2002). "In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8078-83.
- Yang, R., Z. Cai, et al. (2006). "CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells." Cancer Res **66**(13): 6807-15.
- Yasunami, Y., S. Kojo, et al. (2005). "Valpha14 NK T cell-triggered IFN-gamma production by Gr-1+CD11b+ cells mediates early graft loss of syngeneic transplanted islets." J Exp Med **202**(7): 913-8.
- Young, C. S., M. Kitamura, et al. (1998). "Wnt-1 induces growth, cytosolic beta-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts." Mol Cell Biol **18**(5): 2474-85.
- Young, K. J., B. DuTemple, et al. (2003). "Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells." J Immunol **171**(1): 134-41.
- Young, K. J., L. Yang, et al. (2002). "Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells." Blood **100**(9): 3408-14.
- Young, M. R., M. A. Wright, et al. (1996). "Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide." J Immunol **156**(5): 1916-22.

- Yu, G., M. Fang, et al. (2008). "Steady state dendritic cells with forced IDO expression induce skin allograft tolerance by upregulation of regulatory T cells." Transpl Immunol **18**(3): 208-19.
- Yu, Q. and J. M. Sen (2007). "Beta-catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment." J Immunol **178**(8): 5028-34.
- Yu, X. Z., M. H. Albert, et al. (2004). "CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens." J Clin Invest **113**(11): 1624-30.
- Yu, X. Z., S. J. Bidwell, et al. (2000). "CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice." J Immunol **164**(9): 4564-8.
- Yu, X. Z., P. J. Martin, et al. (1998). "Role of CD28 in acute graft-versus-host disease." Blood **92**(8): 2963-70.
- Yue, W., Q. Sun, et al. (2008). "Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer." Carcinogenesis **29**(1): 84-92.
- Zea, A. H., P. C. Rodriguez, et al. (2005). "Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion." Cancer Res **65**(8): 3044-8.
- Zeng, D., D. Lewis, et al. (1999). "Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease." J Exp Med **189**(7): 1073-81.
- Zhang, D., W. Yang, et al. (2007). "New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses." Blood **109**(9): 4071-9.
- Zhang, Y. and J. P. Allison (1997). "Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9273-8.
- Zhang, Z. X., L. Yang, et al. (2000). "Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression." Nat Med **6**(7): 782-9.
- Zhao, D. M., A. M. Thornton, et al. (2006). "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes." Blood **107**(10): 3925-32.
- Zheng, L., G. Fisher, et al. (1995). "Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor." Nature **377**(6547): 348-51.
- Zhou, D., J. Mattner, et al. (2004). "Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells." Science **306**(5702): 1786-9.
- Zhou, H., Z. D. Wang, et al. (2007). "CD8+FOXP3+T cells from renal transplant recipients in quiescence induce immunoglobulin-like transcripts-3 and -4 on dendritic cells from their respective donors." Transplant Proc **39**(10): 3065-7.
- Ziegler, S. F. (2006). "FOXP3: of mice and men." Annu Rev Immunol **24**: 209-26.
- Zinkernagel, R. M., G. N. Callahan, et al. (1978). "On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition?" J Exp Med **147**(3): 882-96.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-28.
- Zuklys, S., G. Balciunaite, et al. (2000). "Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)." J Immunol **165**(4): 1976-83.

ANNEXES

VI- Annexe 1 Tableau Mécanismes d'action des cellules régulatrices et modèle d'induction de tolérance

| Types de cellules régulatrices | Espèce/Modèle | Traitement | Mécanismes d'action | Références |
|---|-----------------------------|--|--|---------------------------------------|
| TCD4⁺CD25⁺ | Rat/Allogreffe de cœur | Cyclosporine A | Inhibition des TCD4 ⁺ CD25 ⁻ | (Hall, Pearce et al. 1990) |
| | Souris/Allogreffe coeur | Injection intrathymique alloantigène | Délétion T alloréactifs | (Jones, Fluck et al. 1997) |
| | Rat/Allogreffe îlot + coeur | Injection intrathymique peptide classe I | Suppression des CTL | (Oluwole, Chowdhury et al. 1999) |
| | Rat/Allogreffe de cornée | SEB | Augmentation ratio CD25 ⁺ /CD25 ⁻ | (Xi, Pan et al. 2007) |
| | Rat/Allogreffe de cœur | LF-015-195 | Inhibition de la production d'IL-2 | (Chiffolleau, Beriou et al. 2002) |
| | Rat/Allogreffe de cœur | LF-015-195 | Production d'IDO par les cellules endothéliales via IFNg | (Thebault, Condamine et al. 2007) |
| | Souris/Allogreffe de cœur | DST + anti-CD4 | Production d'IL-10 | (Hara, Kingsley et al. 2001) |
| | Rat/allogreffe de cœur | Cyclosporine A | Production d'IL-10 | (Pearce, Berger et al. 1993) |
| | Rat/Allogreffe de coeur | DST | Production de TGFβ | (Josien, Douillard et al. 1998) |
| | Souris/Allogreffe de cœur | Nitrate de Gallium | Production de TGFβ | (Bickerstaff, VanBuskirk et al. 2000) |
| | Souris/Allogreffe de peau | DST + anti-CD4 | CTLA-4 | (Kingsley, Karim et al. 2002) |
| | Souris/Tolérance orale | OVA | Sécrétion IL-10/TGFβ | (Zhang, Izikson et al. 2001) |

| Types de cellules régulatrices | Espèce/Modèle | Traitement | Mécanismes d'action | Références |
|---|---|-----------------------------------|--|--------------------------------------|
| TCD4⁺CD25⁺ | Souris/Allogreffe de peau | Transfert adoptif de T reg | Suppression T via IL-10 + CTLA-4 | (Cobbold and Waldmann 1998) |
| | Souris/Allogreffe de coeur | Blocage de la costimulation | Inhibition prolifération T + Apoptose | (Suri-Payer, Amar et al. 1998) |
| | Autoimmunité | ND | Diminution de l'expression des molécules de costimulation sur les CPA | (Cederbom, Hall et al. 2000) |
| | Allogreffe de foie | ND | CTLA-4/IL-4/Apoptose des cellules alloréactives + Inhibition NK et CTL | (Li, Carper et al. 2006) |
| Tr1 | Homme/ Allogreffe de rein ou de foie | OKT3+/- CsA/MMF ou Tacrolimus/MMF | Sécrétion d'IL-10 | (VanBuskirk, Burlingham et al. 2000) |
| | Patients SCID/Greffe de cellules souches hématopoïétiques | Pas de traitement | Sécrétion d'IL-10 | (Bacchetta, Bigler et al. 1994) |
| | Souris SCID/Colite | Transfert de CD4+CD45RBhigh | Inhibition de la prolifération des TCD4+ | (Groux, O'Garra et al. 1997) |
| | Souris/Colite | OVA | Inhibition de réponse Th2 | (Cottrez, Hurst et al. 2000) |

| Types de cellules régulatrices | Espèce/Modèle | Traitement | Mécanismes d'action | Références |
|--------------------------------|---|-------------|---|--|
| Th3 | Rat/Allogreffe de cœur | DST | Production de TGF β | (Josien, Douillard et al. 1998) |
| | Souris | EAE | Production de TGF β Contact indépendant Différenciation de cellules T régulatrices FOXP3 ⁺ | (Carrier, Yuan et al. 2007) |
| | Homme/Tolérance orale (Sclérose en plaques) | MBP | Altération de la production de cytokines | (Fukaura, Kent et al. 1996) |
| | Souris/Tolérance orale EAE | MBP | Production d'IL-10 et IL-4 | (Chen, Kuchroo et al. 1994) |
| | Souris/Tolérance orale Autoimmunité | ND | Activation antigène indépendante Action antigène indépendante Inhibition de réponses Th1 Commutation de classe des IgA | (Weiner 2001) |
| TCD8⁺ | Rat/Allogreffe de foie | DST | Inhibition de réponses T alloréactives | (Liu, Chen et al. 2007) |
| | Homme/Allogreffe rein, foie, cœur | IS standard | Inhibition fonction des CPA Contact dépendant Action antigène dépendante Sécrétion de granules cytotoxiques | (Ciubotariu, Vasilescu et al. 2001) (Suciu-Foca, Manavalan et al. 2003) |

| Types de cellules régulatrices | Espèce/Modèle | Traitement | Mécanismes d'action | Références |
|---------------------------------------|--------------------------------|--|--|--|
| TCD8⁺ | Homme/Allogreffe rein | ND | Augmentation d'ILT3 et ILT4 | (Zhou, Wang et al. 2007) |
| | Homme/Allogreffe rein, foie | IS standard | Restriction CMH classe I | (Cortesini, Renna-Molajoni et al. 2002) |
| | Homme/Xéno greffe | ND | Anergie des TCD4 ⁺ Restriction au CMH de classe I | (Colovai, Liu et al. 2000) |
| TCD25⁻ | Rat/Allogreffe cardiaque | DST | Contact dépendant Production IL-10 et IFN γ | (Degauque, Lair et al. 2007) |
| | Souris/Allogreffe peau | ND | Contact dépendant | (Graca, Thompson et al. 2002) |
| | Souris/EAE | MBP | Inhibition de l'activation des cellules T | (Furtado, Olivares-Villagomez et al. 2001) |
| T DN | Souris/Allogreffe peau | DST | Inhibition activation et prolifération T Action antigène dépendante | (Zhang, Yang et al. 2000) |
| | Rat à souris/Xéno greffe cœur | DLI (donor lymphocyte infusion) + anti-CD4 | Inhibition prolifération T anti-donneur Spécifique Antigène | (Chen, Ford et al. 2003) |
| | Souris/Allogreffe ilot ou peau | Transfert de T DN | Résistance AICD Expression Perforine | (Zhang, Yang et al. 2007) |
| TCD8+CD45RClow | Rat/Allogreffe cardiaque | AdCD40Ig | Production d'IFN γ et IDO | (Guillonnet, Hill et al. 2007) |

| Types de cellules régulatrices | Espèce/Modèle | Traitement | Mécanismes d'action | Références |
|-----------------------------------|-----------------------------|---|---|--|
| T$\delta\gamma$ | Souris/ACAID | Injection antigénique chambre antérieure de l'œil | Augmentation en nombre Production d'IL-10 Inhibition développement TCD8+ cytotoxiques | (Xu and Kapp 2001) (Ashour and Niederkorn 2006) (Xu and Kapp 2002) |
| | Souris/Allogreffe de cornée | ND | Génération de cellules T régulatrices | (Skelsey, Mellon et al. 2001) |
| | Souris/Tolérance orale | OVA + anti-TCR $\gamma\delta$ | Inhibition de la prolifération T | (Ke, Pearce et al. 1997) |
| | Souris/Tolérance orale | OVA | Induction et maintien tolérance orale | (Mengel, Cardillo et al. 1995) |
| | Rat/Tolérance nasale | OVA | Suppression production IgE | (McMenamin, Oliver et al. 1991) |
| | Souris/Tolérance nasale | OVA | Inhibition prolifération Th2 Production IFN γ | (McMenamin, Pimm et al. 1994) (McMenamin, McKersey et al. 1995) |
| | Souris/Tolérance tumorale | ND | Inhibition réponse CTL | (Seo and Egawa 1995) |

| Types de cellules régulatrices | Espèce/Modèle | Traitement | Mécanismes d'action | Références |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--|--|
| NKT | Souris/Modèle GVHD | ND | Sécrétion IFN γ et IL-4 | (Zeng, Lewis et al. 1999) |
| | Souris/Allogreffe cœur | Blocage LFA-1/ICAM Blocage CD28/B7 | Sécrétion IFN γ | (Seino, Fukao et al. 2001) |
| | Rat/Allogreffe de foie | Tolérance spontanée | Sécrétion IL-4 et IFN γ Polarisation Th1 en Th2 | (Kiyomoto, Ito et al. 2005) |
| | Souris/ACAID | OVA | Restriction au CD1d | (Sonoda, Exley et al. 1999) |
| | Souris/Allogreffe d'îlot | Blocage CD40/CD40L | Dépendant TGF β expression et engagement Inhibition prolifération T | (Yang, Jin et al. 2007) |
| | Souris/Allogreffe cornée | ND | Génération de cellules T régulatrices | (Sonoda, Taniguchi et al. 2002) |
| DC tolérogènes | Rat/Allogreffe cœur | AdCTLA-4 Ig | Diminution des réponses antigéniques Suppression réponses immunes locale et systémique Induction tolérance spécifique du donneur | (Guillot, Mathieu et al. 2000) |
| | Souris/Allogreffe cœur | Transfert de DC immatures | Inhibition de la réponse immune | (Fu, Li et al. 1996) (Lutz, Suri et al. 2000) |

| Types de cellules régulatrices | Espèce/Modèle | Traitement | Mécanismes d'action | Références |
|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|---------------------------------------|
| DC tolérogènes | Souris/Allogreffe de peau | ND | Génération de cellules T régulatrices Réduction des cytokines inflammatoires | (Yu, Fang et al. 2008) |
| | Rat/Allogreffe de coeur | CTLA-4 Ig | IDO et NO dépendant | (Hill, Zagani et al. 2007) |
| pDC | Souris/Allogreffe coeur | Transfert de pDCs du foie | Antigène spécifique Inhibition de la réponse des cellules T | (Lu, Bonham et al. 2001) |
| MSC | Rat/Allogreffe peau | Cyclosporine | Réduction IFN γ et IL-2 | (Sbano, Cuccia et al. 2008) |
| | Babouin/Allogreffe peau | Injection de MSC du donneur | Inhibition de la réponse lymphocytaire | (Bartholomew, Sturgeon et al. 2002) |
| | Rat/Allogreffe coeur | Injection de MSC | Modification de la balance Th1/Th2 | (Zhou, Yi et al. 2006) |
| AAMΦ | Homme/Allogreffe de moelle osseuse | Blocage de CD28/B7 | Production d'IL-10 Inhibition de la réponse cellulaire T | (Tzachanis, Berezovskaya et al. 2002) |
| MDSC | Rat/Allogreffe rein | Anti-CD28 (JJ319) | Contact dépendant Suppression prolifération T activées spécifique NO dépendant | (Dugast et al 2008 JI in press) |

Tableau Annexe 1 : Mécanismes d'action des cellules régulatrices et modèle d'induction de tolérance

BIBLIOGRAPHIE

- Ashour, H. M. and J. Y. Niederkorn (2006). "Gammadelta T cells promote anterior chamber-associated immune deviation and immune privilege through their production of IL-10." *J Immunol* **177**(12): 8331-7.
- Bacchetta, R., M. Bigler, et al. (1994). "High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells." *J Exp Med* **179**(2): 493-502.
- Bartholomew, A., C. Sturgeon, et al. (2002). "Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo." *Exp Hematol* **30**(1): 42-8.
- Bickerstaff, A. A., A. M. VanBuskirk, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta and interleukin-10 subvert alloreactive delayed type hypersensitivity in cardiac allograft acceptor mice." *Transplantation* **69**(7): 1517-20.
- Carrier, Y., J. Yuan, et al. (2007). "Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice." *J Immunol* **178**(1): 179-85.
- Cederbom, L., H. Hall, et al. (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." *Eur J Immunol* **30**(6): 1538-43.
- Chen, W., M. S. Ford, et al. (2003). "Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival." *J Immunol* **170**(4): 1846-53.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." *Science* **265**(5176): 1237-40.
- Chiffolleau, E., G. Beriou, et al. (2002). "Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment." *J Immunol* **168**(10): 5058-69.
- Ciubotariu, R., R. Vasilescu, et al. (2001). "Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts." *Hum Immunol* **62**(1): 15-20.
- Cobbold, S. and H. Waldmann (1998). "Infectious tolerance." *Curr Opin Immunol* **10**(5): 518-24.
- Colovai, A. I., Z. Liu, et al. (2000). "Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells." *Transplantation* **69**(7): 1304-10.
- Cortesini, R., E. Renna-Molajoni, et al. (2002). "Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells." *Hum Immunol* **63**(11): 1010-8.
- Cottrez, F., S. D. Hurst, et al. (2000). "T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo." *J Immunol* **165**(9): 4848-53.
- Degauque, N., D. Lair, et al. (2007). "Development of CD25- regulatory T cells following heart transplantation: evidence for transfer of long-term survival." *Eur J Immunol* **37**(1): 147-56.
- Fu, F., Y. Li, et al. (1996). "Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients." *Transplantation* **62**(5): 659-65.
- Fukaura, H., S. C. Kent, et al. (1996). "Antigen-specific TGF-beta1 secretion with bovine myelin oral tolerization in multiple sclerosis." *Ann N Y Acad Sci* **778**: 251-7.
- Furtado, G. C., D. Olivares-Villagomez, et al. (2001). "Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis." *Immunol Rev* **182**: 122-34.
- Graca, L., S. Thompson, et al. (2002). "Both CD4(+)/CD25(+) and CD4(+)/CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance." *J Immunol* **168**(11): 5558-65.

- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389**(6652): 737-42.
- Guillonnet, C., M. Hill, et al. (2007). "CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Clin Invest* **117**(4): 1096-106.
- Guillot, C., P. Mathieu, et al. (2000). "Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression." *J Immunol* **164**(10): 5258-68.
- Hall, B. M., N. W. Pearce, et al. (1990). "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action." *J Exp Med* **171**(1): 141-57.
- Hara, M., C. I. Kingsley, et al. (2001). "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." *J Immunol* **166**(6): 3789-96.
- Hill, M., R. Zagani, et al. (2007). "Nitric oxide and indoleamine 2,3-dioxygenase mediate CTLA4Ig-induced survival in heart allografts in rats." *Transplantation* **84**(8): 1060-3.
- Jones, N. D., N. C. Fluck, et al. (1997). "Deletion of alloantigen-reactive thymocytes as a mechanism of adult tolerance induction following intrathymic antigen administration." *Eur J Immunol* **27**(7): 1591-600.
- Josien, R., P. Douillard, et al. (1998). "A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance." *J Clin Invest* **102**(11): 1920-6.
- Ke, Y., K. Pearce, et al. (1997). "Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance." *J Immunol* **158**(8): 3610-8.
- Kingsley, C. I., M. Karim, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." *J Immunol* **168**(3): 1080-6.
- Kiyomoto, T., T. Ito, et al. (2005). "The potent role of graft-derived NKR-P1+TCRalpha+ T (NKT) cells in the spontaneous acceptance of rat liver allografts." *Transplantation* **80**(12): 1749-55.
- Li, W., K. Carper, et al. (2006). "The role of Foxp3+ regulatory T cells in liver transplant tolerance." *Transplant Proc* **38**(10): 3205-6.
- Liu, Y., N. Chen, et al. (2007). "The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation." *Transplant Proc* **39**(10): 3396-403.
- Lu, L., C. A. Bonham, et al. (2001). "Liver-derived DEC205+B220+CD19- dendritic cells regulate T cell responses." *J Immunol* **166**(12): 7042-52.
- Lutz, M. B., R. M. Suri, et al. (2000). "Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo." *Eur J Immunol* **30**(7): 1813-22.
- McMenamin, C., M. McKersey, et al. (1995). "Gamma delta T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens." *J Immunol* **154**(9): 4390-4.
- McMenamin, C., J. Oliver, et al. (1991). "Regulation of T-cell sensitization at epithelial surfaces in the respiratory tract: suppression of IgE responses to inhaled antigens by CD3+ Tcr alpha-beta- lymphocytes (putative gamma/delta T cells)." *Immunology* **74**(2): 234-9.
- McMenamin, C., C. Pimm, et al. (1994). "Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells." *Science* **265**(5180): 1869-71.
- Mengel, J., F. Cardillo, et al. (1995). "Anti-gamma delta T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice." *Immunol Lett* **48**(2): 97-102.

- Oluwole, S. F., N. C. Chowdhury, et al. (1999). "Mechanism of acquired thymic tolerance induced by a single major histocompatibility complex class I peptide with the dominant epitope: differential analysis of regulatory cytokines in the lymphoid and intragraft compartments." Transplantation **68**(3): 418-29.
- Pearce, N. W., M. F. Berger, et al. (1993). "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. VI. In vitro alloreactivity of T cell subsets from rats with long-surviving allografts." Transplantation **55**(2): 380-9.
- Sbano, P., A. Cuccia, et al. (2008). "Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model." Arch Dermatol Res **300**(3): 115-24.
- Seino, K. I., K. Fukao, et al. (2001). "Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2577-81.
- Seo, N. and K. Egawa (1995). "Suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by gamma/delta T cells in tumor-bearing mice." Cancer Immunol Immunother **40**(6): 358-66.
- Skelsey, M. E., J. Mellon, et al. (2001). "Gamma delta T cells are needed for ocular immune privilege and corneal graft survival." J Immunol **166**(7): 4327-33.
- Sonoda, K. H., M. Exley, et al. (1999). "CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site." J Exp Med **190**(9): 1215-26.
- Sonoda, K. H., M. Taniguchi, et al. (2002). "Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells." J Immunol **168**(4): 2028-34.
- Suciu-Foca, N., J. S. Manavalan, et al. (2003). "Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells." Transpl Immunol **11**(3-4): 235-44.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, et al. (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." J Immunol **160**(3): 1212-8.
- Thebault, P., T. Condamine, et al. (2007). "Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells." Am J Transplant **7**(11): 2472-82.
- Tzachanis, D., A. Berezovskaya, et al. (2002). "Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses." Blood **99**(4): 1465-73.
- VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, et al. (2000). "Human allograft acceptance is associated with immune regulation." J Clin Invest **106**(1): 145-55.
- Weiner, H. L. (2001). "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells." Microbes Infect **3**(11): 947-54.
- Xi, J., Z. Q. Pan, et al. (2007). "[CD4+CD25+ T cells involved in induction of rat corneal allograft immune tolerance]." Zhonghua Yan Ke Za Zhi **43**(12): 1114-8.
- Xu, Y. and J. A. Kapp (2001). "gammadelta T cells are critical for the induction of anterior chamber-associated immune deviation." Immunology **104**(2): 142-8.
- Xu, Y. and J. A. Kapp (2002). "Gammadelta T cells in anterior chamber-induced tolerance in CD8(+) CTL responses." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(11): 3473-9.
- Yang, S. H., J. Z. Jin, et al. (2007). "Role of NKT cells in allogeneic islet graft survival." Clin Immunol **124**(3): 258-66.
- Yu, G., M. Fang, et al. (2008). "Steady state dendritic cells with forced IDO expression induce skin allograft tolerance by upregulation of regulatory T cells." Transpl Immunol **18**(3): 208-19.

- Zeng, D., D. Lewis, et al. (1999). "Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease." J Exp Med **189**(7): 1073-81.
- Zhang, D., W. Yang, et al. (2007). "New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses." Blood **109**(9): 4071-9.
- Zhang, X., L. Izikson, et al. (2001). "Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration." J Immunol **167**(8): 4245-53.
- Zhang, Z. X., L. Yang, et al. (2000). "Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression." Nat Med **6**(7): 782-9.
- Zhou, H., Z. D. Wang, et al. (2007). "CD8+FOXP3+T cells from renal transplant recipients in quiescence induce immunoglobulin-like transcripts-3 and -4 on dendritic cells from their respective donors." Transplant Proc **39**(10): 3065-7.
- Zhou, H. P., D. H. Yi, et al. (2006). "Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft." Transplant Proc **38**(9): 3046-51.

VII- Annexe 2 Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR⁻ class II⁻ B7⁺ regulatory cells

Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR⁻ class II⁻ B7⁺ regulatory cells

Fabienne Haspot, Céline Séveno, Anne-Sophie Dugast, Flora Coulon, Karine Renaudin, Claire Usal, Marcelo Hill, Ignacio Anegon, Michèle Heslan, Régis Josien, Sophie Brouard, Jean-Paul Souillou, Bernard Vanhove

ITERT-INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30, Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France

Article publié dans American Journal of Transplantation en 2005

Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR⁻ Class II⁻ B7⁺ Regulatory Cells

Fabienne Haspot, Céline Séveno, Anne-Sophie Dugast, Flora Coulon, Karine Renaudin, Claire Usal, Marcelo Hill, Ignacio Anegon, Michèle Heslan, Régis Josien, Sophie Brouard, Jean-Paul Souillou and Bernard Vanhove*

ITERT-INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30, Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France

* Corresponding author: Dr. Bernard Vanhove, Bernard.Vanhove@univ-nantes.fr

B7/CTLA-4 interactions negatively regulate T-cell responses and are necessary for transplant tolerance induction. Tolerance induction may therefore be facilitated by selectively inhibiting the B7/CD28 pathway without blocking that of B7/CTLA-4. In this study, we selectively inhibited CD28/B7 interactions using a monoclonal antibody modulating CD28 in a rat model of acute kidney graft rejection. A short-term treatment abrogated both acute and chronic rejection. Tolerant recipients presented few alloantibodies against donor MHC class II molecules, whereas untreated rejecting controls developed anti-MHC class I and II alloantibodies. PBMC from tolerant animals were unable to proliferate against donor cells but could proliferate against third-party cells. The depletion of B7⁺, non-T cells fully restored this reactivity whereas purified T cells were fully reactive. Also, NK cells depletion restored PBMC reactivity in 60% of tolerant recipients. Conversely, NK cells from tolerant recipients dose-dependently inhibited alloreactivity. PBMC anti-donor reactivity could be partially restored *in vitro* by blocking indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) and iNOS. *In vivo*, pharmacologic inhibition of these enzymes led to the rejection of the otherwise tolerated transplants. This study demonstrates that an initial selective blockade of CD28 generates B7⁺ non-T regulatory cells and a kidney transplant tolerance sustained by the activity of IDO and iNOS.

Key Words: Kidney graft, tolerance, costimulation blockade, CD28

Received 5 January 2005, revised 27 April 2005 and accepted for publication 17 May 2005

Introduction

Costimulation is required for effector or regulatory T lymphocytes to respond optimally following the engagement of their T-cell receptor (TCR). Costimulation blockade has been widely investigated as an approach to control T-cell reactivity in autoimmunity and transplantation. CD28 is one of the best-characterized costimulatory molecules. It is expressed on T cells, NK cells, neutrophils (1) and eosinophils (2), and binds to B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on antigen presenting cells (APC). CD28 costimulation leads to high-level interleukin-2 (IL-2) production, provides an essential survival signal for T cells and regulates T-cell cycle entry and progression through the G1 phase in an IL-2-independent manner (3). In human NK cells, CD28 has been described as a putative positive signal for cytotoxicity, acting in a B7-CD28-dependant manner (4). CTLA-4 (CD152) is another ligand of B7 that, when engaged on resting T cells, despite being expressed at low levels, transmits a signal to block transition from G0 to G1 (5). Recent analyses suggest that CTLA-4 out-competes CD28 for binding to B7-1 (6). CTLA-4/B7-1 interactions result in an IFN- γ -dependant up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a tryptophan catabolizing enzyme with immunosuppressive activity (7), in B7-positive APC. Such CTLA-4/B7 molecular interactions have been shown to sustain transplant tolerance in mice (8). Therefore, allowing CTLA-4/B7 interactions to proceed in the absence of CD28 costimulation may combine the effect of a lack of costimulation with a cell growth arrest or a clonal deletion, depending on whether blockade is applied to resting or activated T cells (9). *In vivo*, experimental data have demonstrated that CD28 masking or internalization prolongs allograft survival (10,11) and reverses the induction of autoimmunity (12,13). Also, targeting CD28, but not B7, can reverse an ongoing GVHD (14), suggesting an immunosuppressive role for preserved CTLA-4/B7 interactions.

Recently, the possibility of targeting CD28 as a therapeutic approach has been highlighted by several findings: in addition to the antagonistic effect of Fab fragments or modulating antibodies in rodents, monovalent recombinant (15) or 'silenced,' non-mitogenic antibodies (16) have been produced and might become available for use in humans. Moreover, over-stimulation of CD28 with agonistic antibodies has been reported to result, paradoxically, in the

depletion of peripheral alloreactive (17) or autoreactive T cells (18).

Because the selective inhibition of CD28 is expected to maintain the immunosuppressive CTLA-4/B7 interactions that have been implicated in the development of regulatory T cells (8), we investigated the effect of selective CD28 blockade on allograft rejection and/or tolerance. Several anti-rat CD28 Ab have been described, one of which (clone JJ319) induces CD28 internalization *in vivo* (19). While this Ab, after receptor engagement, may transiently activate T cells during the modulation process, its effect appears to be equivalent to a functional CD28 blockade in that it inhibits the alloreactive response of T cells stimulated by allogenic APC without causing T-cell depletion (10). Although this Ab prevents allograft vasculopathy in the F344-to-LEW rat kidney allotransplantation model of chronic rejection (11), it has been shown to delay heart allograft rejection without tolerance induction (10). In this article, we show that administration of anti-CD28 JJ319 antibody results in a state of functional tolerance without chronic rejection in a model of acute kidney graft rejection. Such tolerant recipients possess regulatory non-T cells in their blood, which control alloreactivity in part through the action of IDO.

Materials and Methods

Animals and transplantations

Eight-week old LEW.1A (RT1^a) and LEW.1W (RT1^u) male rats were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). Kidney allografts were performed as previously described (20): one native LEW.1A kidney was replaced by the LEW.1W allograft and a contralateral nephrectomy was performed 7 days later, after which time the recipient survival depended on the proper functioning of the allograft.

Antibodies, reagents and treatments

The JJ319 (IgG1 anti-rat CD28) mouse hybridoma was a gift from Dr. Thomas Hunig (Wurzburg, Germany). The mouse anti-rat mAbs OX6 (class II), OX33 (CD45RA), OX76 (RT1a type), ED-1 (macrophages), R7-3 (TCR β), 3.2.3 (NKR1p), OX8 (CD8), OX42 (CD11b/c), OX81 (IL-4) and 3G8 (irrelevant Ig) were produced in our laboratory from hybridomas obtained from the ECACC (Salisbury, UK). The rat CD6 (OX52), His24 (CD45), 3H5 (CD80) and 24F (CD86) antibodies were from BD Bioscience (Le Pont de Claix, France), and the anti-IgG2a, IgG2b, IgG2c and IgG1 were from Technopharm (Paris, France). The FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L), FITC-conjugated goat anti-rat IgM μ chain and phycoerythrin-conjugated streptavidin were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The biotin-conjugated horse anti-mouse IgG and the horseradish peroxidase streptavidin were from Vector Laboratories (Abcys, Paris, France). The neutralizing rabbit Ab anti-rat IL-10 and normal rabbit IgG (both provided by J. Khalife, Institut Pasteur, Lille, France) were used at 10 μ g/mL. The neutralizing anti-INF- γ DB-1 MoAb (Serotec, Cergy Saint-Christophe, France) was used at a final concentration of 20 μ g/mL. Human rIL-2 was used at 100 U/mL. The 1-Methyl-DL-tryptophan (1-MT; Sigma) was used at 1 mg/mL. iNOS specific inhibitor aminoguanidine was injected *i/p* twice daily at 100 mg/injection during 17 days. IDO specific inhibitor, 1-MT was also administered twice daily by oral gavages at 50 mg/dose during 15 days.

Mixed leukocyte reactions

Mixed leukocyte reactions (MLRs) were performed as previously described (21), except that 5 mM N⁶-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; Sigma) was added to the medium. Spleen dendritic cells, used as APC, were enriched from LEW.1W spleens by a 14.5% Nicodenz gradient as previously reported (22). T cells were purified by warm nylon wool adherence followed by depletion of OX6 (MHC II) and 3.2.3 (CD161) positive cells with magnetic beads (Dyna, Compiègne, France). Proliferations were measured after 5 days. Cell depletions or enrichments (OX42, OX6, OX8, IgM, His24, B7 and 3.2.3) were performed with magnetic beads, or by FACS sorting (Aria cell sorter, Beckton Dickinson, Aalst, Belgium). Coculture assays were performed with 10⁵ responding LEW.1A T cells stimulated with 10⁵ LEW.1W APCs, to which were added different amount of purified NK (3.2.3⁺) cells.

Alloantibody detection

Alloantibodies were analyzed by flow cytometry, by incubating splenocytes with diluted (1/20) sera, as described (23). Alloreactivity was analyzed following separate gating on OX33⁺ cells (class I and II positive B cells) and on OX33⁻ cells (class I positive cells).

Immunizations against SRBC

At 100 days post-transplantation, tolerant animals received an *i.v.* injection of 10⁹ SRBC in 800 μ L sterile PBS. Serum levels of anti-SRBC Abs were determined 17 days later by flow cytometry.

Immunostaining

Graft samples were embedded in Tissue Tek (OCT Compound, Torrance, CA, USA), snap-frozen in liquid nitrogen, cut into 5 μ m sections and fixed in acetone. Endogenous biotin activity was blocked using the Dako biotin blocking system (Dako, Trappes, France). Sections were then labeled using a three-step indirect immunoperoxidase technique, as described (24). Control sections were performed by replacing the primary mAb with dilution buffer. Alloantibody deposition was assessed by immuno-fluorescence following staining with a FITC-conjugated mouse anti-rat IgM or IgG (Jackson). Tissue sections were mounted using anti-fading mounting medium (Dako). Naïve kidneys were used as negative control.

Histopathology

Histopathological evaluation of kidney allograft samples was performed on formalin-fixed paraffin sections stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, Masson trichrome and Methenamin-Silver. Histological lesions were classified and scored by a pathologist (K.R.) blinded to the study.

Apoptosis analysis

ApoStat (R&D Systems, Lille, France) reagent was added to the cells according to the manufacturer's instructions. Unstimulated cells and cells in serum-free medium were used as negative and positive controls, respectively. The cells were harvested, washed, labeled with biotinylated R7.3 Ab and revealed with PerCP-Cy5-5-conjugated streptavidin (BD Bioscience). Analysis was performed by flow cytometry after gating on R7.3-positive T cells. Dead cells were excluded from acquisition by staining with the TO-PRO-3 reagent (Molecular Probes, Brussels, Belgium).

Statistical analyses

Statistical significance was evaluated using a Kruskal-Wallis test for the comparison of three groups or more, or a Mann-Whitney test for the comparison of two groups. Graft survival was evaluated by Kaplan-Meier analysis using the log rank test.

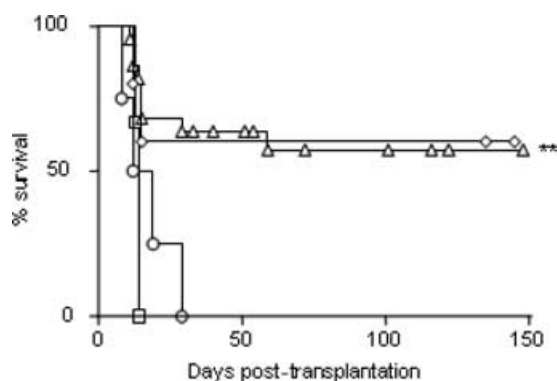


Figure 1: Administration of anti-CD28 Ab promotes kidney allograft survival. LEW.1A rats received a LEW.1W kidney allograft and the second, contralateral, kidney of the recipient was removed 7 days later. Recipients received the following treatments: 4 mg/kg/day of anti-CD28 Ab from day 0 to day 7 (Δ ; $n = 21$); 4 mg/kg/day of anti-CD28 Ab from day 1 to day 2 (\square ; $n = 3$); 4 mg/kg/day of control IgG from day 0 to day 7 (\circ ; $n = 3$). Syngenic grafts were also performed, in which case no treatment was given (\diamond ; $n = 5$). ** $p < 0.01$.

Results

Administration of the JJ319 Ab promotes long-term acceptance of kidney allografts without chronic rejection

The JJ319 modulating anti-rat CD28 mAb was administered to LEW.1A rat recipients of life-sustaining kidney grafts from fully mismatched LEW.1W donors immediately after transplantation. Treatment with JJ319 for 8 days internalized CD28 on T lymphocytes for 14 days (data not shown). Sixty percent of the recipients receiving anti-CD28 from day 0 to day 7 survived long-term (Figure 1), which was similar to the proportion of long-term survivors who had received syngenic kidney grafts. The substantial fraction of graft failure in this model was found to be mostly related to an early obstacle to urine drainage. Control-treated recipients and recipients receiving low doses of JJ319 rejected between days 14 and 21 post-transplantation, (i.e. 7–14 days after the contralateral nephrectomy). One hundred days after transplantation, urea and creatinine levels were stable and almost equivalent in the sera of long-term survivors treated with anti-CD28 antibodies (11.7 ± 3.2 mmol/L urea and 51 ± 12.6 μ mol/L creatinine; $n = 5$) and in the sera of syngenic graft recipients analyzed in parallel (8 ± 0.4 mmol/L urea and 34 ± 0 μ mol/L creatinin; $n = 3$).

Anti-CD28-treated recipients surviving long-term had no histological signs of chronic rejection (i.e. no allograft glomerulopathy and no vascular fibrous intimal thickening) at 250 days post-transplantation. The five tolerated allogenic grafts analyzed presented a mild grade 1 non-specific chronic nephropathy with foci of interstitial fibrosis and inflammation representing less than 25% of the cortical

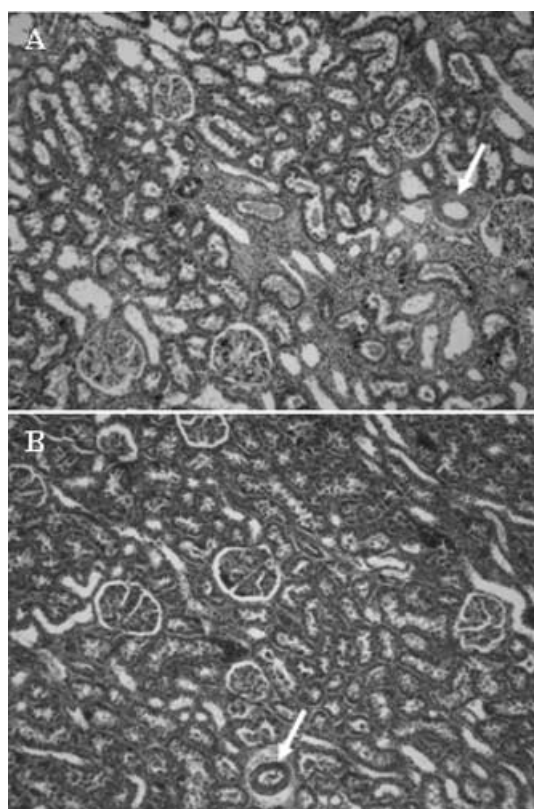


Figure 2: Histological examination of kidney grafts. Histological findings in tolerated allografts and syngenic grafts are shown. (A) Anti-CD28-treated recipients surviving long-term showed mild interstitial fibrosis and tubular atrophy with foci of moderate mononuclear cell infiltrate and no glomerular or vascular lesions. (B) Syngenic grafts showed minor histological injury (magnification $\times 200$). Arrows: blood vessels.

area, and slight tubular atrophy (Figure 2). They exhibited no allograft glomerulopathy and no vascular fibrous intimal thickening. Syngenic grafts showed minor histological injury. Control-rejecting animals developed severe grade III acute rejection (data not shown). As a matter of comparison, lesions of chronic rejection were observed when long-term kidney allograft survival was induced by treatment with cyclosporin A for 4 days post-transplantation as described (25). In the same rat strain combination, induction of long-term heart or kidney allograft survival by donor-specific transfusions or CD40 pathway costimulation blockade have also been associated with chronic rejection (R. Josien and K. Renaudin, University Hospital, Nantes, July 2004, personal communication), (23).

Leukocyte infiltration of long-surviving grafts

To assess the mechanisms by which the selective blockade of the CD28-B7 pathway promoted graft survival and prevented chronic rejection lesions, leukocyte subsets were measured in tolerated kidney grafts at day 100 post-transplantation. This analysis revealed a pattern

Table 1: Immunohistological analysis of tolerated kidney allografts 100 days after transplantation

| | Days post-transplantation | OX33 | OX76 | ED1 | R7.3 | OX39 |
|-----------|---------------------------|-------|---------|---------|---------|--------|
| Allogenic | >100 | F+/D- | F++/D++ | F++/D++ | F++/D++ | F-/D++ |
| Syngenic | >100 | F-/D- | ND | F-/D+ | F-/D+ | F-/D+ |

Analysis of B cells (OX33), class II⁺ cells (OX76), macrophages (ED1), T cells (R7.3) and CD25⁺ cells (OX39) was performed in allografts (n = 5) and syngenic grafts (n = 3). The level of infiltration is reported as follows: -: no infiltration; +: slightly infiltrated; ++ infiltrated; +++ highly infiltrated. F: focal infiltrate. D: diffuse infiltrate, ND: not defined.

different to that observed in syngenic grafts where rare and diffuse infiltration occurred. Tolerated kidneys exhibited more mononuclear cells that were focally distributed in the parenchyma and around some glomeruli and were comprised of class II-positive macrophages and T cells, with few B cells. Interestingly, most T-cells infiltrating allografts were CD25⁺, whereas this was rarely observed in syngenic grafts (Table 1).

Skewed alloantibody responses in tolerant animals

In order to examine the effect of the selective and initial CD28 blockade on alloantibody responses, we analyzed serum levels of alloantibodies in tolerant recipients 100 days post- transplantation and compared them with those of rejecting, untreated recipients maintained without contralateral nephrectomy for 100 days. Tolerant recipients showed significant levels of alloantibodies dominantly directed to donor MHC class II molecules and of the non-complement-fixing IgG1 isotype. Very few anti-donor MHC class I alloantibodies were detectable (Figure 3A). In contrast, rejecting recipients had high levels of Abs directed against donor MHC class I and II molecules, as well as Abs of the IgG1 and IgG2b isotypes (Figure 3B). In spite of the presence of alloantibodies in the sera of tolerant animals, only a few deposits of IgG, restricted to some glomeruli, could be found in the graft. No IgG or IgM deposition was present on vessel walls. Complement deposition (C5b9) was visible on some glomeruli, but was also detected in syngenic grafts. Such moderate complement deposition was absent in non-transplanted, normal kidneys, suggesting that it was induced by the transplantation itself and not by immunological factors (Table 2).

Non-T-cell-dependant inhibition of alloreactivity in tolerant recipients

One hundred days after transplantation, the blood leukocytes from tolerant recipients failed to proliferate against donor APC. This unresponsiveness was donor-specific since the leukocytes proliferated normally when stimulated with third party Brown Norway (RT1ⁿ) rat APC. In contrast, T cells purified from these leukocytes proliferated normally after stimulation by donor and third-party cells. Similarly, unfractionated nucleated spleen cells from LS recipients displayed a 70% reduction in proliferative capacity in response to donor APC compared to naïve spleen cells but proliferated normally to third-party stim-

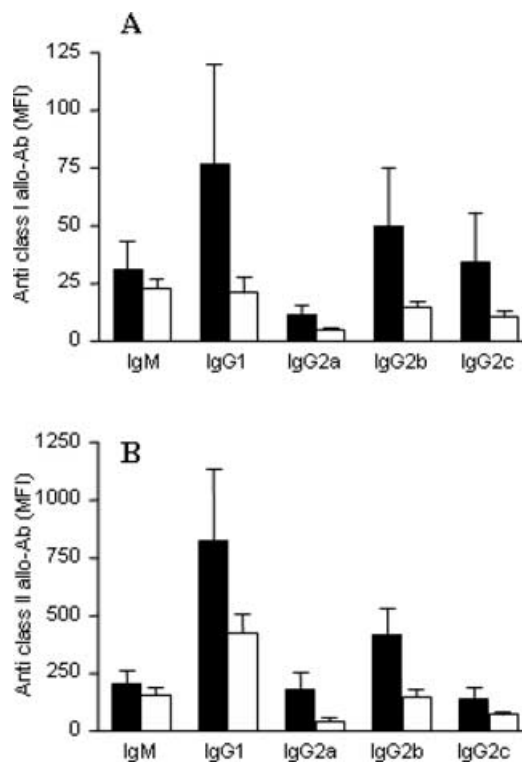


Figure 3: Alloantibody responses in tolerant animals. Sera (dilution 1/20) from tolerant (n = 8; white bar) and rejecting recipients (n = 3; black bar) were analyzed 100 days after transplantation. Reactivity against class I (A) and class II (B) was evaluated by flow cytometry using donor-type splenocytes as targets and expressed as mean ± SEM. MFI: mean fluorescence intensity.

ulation. Again, the proliferation of purified T cells from the spleen of LS recipients was similar to that of T cells from naïve rats. Finally, the lymph node cells from LS recipients proliferated normally to donor and third-party stimulation (Figure 4).

In order to identify the cell population within the blood leukocytes of tolerant recipients that was responsible for inhibiting T-cell proliferation, different cell subpopulations were depleted prior to the MLR assays. Neither the removal of >95% of CD11b/c⁺, CD8⁺ or IgM⁺ (as well as His24⁺, data not shown) nor class II⁺ cells significantly

Table 2: Alloantibodies and complement deposition in allografts (n = 5) and syngenic grafts (n = 3)

| | Days post-transplantation | IgG | | IgM | | C5b9 | |
|-----------|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
| | | Vessels | Glomeruli | Vessels | Glomeruli | Vessels | Glomeruli |
| Allogenic | >D100 | – | + | – | + and – | + and – | + and – |
| Syngenic | >D100 | – | – | – | ++ | – | + |
| Naïve | N.R. | – | – | – | – | – | – |

Graft biopsies were analyzed by immunofluorescence as described in the Materials and Methods section. Intensity of the staining was evaluated according to an arbitrary scale that was defined as follows: –: negative; + and –: positive and negative glomeruli or vessels on the same slide; +: weakly positive; ++ positive; +++ strongly positive. N.R.: not relevant.

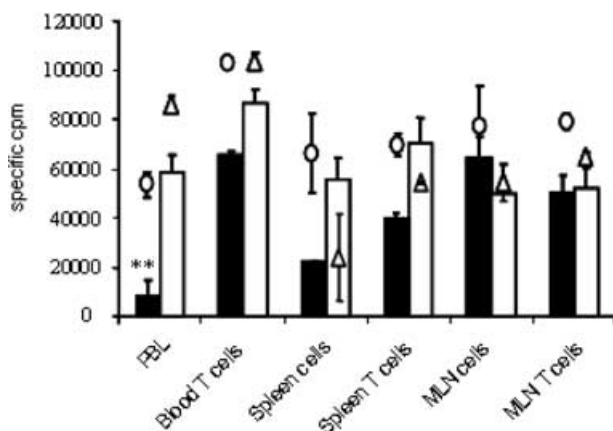


Figure 4: Proliferation of PBMC from tolerant recipients in MLR. Proliferation of tolerant (>100 days after transplantation) rat cells to donor LEW.1W APC (black bars) or third party LEW.BN APC (white bars) was compared to the proliferation of naïve LEW.1A rat cells to donor APC (o) and third party BN APC (Δ). The data shown are means of triplicates ± SEM from one experiment for each condition, representative of three experiments for the spleen and lymph nodes and of at least six for the blood. **significant at $p < 0.01$.

restored the proliferation of tolerant leukocytes (Figure 5A). In order to maintain activated T cells that might express class II molecules in the cell cultures, depletion was also performed by FACS sorting of class II positive, non-T cells ($CD6^-$ class II $^+$). Again, proliferation was not restored. Furthermore, control naïve leukocytes depleted in parallel showed normal proliferation capacities (data not shown). However, interestingly, removal of non-T cells, B-7 positive cells ($CD6^-B7^+$ cells) completely restored the proliferation of blood leukocytes from tolerant rats (Figure 5A). In five additional experiments, depletion of 3.2.3-positive cells (NK and NKT) also restored the proliferation of leukocytes in three tolerant recipients whereas it failed to do so in two others (Figure 5B). Conversely, sorted ($3.2.3^+$) NK cells from tolerant recipients dose-dependently and completely inhibited alloreactivity in coculture MLR assays (Figure 5C).

Inhibition of IDO and cytokines in MLR

In order to identify the effector mechanism of the regulation observed *in vitro*, and since IDO has been shown to be a major effector molecule in tolerance controlled by B7/CTLA-4 interactions (26), we first inhibited IDO with 1-MT in MLR with tolerant cells. Addition of 1-MT increased proliferation sixfold ($p = 0.05$) to reach 40% of the level obtained with naïve leukocytes (Figure 6A). Addition of exogenous rIL-2 did not significantly restore proliferation and no additive effect with 1-MT could be revealed. In order to analyze whether cytokines shown to participate in regulatory mechanisms in other systems (27) were involved, neutralizing antibodies against IL-4 and IL-10 were added to the MLR but had no effect on T-cell proliferation. In contrast, anti- $INF-\gamma$ antibodies restored most of the proliferation in this assay (Figures 6B and C).

IDO and iNOS sustained the tolerance in vivo

Since IDO and iNOS played a role in the inhibition of T-cell alloreactivity *in vitro*, we investigated their role in the maintenance of tolerance *in vivo*. Three stable tolerant animals (>300 days after transplantation) were treated using the IDO-specific inhibitor, 1-MT and the iNOS-specific inhibitor, aminoguanidine. A short-term treatment (15 days for 1-MT and 17 days for aminoguanidine) led to rejection on days 11, 16 and 20 after treatment induction. In parallel, control rats receiving the same treatment remained healthy and had a normal kidney function at day 20 (i.e. 5.4 ± 0.4 mmol/L urea and 23 ± 2.6 μ mol/L, $n = 3$), indicating that this treatment was not nephrotoxic.

Apoptosis of alloantigen responding cells in MLR

Since up-regulation of IDO is known to enhance apoptosis of responding T cells, both through local tryptophan deprivation and by the action of tryptophan metabolites (28), we determined whether the observed IDO-dependent inhibition of tolerant T cells in MLR could be related to enhanced apoptosis. Twenty-four hours after initiation of an MLR, the percentage of tolerant T cells with activated caspases reached 45%, whereas this proportion was only 14% when T cells from naïve animals were assessed. Interestingly, when unstimulated PBMC from tolerant recipients were cultured in the same conditions, T-cell apoptosis was also

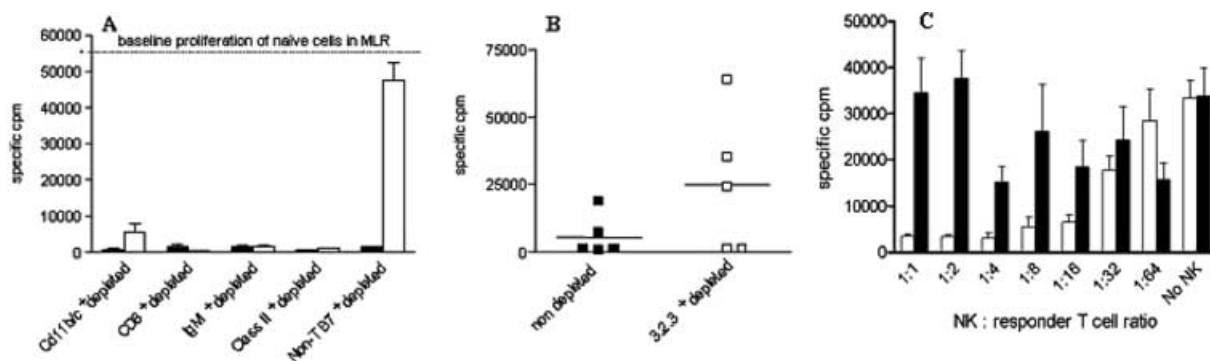


Figure 5: Identification of suppressive cells in MLR. (A) PBMC from naïve animals or from tolerant recipients were analyzed in MLR before (black bars) and after depletion (white bars) of OX42⁺ (n = 3), OX8⁺ (n = 3), IgM⁺ (n = 3), OX6⁺ (n = 3) or CD6⁺B7⁺ (n = 6) cells. The data presented are mean ± SEM of the indicated number of independent experiments for each type of depletion. (B) The same analysis was performed after depletion of 3.2.3⁺ cells. Cell viability after depletion was confirmed by their ability to proliferate upon Con A stimulation. The results shown are from five individual experiments. Depletion was routinely greater than 96% and always above 90%. (C) NK (3.2.3⁺) cells purified from the blood of naïve animals or tolerant recipients were added to MLR assays in which responding LEW.1A T cells were stimulated by LEW.1W APCs. Proliferation was measured after 5 days. The data are mean ± SEM of four independent blood sampling.

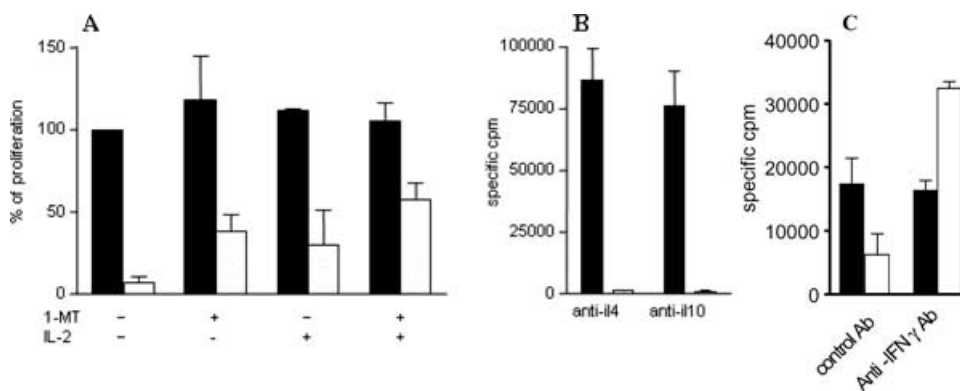


Figure 6: Implication of IDO and cytokines in the suppression of T cell proliferation. (A) 1-MT was added to MLR to assess the role of IDO. The percentage of proliferation was calculated for each independent experiment with 100% being the proliferation of naïve cells stimulated with LEW.1W APC. The data are presented as mean ± SEM of five independent experiments for tolerant recipients (white bars) and of two independent experiments for naïve animals (black bar). (B) Neutralizing anti IL-4 and IL-10 antibodies were added to the MLR from tolerant (white bars) or naïve animals (black bar). The data are mean ± SEM of triplicates, representative of four independent experiments. (C) Neutralizing anti-IFN- γ antibodies were added to the MLR from tolerant (white bars) or naïve animals (black bar). The data are mean ± SEM of triplicates, representative of two independent experiments.

significantly higher than when naïve PBMC were assessed ($p = 0.02$; Figure 7).

Phenotype of PBMC from anti-CD28-treated tolerant rats

The percentages of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD28⁺ cells among the PBMC from tolerant recipients were similar to those observed in naïve rats. However, the phenotype of CD3⁺ T cells analyzed by two-color immunofluorescence revealed more CD25⁺ T cells in tolerant recipients (9% ± 6.2; n = 4) than in naïve animals (5% ± 2.4; n = 5). Less CD62L⁺ T cells were found in tolerant animals (36% ± 25; n = 4) than in controls (61% ± 34; n = 5, Figure 8A). Similar findings were noted after gating on CD4⁺ and CD8⁺ cells

(data not shown). Since the depletion of CD11b/c⁺ cells from the MLR did not eliminate the suppressive activity, we analyzed the phenotype of CD11b/c⁻ cells by 2-color immunofluorescence. An up-regulation of B7-1 (20% ± 9; n = 3), and to a lesser extent, B7-2 (27% ± 13; n = 4), was observed, as compared with the same cells in naïve animals (11% ± 4; n = 4 and 20% ± 7; n = 5 for B7-1 and B7-2, respectively) (Figure 8A). In the PBMC of naïve controls, the level of NKRP-1⁺ cells (NK and NKT) was 15% ± 2.2, whereas it was 25.3% ± 4.6 in tolerant allograft recipients (n = 4; $p < 0.05$). These abundant NKRP-1⁺ cells also displayed a significantly up-regulated B7-1 expression (80% vs. 50% in controls; $p < 0.05$). The same analysis, when gated on TCR⁺ cells, revealed a similar situation for

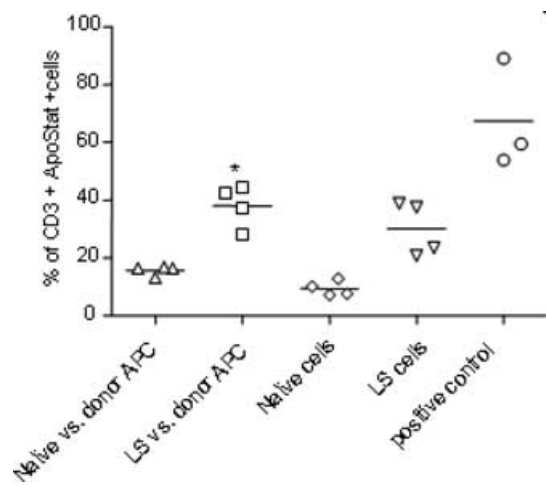


Figure 7: Analysis of apoptosis in MLR. PBMC from tolerant or naïve rats were stimulated by LEW.1W APC for 24 h. Unstimulated cells in culture medium and cells maintained in culture without serum were used as controls. Activated caspases were stained with the ApoStat-FITC reagent and T lymphocytes were analyzed by FACS after gating on CD3⁺ cells. LS, long surviving recipient. *significant at $p < 0.05$.

NKT cells (Figure 8B). Conversely, CD28 was found to be down-regulated on NKRP-1⁺ cells (8% vs. 20% in controls; Figure 8B).

Tolerant animals were not immunosuppressed

To determine whether the tolerant recipients were immunocompetent, they were injected with SRBC 100 days after transplantation and their specific immune response was analyzed. The IgG and IgM anti-SRBC (Figure 9) responses of these animals were at least as strong as those measured in controls and no evidence for any dominance of an Ig subclass was observed.

Discussion

In this study, we found that administration of an anti-CD28 mAb that induces receptor internalization also induced the survival of kidney allografts in a rat strain combination where controls underwent acute rejection. Despite the fact that tolerant allograft recipients displayed a detectable peripheral anti-donor alloantibody response, no histological signs of chronic rejection were detected, even several months after transplantation. There are several possible reasons for this. First, alloantibodies are mainly directed toward donor class II molecules, which are not expressed on resting endothelial cells, and might be harmless. Second, the dominant isotype of alloantibodies in these tolerant animals was IgG1, a non-complement-fixing Ab in rodents (29). Finally, only a moderate Ig, and no significant complement deposition was observed within the tolerated transplants (Table 2). These data are consistent with the idea that the alloantibody response in tolerant recipients

was not harmful and that chronic graft rejection in the rat might not be related to alloantibodies.

In tolerant recipients, anti-CD28 mAb treatment may regulate alloreactivity by three mechanisms: T-cell death, T-cell anergy or ignorance, and induction of regulatory cells. Our data favor a hypothesis implicating the second mechanism in the induction phase of tolerance and the third mechanism later in the maintenance phase. This is because: (i) alloreactivity is blocked *in vivo* during the anti-CD28 treatment (21), (ii) donor-reactive T cells could be found in the spleen and blood of tolerant recipients and therefore had not been deleted and (iii) the proliferation of donor-reactive T cells in MLR was inhibited in the presence of non-T cells. Given that IDO reactivity mediates the immunosuppressive effect of CTLA4-Ig on APC (7) or of CTLA-4⁺ regulatory T cells (26) after interaction with B7, we tested the role of IDO and B7⁺ cells in the control of proliferation of tolerant-derived donor-reactive T cells. Depletion of non-T B7⁺ cells from the blood unequivocally restored the anti-donor reactivity of T cells (Figure 5A). In MLR using naïve responding cells, the depletion of non-T B7⁺ cells did not increase the measured proliferation (data not shown), indicating that these cells do not act in the same way as the naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contributing to maintaining self-tolerance (30,31). Rather, our cells appeared to specifically inhibit primed alloreactive cells. Since the depletion of B cells, CD11b/c⁺, CD8⁺ or class II⁺ cells could not abrogate the suppression, we concluded that the cells responsible for the inhibition of donor-reactive T-cell proliferation were B7⁺ class II⁻ CD11b/c⁻ non-T non-B cells. The depletion of NKRP-1⁺ cells gave less clear-cut results since recovery of proliferation was obtained in only three out of five animals (Figure 5B). Moreover, the addition of purified NK cells in coculture MLR assays did inhibit the alloreactivity of T cells (Figure 5C). The FACS analysis of gated NKRP-1⁺ cells revealed a considerable up-regulation of B7-1 on these cells. However, B7 was also found to be up-regulated on other cell types that could also account for the suppressive effect described here (27, 32–36). Altogether, our data suggest that several cell types could act as suppressors in blood using a common mechanism driven by the engagement of B7 molecules and the up-regulation of IDO. The fact that anti-IFN- γ antibodies block the suppression *in vitro* (Figure 6C) is compatible with an involvement of IDO, since activation of IDO is dependant on the availability of IFN- γ (7). *In vivo* as well, the blockade of IDO resulted in tolerance inhibition and rejection, indicating that the IDO-dependant regulatory non-T cells in blood might support the tolerance state. Although devoid of histological signs of chronic rejection, the tolerated kidney grafts were infiltrated by activated macrophages and T cells (Table 1). Since graft-infiltrating cells in tolerated organs in the rat have been implicated in the local suppression of alloreactive T cells (37,38), such cells might also participate in graft acceptance here, with similar and/or different mechanisms from those we studied in the blood.

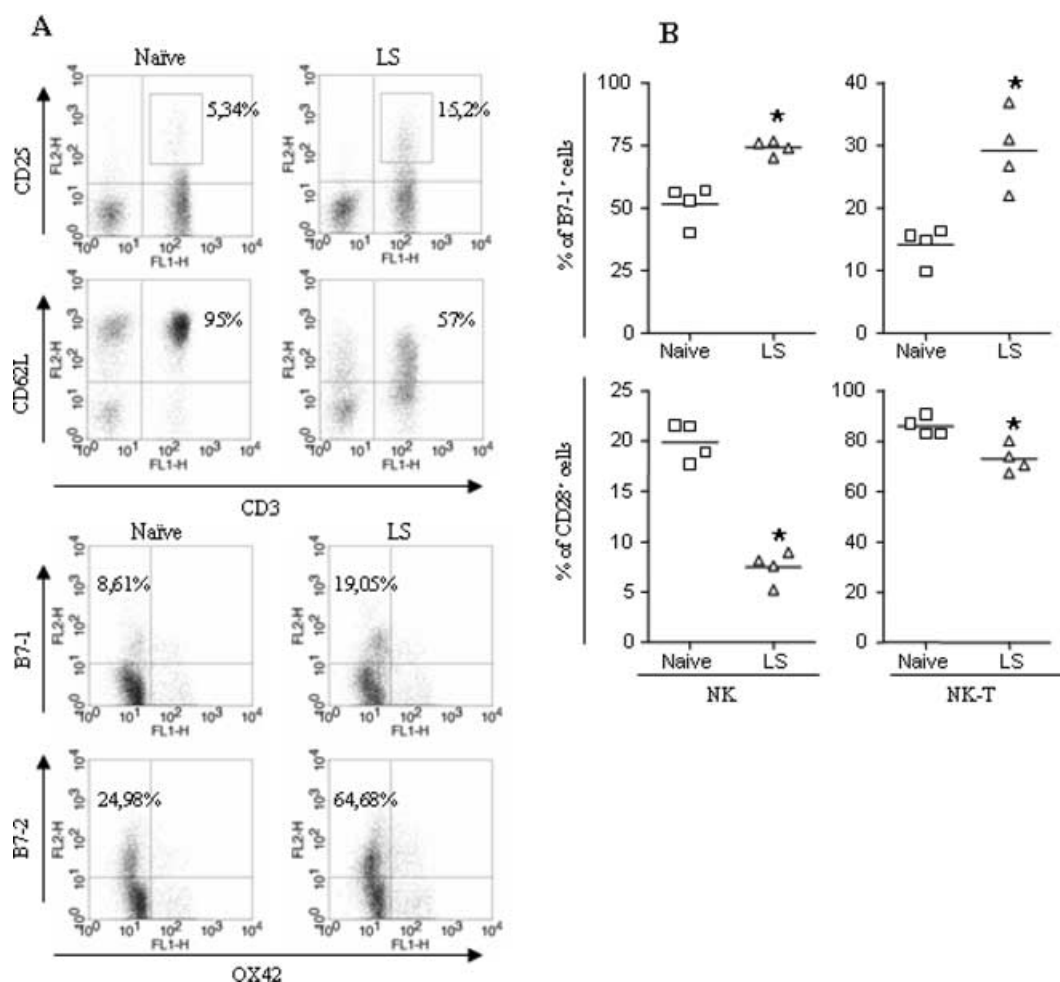


Figure 8: Phenotype of PBMC from tolerant recipients. (A) PBMC were analyzed by FACS 100 days after transplantation. The numbers within each window represent the percentage of CD25 or CD62L⁺ cells among the CD3⁺ cells (upper panel), and of B7-1⁺ or B7-2⁺ cells among the OX42⁺ cells (lower panel). One out of four experiments for tolerant cells and one out of five for naïve cells are illustrated. (B) NK and NKT cells were analyzed by double staining for B7-1 and CD28 expression (n = 4; *significant at p < 0.05). LS, long surviving recipient.

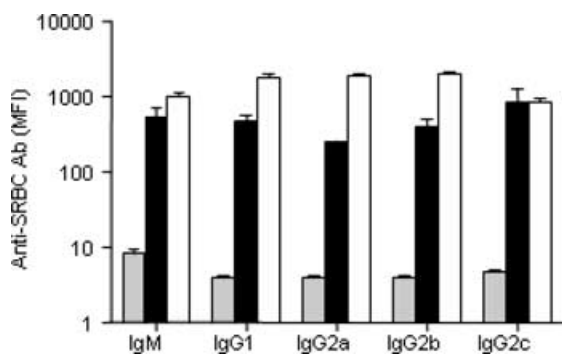


Figure 9: Ab responses after immunization with SRBC. Tolerant recipients (white bars) and naïve rats (black bars) were immunized with i.v. injection of SRBC. Ab responses were assessed 17 days later by flow cytometry. Shaded bars: background signal. The data are means of triplicates ±SEM and representative of two animals in each group.

In mixed lymphocyte reactions, we found the suppression driven by non-T class II⁻ B7⁺ regulatory cells to be donor specific (Figure 4). One possible explanation is that anti-donor, primed T cells interact with these non-T regulatory cells in a non-cognate manner. Because the regulation is B7⁻ and IDO-dependant, this interaction is likely to occur through the interaction of CTLA-4 up-regulated on primed alloreactive T cells with CD80 on regulatory cells. This interaction may not be effective with unprimed T cells (third party APC) that express low membrane levels of CTLA-4. On the basis of our observation that anti-RT1A^U (donor type) T cells from naïve rats proliferated in mixed lymphocyte reactions, whereas anti-RT1A^U cells from tolerant recipients underwent more apoptosis in the presence of regulatory cells (Figure 6), it is possible that CTLA-4/B7 interactions controlled anti-donor reactivity by inducing apoptosis. This would be in accordance with the description that signals transmitted through

CTLA-4 in activated T cells result in Fas-independent cell death (9).

In conclusion, in anti-CD28-induced kidney allograft tolerance in the rat, we show that the anti-donor response is controlled by non-cognate, B7-dependant, non-T cells and by the activity of IDO. These data, together with other recent reports of the use of anti-CD28 agents in transplantation (17) and autoimmunity (18), strongly suggest that these therapeutic agents might be useful in the clinic.

Acknowledgments

We are grateful to H. Smith, E. Merieau and B. Martinet for animal care. This work was supported in part by the 'Progreffe' foundation and by the 'Vaincre La Mucoviscidose' association. F.H. has a fellowship from the INSERM/Région Pays de la Loire.

References

1. Venuprasad K, Parab P, Prasad DV et al. Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1536–1543.
2. Woerly G, Roger N, Loiseau S, Dombrowicz D, Capron A, Capron M. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J Exp Med* 1999; 190: 487–495.
3. Boonen GJ, van Dijk AM, Verdonck LF, van Lier RA, Rijksen G, Medema RH. CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1999; 29: 789–798.
4. Galea-Lauri J, Darling D, Gan SU et al. Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J Immunol* 1999; 163: 62–70.
5. Blair PJ, Riley JL, Levine BL et al. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol* 1998; 160: 12–15.
6. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 2002; 17: 201–210.
7. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3: 1097–1101.
8. Tsai MK, Ho HN, Chien HF, Ou-Yang P, Lee CJ, Lee PH. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 2004; 77: 48–54.
9. Scheipers P, Reiser H. Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10083–10088.
10. Dengler TJ, Szabo G, Sido B et al. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 392–398.
11. Dong VM, Yuan X, Coito AJ, Waaga AM, Sayegh MH, Chandraker A. Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73: 1310–1317.

12. Perrin PJ, June CH, Maldonado JH, Ratts RB, Racke MK. Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999; 163: 1704–1710.
13. Silver PB, Hathcock KS, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance. *J Immunol* 2000; 165: 5041–5047.
14. Yu XZ, Bidwell SJ, Martin PJ, Anasetti C. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2000; 164: 4564–4568.
15. Vanhove B, Laflamme G, Coulon F et al. Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody. *Blood* 2003; 102: 564–570.
16. Tso JJ, Hinton P, Vasquez M et al., inventors; Silenced anti-CD28 antibodies and use thereof. Patent US 2004/0116675 A1 Jun. 17, 2004.
17. Yu XZ, Albert MH, Martin PJ, Anasetti C. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J Clin Invest* 2004; 113: 1624–1630.
18. Schmidt J, Elflein K, Stienekemeier M et al. Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies. *J Neuroimmunol* 2003; 140: 143–152.
19. Tacke M, Hanke G, Hanke T, Hunig T. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* 1997; 27: 239–247.
20. Souillou JP, Carpenter CB, d'Apice AJ, Strom TB. The role of non-classical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J Exp Med* 1976; 143: 405–421.
21. Haspot F, Villemain F, Laflamme G et al. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 2002; 99: 2228–2234.
22. Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002; 169: 2284–2291.
23. Guillot C, Guillonnet C, Mathieu P 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* 2002; 168: 1600–1609.
24. Sébille F, Guillet M, Brouard S et al. T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *American Journal of Transplantation* 2001; 1: 21–28.
25. Vogt P, Hiller WF, Steiniger B, Klempnauer J. Differential response of kidney and pancreas rejection to cyclosporine immunosuppression. *Transplantation* 1992; 53: 1269–1272.
26. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206–1212.
27. Guillot C, Menoret S, Guillonnet C et al. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 2003; 101: 3325–3333.
28. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1069–1077.
29. Bruggemann M, Teale C, Clark M, Bindon C, Waldmann H. A matched set of rat/mouse chimeric antibodies. Identification and biological properties of rat H chain constant regions mu, gamma 1,

- gamma 2a, gamma 2b, gamma 2c, epsilon, and alpha. *J Immunol* 1989; 142: 3145–3150.
30. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–1164.
 31. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199–210.
 32. Takahashi K, Aranami T, Endoh M, Miyake S, Yamamura T. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127: 1917–1927.
 33. Seino KI, Fukao K, Muramoto K et al. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2577–2581.
 34. Hudrisier D, Feau S, Bonnet V, Romagnoli P, van Meerwijk JP. In vivo maintenance of T-lymphocyte unresponsiveness induced by thymic medullary epithelium requires antigen presentation by radioresistant cells. *Immunology* 2003; 108: 24–31.
 35. Jin Y, Fuller L, Carreno M et al. Functional and phenotypic properties of peripheral T cells energized by autologous CD3(+) depleted bone marrow cells. *Hum Immunol* 2002; 63: 567–575.
 36. 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: 1465–1473.
 37. Kataoka M, Margenthaler JA, Ku G, Flye MW. Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation. *J Immunol* 2003; 171: 204–211.
 38. Braudeau C, Bouchet D, Tesson L et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther* 2004; 11: 701–710.

VIII- Annexe 3 Implication of matrix metalloproteinase 7 and the noncanonical wingless-type signalling pathway in a model of kidney allograft tolerance induced by the administration of anti-donor class II antibodies

Implication of matrix metalloproteinase 7 and the noncanonical wingless-type signalling pathway in a model of kidney allograft tolerance induced by the administration of anti-donor class II antibodies

Vojislav Jovanovic, Anne-Sophie Dugast, Jean-Marie Heslan, Joanna Ashton-Chess, Magali Giral, Nicolas Degauque, Anne Moreau, Annaick Pallier, Elise Chiffolleau, David Lair, Claire Usal, Helga Smit, Bernard Vanhove, Jean-Paul Soulillou, Sophie Brouard

ITERT-INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30, Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France

Article publié dans Journal of Immunology 2008

Implication of Matrix Metalloproteinase 7 and the Noncanonical Wingless-Type Signaling Pathway in a Model of Kidney Allograft Tolerance Induced by the Administration of Anti-Donor Class II Antibodies¹

Vojislav Jovanovic,* Anne-Sophie Dugast,* Jean-Marie Heslan,* Joanna Ashton-Chess,* Magali Giral,[†] Nicolas Degauque,* Anne Moreau,[†] Annaick Pallier,* Elise Chiffolleau,* David Lair,* Claire Usal,* Helga Smit,* Bernard Vanhove,* Jean-Paul Soulillou,^{2*†‡} and Sophie Brouard^{2,3*}

In rats, tolerance to MHC-incompatible renal allografts can be induced by the administration of anti-donor class II Abs on the day of transplantation. In this study we explored the mechanisms involved in the maintenance phase of this tolerance by analyzing intragraft gene expression profiles by microarray in long-term accepted kidneys. Comparison of the gene expression patterns of tolerated to syngeneic kidneys revealed 5,954 differentially expressed genes ($p < 0.05$). Further analysis of this gene set revealed a key role for the wingless-type (WNT) signaling pathway, one of the pivotal pathways involved in cell regulation that has not yet been implicated in transplantation. Several genes within this pathway were significantly up-regulated in the tolerated grafts, particularly matrix metalloproteinase 7 (MMP7; fold change > 40). Analysis of several other pathway-related molecules indicated that MMP7 overexpression was the result of the noncanonical WNT signaling pathway. MMP7 expression was restricted to vascular smooth muscle cells and was specific to anti-class II Ab-induced tolerance, as it was undetectable in other models of renal and heart transplant tolerance and chronic rejection induced across the same strain combination. These results suggest a novel role for noncanonical WNT signaling in maintaining kidney transplant tolerance in this model, with MMP7 being a key target. Determining the mechanisms whereby MMP7 contributes to transplant tolerance may help in the development of new strategies to improve long-term graft outcome. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 1317–1325.

Despite improvements in renal allograft survival over the last three decades, the half-life of renal allografts has increased only marginally, largely due to late graft injury resulting from drug-related nephrotoxicity and chronic rejection (1–4). Such chronic injury is poorly influenced by the currently used immunosuppressors. Moreover, life-long immunosuppression puts transplant patients at a higher risk of infection and malignancy (5). Thus, inducing donor-specific tolerance, i.e., indefinite survival of a well-functioning graft in an immunocompetent adult host in the absence of immunosuppression, is a major goal in transplantation. A number of tolerance trials are currently taking place, but there are still many challenges to face before tolerance can be achieved routinely in clinic practice (6).

In rodents, a variety of maneuvers can induce donor-specific allograft tolerance, including pretransplantation priming with do-

nor MHC Ags (blood or splenocytes) (2) (1, 2, 7–10), transfected cells expressing donor MHC Ags (11, 12), MHC gene transfer (13, 14), or DNA vaccination (15).

We have previously shown that donor-specific tolerance to MHC-mismatched renal allografts in adult rats can also be induced by the administration of Abs directed against donor MHC class II to recipients on the day of transplantation (16–18). These animals display normal and stable kidney function, and their grafts display normal histology with no signs of chronic rejection (18). Although numerous studies have shown the importance of MHC II signaling in the regulation of APC activity and fate (19), the mechanisms responsible for maintaining this anti-MHC II Ab-induced tolerant state remain to be fully elucidated. In the current study we took advantage of genome-wide transcriptome analysis to further explore these mechanisms. By analyzing intragraft gene expression and networks 100 days after transplantation in tolerated kidneys compared with syngeneic controls, we were able to identify a major involvement of several gene pathways, including that of wingless-type (WNT)⁴ signaling, a pathway known to control a variety of processes

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U643, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, [†]Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, and [‡]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

Received for publication June 28, 2007. Accepted for publication October 30, 2007.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported in part by a grant from the “Foundation Progreffe” (Nantes, France).

² J.-P.S. and S.B. contributed equally to this study as senior authors.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Sophie Brouard, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U643, 30 Boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01 France. E-mail address: Sophie.Brouard@univ-nantes.fr

⁴ Abbreviations used in this paper: WNT, wingless-type; Axin, axis inhibitor; Dkk3, dickkopf homologue 3; DST, donor-specific blood transfusion; FC, fold change; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; LEW, Lewis (rat); MMP7, matrix metalloproteinase 7; NFATc1, NFAT cytoplasmic, calcineurin-dependent 1; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; TCF7, transcription factor 7; TGF, transforming growth factor.

such as cell migration, polarity, or differentiation (20). Deregulation of this pathway has been reported in numerous human diseases (20), but to date it has never been implicated in the field of immune tolerance. One of the targets of this pathway, matrix metalloproteinase 7 (MMP7; also known as matrilysin, MAT, MPMM, MPSL1, and PUMP-1), was explored further in tolerated and rejected rat heart allografts. We show that in rodents MMP7 up-regulation is governed by a noncanonical WNT pathway and is specific to the renal transplant tolerance induced by anti-donor class II treatment, where it is located on vascular smooth muscle cells within the graft. These results reveal a novel role for MMP7 in allograft responses. Determining the mechanisms whereby MMP7 contributes to transplant tolerance may help in the development of new strategies to improve long-term graft outcome.

Materials and Methods

Rodent transplant models

Surgical procedures, treatments, and experimental groups. Inbred male adult Lewis (LEW) rats (200–250 g) of the LEW.1A (RT1a) and LEW.1W (RT1u) congenic strains were purchased from Janvier and maintained in an animal facility under standard conditions according to European and institutional guidelines.

Kidney transplantation. The model used was that of kidney allotransplantation from LEW.1W donors to MHC-mismatched LEW.1A recipients receiving i.v. 0.5 ml of anti-LEW.1W class II alloimmune serum prepared as described (17) on the day of transplantation ($n = 12$). At day 100 posttransplantation, these animals tolerate a skin graft from the same donor and their kidney grafts show no histological signs of chronic humoral rejection (18). Controls included a group of LEW.1A recipients of LEW.1A kidneys (syngeneic transplants; $n = 5$) and a group of untreated LEW.1A recipients of LEW.1W kidneys (allogeneic, untreated; $n = 3$). Kidney transplantations were performed aseptically and a binephrectomy was performed 7 days after transplantation as previously described (16). Rejection, indicated by the death of the binephrectomized rat, was confirmed by histology. Blood urea and creatinine and urine protein/creatinine ratios were measured throughout the posttransplant period. Blood urea at <8 mmol/L and blood creatinine at <40 mmol/L were considered as normal (18).

Heart transplantation. The model used was that of heart allotransplantation from LEW.1W donors to MHC-mismatched LEW.1A recipients receiving either a donor-specific blood transfusion (DST) 7 and 14 days before transplantation (2) or a 20-day course of the deoxyspergualin analog LF015-095 (21). At day 100 posttransplantation, the grafts of DST-treated animals show clear-cut histological signs of chronic humoral rejection (chronic transplant vasculopathy) (9), whereas those of LF015-095-treated animals do not and are thus tolerated (21, 22). Analyses were performed on DST-treated ($n = 3$) and LF015-095-treated recipients ($n = 3$) at day 100 posttransplantation. Syngeneic transplants (LEW.1A donors to LEW.1A recipients) were performed as controls ($n = 3$). Heterotopic cardiac allografts were performed as previously described (23).

Sample preparation

Organs were harvested at day 100 (tolerant/syngeneic kidney allografts) or 1 day before rejection (acutely rejected kidney allografts). Blood was collected by cardiac puncture into a heparinized syringe and PBMC were separated on a Ficoll gradient and then stored in TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies). Sections of the spleen and kidney graft were either snap frozen in liquid nitrogen for future RNA extraction, or embedded in O.C.T. compound (Tissue-Tek; Miles Laboratories) and snap frozen in liquid nitrogen for future immunohistochemistry analysis. Blood cell contamination was avoided by perfusing the organ with PBS. All samples were stored at -70°C until use.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA from rat kidney grafts and PBMC was prepared using the TRIzol (Invitrogen Life Technologies) extraction method. RNA quantity and quality were systematically determined using a NanoDrop spectrophotometer and an Agilent 2100 bioanalyzer. Ten micrograms of total RNA was set aside for microarray analyses (see below). The remaining RNA was treated with DNase (Roche) to remove genomic DNA and reverse

transcribed into first strand cDNA using poly(dT) oligonucleotide and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies).

Microarray experiments

RNA preparation, amplification, and hybridization. Ten micrograms of total RNA was cleaned up using RNeasy columns (Qiagen). RNA quantity and quality were determined using a NanoDrop spectrophotometer and an Agilent 2100 bioanalyzer. A rRNA 28S/18S ratio of 1.0 ± 0.1 was considered as acceptable for RNA amplification. The Applied Biosystems rat genome survey microarray (part no. 4337467) used contained 26,857 60-mer oligonucleotide probes representing 27,088 individual rat genes. An additional 3400 control spots were present on the chip to cover various steps in the hybridization process. Digoxigenin-UTP labeled cRNA was generated and amplified from $0.5 \mu\text{g}$ of total RNA from each sample using an Applied Biosystems NanoAmp chemiluminescent reverse transcriptase-in vitro transcription (RT-IVT) labeling kit (part no. 4365715). Array hybridization was performed for 16 h at 55°C . Chemiluminescence detection, image acquisition, and analysis were performed using the Applied Biosystems chemiluminescence detection kit (part no. 436875D), analyzer (part no. 4338036) and version 1.1 analyzer software (part no. 4336391) according to the manufacturer's protocol.

Microarray analysis. Microarray raw data were analyzed by the R language and environment for statistical computing and graphics. Genes were identified using the Panther Protein Classification System Probe ID database. Raw data were analyzed according to p value and fold change (FC). FC corresponds to the ratio of the signal intensity of the gene in tolerant rats to the signal intensity of the gene in syngeneic rats. FC was calculated for genes that fulfilled the criterion of significance at $p < 0.05$ (Fig. 1A), and the genes were then processed using software available on www.pantherdb.org. Genes were classified according to their signaling pathway, molecular function, or biological process. For each category, the first 20 up-regulated and down-regulated genes were chosen and matched whenever they belonged to the same group (Tables I–III).

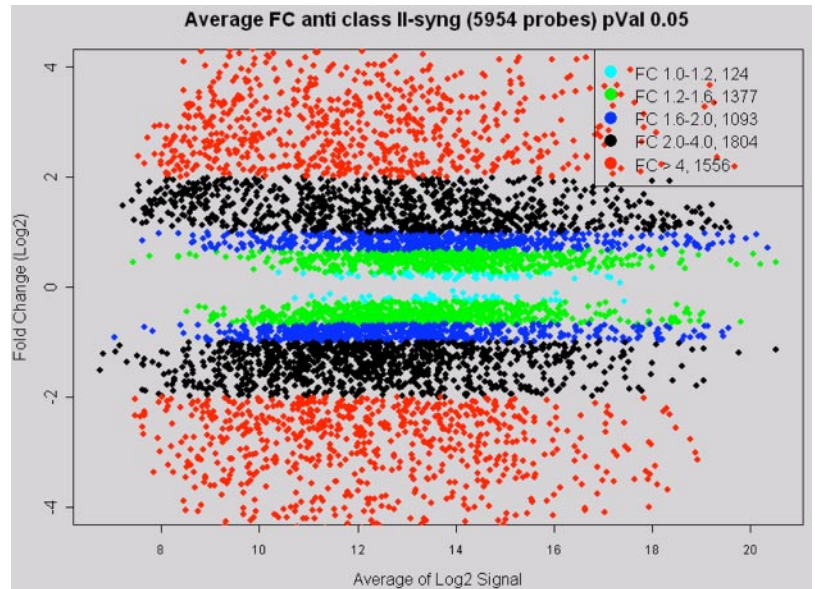
Real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 sequence detection system using SYBR-Green PCR core reagents as previously described (18) or TaqMan gene expression assays according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Rat primer and probe sets were either designed (rat transcription factor (TCF) 7, CCAGAACTCATCCTTCAGCATTT (forward) and 5-GGAACCATGTCCACCACAAAAG (reverse); rat β -arrestin 1 and 2, ACTATGCCACA GACGACGACAT (forward) and CCCTCTTCCTAGCAGAACTGGT (reverse); rat hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), CCTTG GTCAAGCAGTACAGCC (forward) and CGCTGATGACACAAA CATGA (reverse); and NFAT cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1), GGAGATGGAAGCGAAAACCTGA, NFATc1 (forward) and TAAGTCCCTGGCTCATTGGTC (reverse)) or purchased from Applied Biosystems (DKK3, Rn00593415_m1; Axin (axis inhibitor) 2, Rn00577441_m1; cadherin 13, Rn00594145_m1; HPRT, Rn01527838_g1; and MMP7, Rn00563467_m1). HPRT was used as an endogenous control gene to normalize the varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a control sample, used for all experiments, was calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ threshold cycle method (ABI PRISM 7900 user bulletin 2:11-24 (1997); PE Applied Biosystems). All samples were analyzed in duplicate. Expression of genes of interest was compared between tolerated animals and syngeneic controls.

Immunohistochemistry

Cryostat sections of $5 \mu\text{m}$ were cut, air-dried, and fixed in acetone for 10 min. Sections were then either labeled by a two-step immunofluorescent technique using rabbit anti-rat MMP7 (Calbiochem) as the primary Ab and donkey anti-rabbit FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories) as the secondary Ab or by a three-step indirect immunoperoxidase technique as described (24) with the same primary and secondary Abs. To confirm MMP7 expression by smooth muscle cells, we performed double staining using a two-step immunofluorescent technique using mouse anti-rat α -smooth muscle actin (Abcam) and rabbit anti-rat MMP7 (Calbiochem) as primary Abs. Anti-rabbit FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and goat anti-mouse Alexa Fluor 568 (Invitrogen Life Technologies) were used as a secondary Abs.

FIGURE 1. Microarray assessment of differential gene expression between tolerant and syngeneic kidney allografts. Visualization of the 5,954 differentially expressed genes according to microarray analysis between three tolerant (recipients treated with anti-donor MHC class II alloimmune serum) and three syngeneic kidney allografts at >100 days posttransplantation. Statistical analyses were performed on FC, which corresponds to the ratio of the signal intensity of the gene in tolerant rats to the signal intensity of the gene in syngeneic rats. Statistically significant ($p < 0.05$) FC values were calculated and are represented as \log_2 as a function of the average \log_2 signal. The color code represents the degree of FC: light blue, 1.0–1.2; green, 1.2–1.6; dark blue, 1.6–2.0; black, 2.0–4.0; red, >4.16.



Statistical analysis

The nonparametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare two or three or more groups, respectively. Differences were defined as statistically significant as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$.

Results

Differential gene expression patterns in tolerated vs syngeneic kidney grafts 100 days after transplantation

We have previously shown that a single administration of anti-donor MHC class II alloimmune serum on the day of transplantation results in the indefinite survival of MHC-mismatched kidney

grafts. The kidney grafts of tolerated animals display normal function and have no histological evidence of chronic rejection (18). In this study the gene expression patterns of three tolerated and three syngeneic kidney allografts were analyzed using pangenomic Applied Biosystems genome survey microarrays (part no. 4337467). Of the ~27,000 genes present on the microarray, 26,857 genes were found to be expressed and were subsequently analyzed by R software. Of these 26,857 expressed genes, 5,954 were found to be significantly expressed differentially between the two biological situations ($p < 0.05$; Fig. 1). Analysis of these 5,954 genes using the Probe ID database from the Panther protein classification system (www.pantherdb.org) enabled their organization according to

Table I. Organization of differentially expressed genes according to signaling pathways

| Signaling Pathway | No. of Up-Regulated Genes | No. of Down-Regulated Genes |
|---|---------------------------|-----------------------------|
| Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway | 76 | 24 |
| Integrin signaling pathway | 57 | 21 |
| WNT signaling pathway | 45 | 26 |
| Platelet-derived growth factor signaling pathway | 42 | 22 |
| Angiogenesis | 38 | 18 |
| T cell activation | 35 | |
| Epidermal growth factor receptor signaling pathway | 34 | 16 |
| Apoptosis signaling pathway | 31 | 15 |
| Interleukin signaling pathway | 31 | 13 |
| Huntington disease | 29 | 15 |
| Heterotrimeric G protein signaling pathway/ $G_{i\alpha}$ - and $G_{s\alpha}$ -mediated pathway | 27 | |
| Heterotrimeric G protein signaling pathway/ $G_{q\alpha}$ - and $G_{o\alpha}$ -mediated pathway | 25 | |
| TLR signaling pathway | 24 | |
| PI3K pathway | 23 | 12 |
| B cell activation | 23 | |
| Fibroblast growth factor signaling pathway | 22 | 16 |
| Cytoskeletal regulation by Rho GTPase | 22 | |
| Parkinson disease | 21 | 11 |
| Ras pathway | 18 | |
| Endothelin signaling pathway | 18 | |
| Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway | | 14 |
| Ubiquitin-proteasome pathway | | 13 |
| Adrenaline and noradrenaline biosynthesis | | 13 |
| Cadherin signaling pathway | | 13 |
| 5HT2-type receptor-mediated signaling pathway | | 13 |
| De novo purine biosynthesis | | 12 |
| Alzheimer disease-presenilin pathway | | 11 |
| Tricarboxylic acid cycle | | 11 |

Table II. Organization of differentially expressed genes according to molecular function

| Molecular Function | No. of Up-Regulated Genes | No. of Down-Regulated Genes |
|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Nucleic acid binding | 459 | 255 |
| Receptor | 220 | 116 |
| Transcription factor | 212 | 137 |
| Select regulatory molecule | 184 | 158 |
| Defense/immunity protein | 159 | |
| Signaling molecule | 129 | |
| Ribosomal protein | 129 | |
| Cytoskeletal protein | 126 | 81 |
| Miscellaneous function | 104 | 103 |
| Transferase | 93 | 162 |
| Kinase | 93 | 101 |
| Protein kinase | 83 | |
| Protease | 81 | 85 |
| Hydrolase | 79 | 158 |
| Acid-binding cytoskeletal protein | 75 | |
| Other transcription factor | 75 | |
| Extracellular matrix | 66 | |
| Other miscellaneous function proteins | 65 | 67 |
| Transporter | 62 | 176 |
| G protein modulator | 62 | |
| Oxidoreductase | | 238 |
| Dehydrogenase | | 105 |
| Other transporters | | 96 |
| Ligase | | 82 |
| Synthase and synthetase | | 73 |
| Reductase | | 72 |
| Transfer/carrier protein | | 70 |
| Membrane traffic protein | | 66 |

signaling pathways (Table I), molecular function (Table II), and biological process (Table III). According to this analysis, the most significantly up- and down-regulated genes in tolerance belonged to the categories of the inflammation chemokine- and cytokine-mediated signaling pathway, integrin signaling, the WNT signaling pathway, platelet-derived growth factor signaling, and angiogenesis, as well as epidermal growth factor receptor, IL, and apoptosis signaling (Table I). Certain major categories consisted of genes that were up-regulated only, e.g., T cell activation and G-protein, TLR, and B cell signaling (Table I). The majority of the up- and down-regulated genes belonged to the molecular function categories of nucleic acid binding, receptors, transcription factors, and regulatory molecules, whereas again certain functional categories were up-regulated only, e.g., defense/immunity proteins, signaling molecules, and ribosomal proteins (Table II). The highest-ranking biological processes were signal transduction, protein/nucleic acid metabolism, and immunity/defense (Table III), suggesting that tolerance is correlated with an active intragraft immune response (18).

Signaling pathways distinguish tolerated from syngeneic kidneys; the WNT pathway and its downstream molecular target MMP7

The two highest ranking pathways were those of inflammation and integrin signaling, whose roles in transplantation are already well known. The third highest ranking pathway, however, has to our knowledge never been described in transplantation. This WNT signaling pathway implicated 45 up-regulated and 26 down-regulated genes, of which three molecules were expressed at least 10-fold more in tolerated vs syngeneic kidneys: MMP7 (FC > 40), TCF7 (T cell specific; FC > 15), and dickkopf homologue 3 (DKK3; FC > 12). DKK3 and TCF7 are molecules involved in WNT sig-

Table III. Organization of differentially expressed genes according to biological processes

| Biological Process | No. of Up-Regulated Genes | No. of Down-Regulated Genes |
|---|---------------------------|-----------------------------|
| Signal transduction | 514 | 300 |
| Protein metabolism and modification | 448 | 413 |
| Nucleoside, nucleotide, and nucleic acid metabolism | 422 | 286 |
| Immunity and defense | 373 | 150 |
| Developmental processes | 279 | 165 |
| Cell surface receptor-mediated signal transduction | 237 | 118 |
| mRNA transcription | 224 | 135 |
| Cell structure and motility | 212 | |
| Cell communication | 169 | |
| Cell cycle | 166 | |
| mRNA transcription regulation | 160 | 90 |
| Protein modification | 150 | 137 |
| Intracellular signaling cascade | 148 | 109 |
| Intracellular protein traffic | 145 | 170 |
| Protein biosynthesis | 141 | |
| Cell proliferation and differentiation | 133 | |
| Transport | 125 | 264 |
| Proteolysis | 122 | 137 |
| Cell structure | 114 | |
| Protein phosphorylation | 109 | |
| Lipid, fatty acid, and steroid metabolism | | 169 |
| Other metabolisms | | 149 |
| Carbohydrate metabolism | | 143 |
| Ion transport | | 116 |
| Electron transport | | 108 |
| Amino acid metabolism | | 94 |
| Cation transport | | 86 |

nal transduction whereas MMP7 is a metalloproteinase whose expression is regulated by this pathway (25). Although several other members of the MMP family (MMP2, MMP12, MMP16, MMP19, and MMP23) were also up-regulated in the tolerated kidneys, the biggest fold change was observed for MMP7 (FC > 40; Fig. 2A). Significant up-regulation ($p < 0.05$) of MMP7 in tolerance was

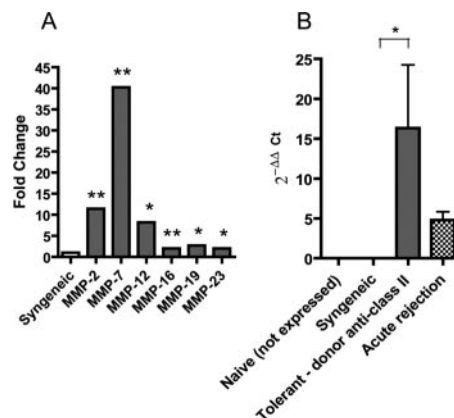
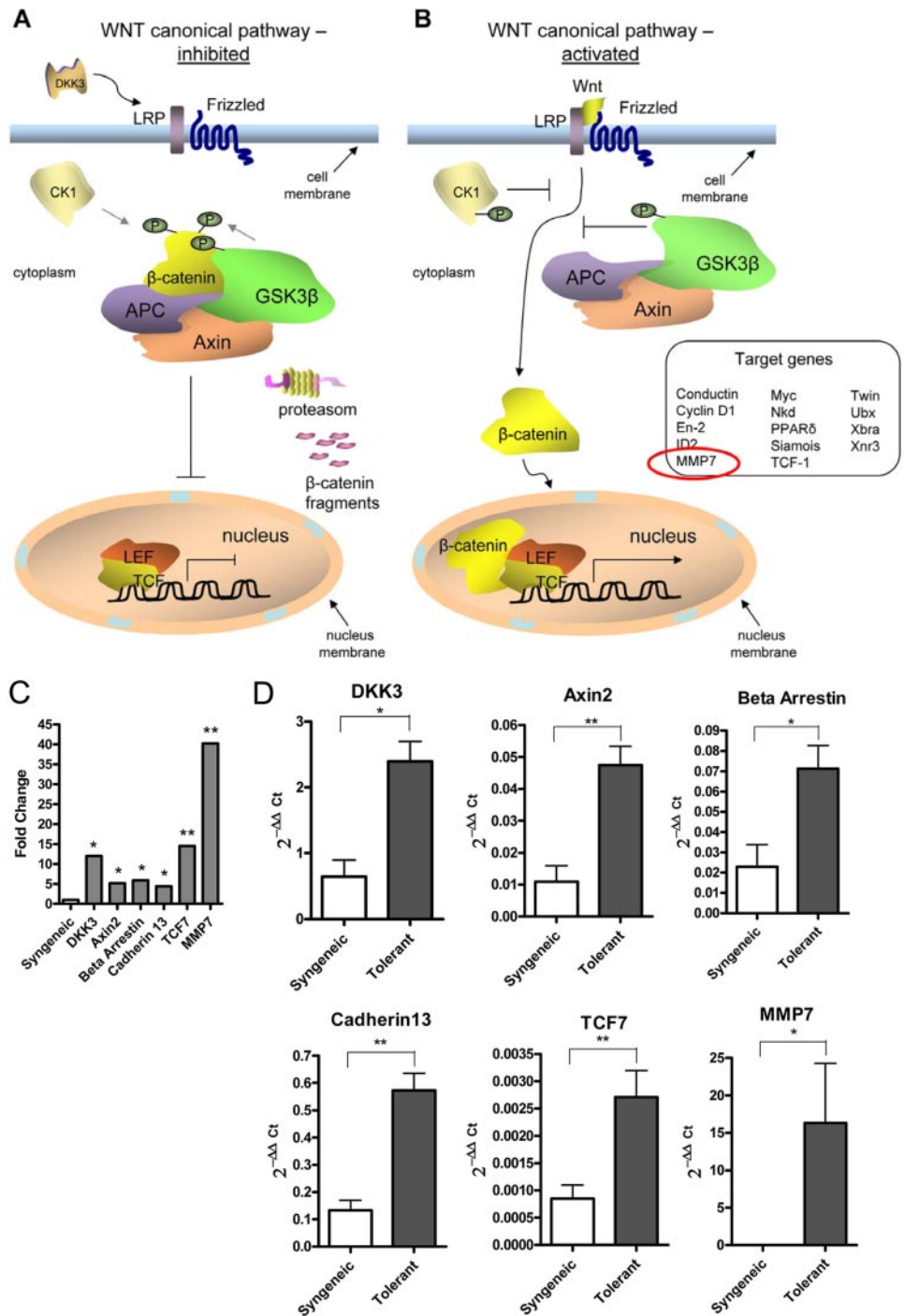


FIGURE 2. Differential expression of MMP7 and other MMP family members in rat kidney allografts. *A*, Fold change in expression of MMP2, MMP7, MMP12, MMP16, MMP19, and MMP23 in tolerant ($n = 3$) vs syngeneic ($n = 3$) kidney allografts 100 days posttransplantation according to microarray. *B*, MMP7 mRNA accumulation in naive, syngeneic (day 100), tolerant (day 100), and acutely rejecting (day 11) rat kidney allografts as measured by quantitative PCR. Results are expressed as mean \pm SD of the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (threshold cycle) values for each group of samples. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

FIGURE 3. Regulation of MMP7 by the canonical WNT signaling pathway. *A*, The inhibited canonical WNT signaling pathway. In the absence of WNT, β -catenin associates with a multiprotein destruction complex consisting of the tumor-suppressor gene products Axin and adenomatous polyposis coli (APC) and the serine/threonine kinases casein kinase 1 (CK1) and glycogen-synthase kinase 3 β (GSK3 β). β -Catenin is phosphorylated by CK1 and GSK3 β , leading to its recognition by β -transducin-repeat-containing protein (β -TRCP), its ubiquitylation, and its subsequent degradation by the proteasome. Members of the TCF/lymphocyte enhancer-binding factor (LEF) family are blocked in the nucleus by the repressors and are inactive. DKK3 can also take part in the inhibition of the WNT canonical signaling pathway. *B*, The activated canonical WNT signaling pathway. WNT proteins bind their receptors, Frizzled proteins, in addition to a coreceptor low-density lipoprotein receptor related protein (LRP) 5 or LRP6, resulting in the inactivation of GSK3 β by Disheveled. β -Catenin then migrates to the nucleus, where it binds TCFs to activate target genes. *C*, Expression of various molecules implicated in the canonical WNT pathway in tolerant and syngeneic kidneys 100 days posttransplantation according to microarray. Results are expressed as fold change. *D*, Expression of various molecules implicated in the canonical WNT pathway in tolerant and syngeneic kidneys 100 days posttransplantation according to quantitative PCR. Results are expressed as means \pm SD of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (threshold cycle) values. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.



confirmed by quantitative PCR performed on a further 12 tolerated kidneys (>100 days posttransplantation) and five syngeneic grafts (>100 days posttransplantation), as well as three naive kidneys that expressed no MMP7 and three acutely rejected kidneys at day 11 ± 1 posttransplantation that expressed MMP7 only moderately (Fig. 2B).

Involvement of the noncanonical WNT signaling pathway in the kidney grafts of tolerated recipients

We next set out to understand the mechanisms governing MMP7 expression in our model. Previous studies have shown that MMP7 expression can be controlled by the canonical WNT signaling pathway (26, 27) (illustrated in Fig. 3, A and B). Briefly, in the absence of WNT or if the WNT pathway is inhibited by DKK,

β -catenin becomes phosphorylated by a destruction complex and is degraded by the proteasome. When WNT is present it binds to the Frizzled receptor and the coreceptors, preventing β -catenin degradation. β -Catenin enters the nucleus and binds TCFs (and additional nuclear proteins) and thereby activates target genes, including MMP7. We thus analyzed the expression of several molecules involved in the canonical WNT signaling cascade. Thereby, we identified the up-regulation of genes that block the canonical WNT pathway (the WNT inhibitor DKK3 and the members of the destruction complex, Axin2 and β -arrestin) and genes whose expression is typical of activated canonical WNT signaling (TCF7 and the target gene MMP7). Interestingly, in addition to MMP7, all of these molecules, which are members of the canonical WNT signaling pathway, were significantly increased in the tolerated

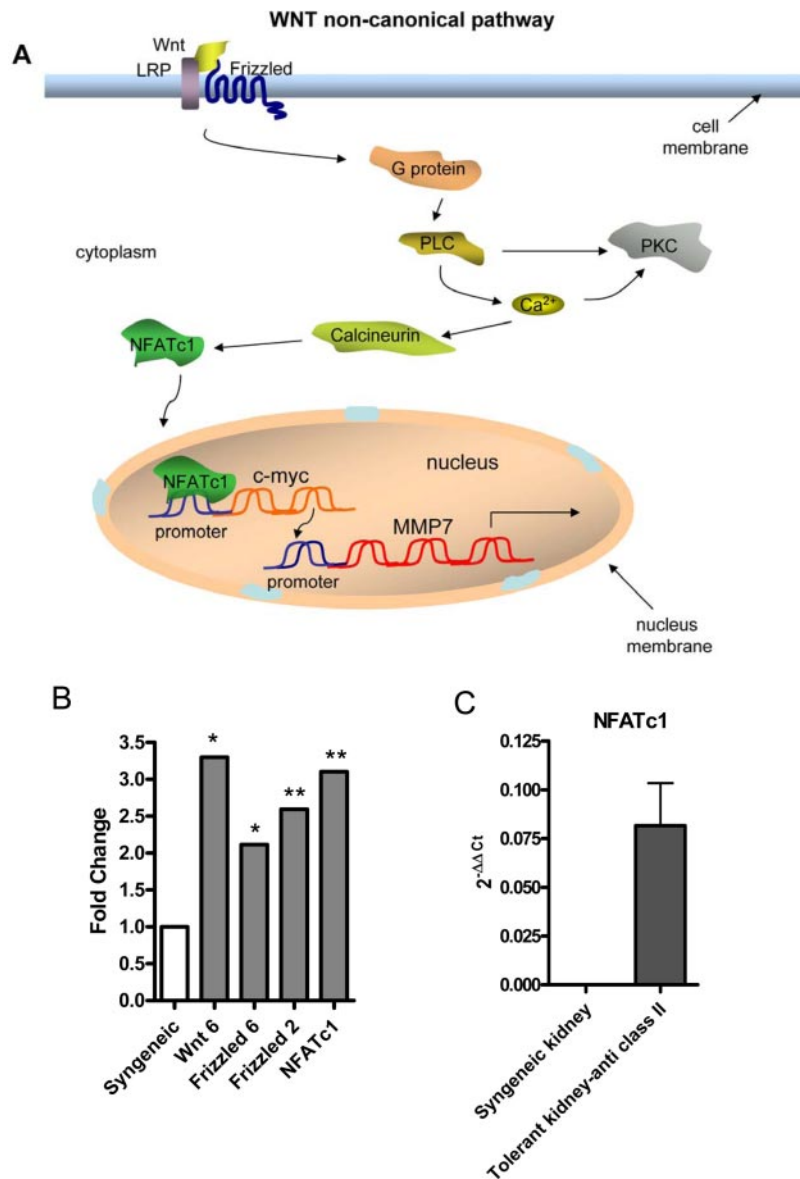


FIGURE 4. The noncanonical WNT signaling pathway. *A*, Noncanonical WNT signaling leads to release of intracellular calcium, possibly via G proteins. This pathway involves the activation of PLC and PKC. Elevated Ca^{2+} can activate the phosphatase calcineurin, which leads to dephosphorylation of the cytoplasmic, calcineurin-dependent NFATc1 cell and its accumulation in the nucleus. NFATc1 activates *c-myc*, resulting in the induction of MMP7. LRP, lipoprotein receptor related protein. *B*, Analysis of various molecules implicated in the noncanonical WNT signaling pathway in tolerant vs syngeneic kidney allografts according to microarray (results expressed as fold change; $n = 3$ per group). *C*, Analysis of NFATc1 in tolerant ($n = 12$) vs syngeneic ($n = 5$) kidneys according to quantitative PCR (results expressed as mean \pm SD of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ threshold cycle values). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

kidneys according to both microarray (Fig. 3C) and quantitative PCR (Fig. 3D). Moreover, β -catenin, a key molecule in regulating MMP7 expression, was undetectable. The fact that the level of the WNT pathway inhibitors was increased as well as that of MMP7 indicates the involvement of the noncanonical WNT signaling pathway.

Regulation of MMP7 by the noncanonical WNT signaling pathway in tolerated kidneys

In addition to the canonical WNT pathway, there is also a so-called noncanonical pathway (illustrated in Fig. 4A). This pathway is activated by ligand binding to the Frizzled receptor, leading to the release of intracellular calcium possibly via G proteins. Activation of this pathway in our model of tolerance is coherent with the fact that G protein signaling pathways were one of the major pathways up-regulated in tolerated kidneys, accounting for 52 genes (Table I). This pathway involves the activation of phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC). Elevated Ca^{2+} can activate the phosphatase calcineurin, which leads to dephosphorylation of the transcription factor NFATc1 and its accumulation in the nucleus (28, 29). Most components of the noncanonical WNT signaling pathway were detected by the microarray, including WNT6 (FC > 3),

Frizzled6 (FC > 2), Frizzled2 (FC > 2.5), and NFATc1 (FC > 3) (Fig. 4B). Up-regulation of one of the key molecules in the non-canonical WNT signaling pathway, NFATc1 (which enters the nucleus and activates *c-myc*; Ref. 30), was additionally confirmed by quantitative PCR (Fig. 4C). Thus, altogether our data suggest that the high MMP7 expression (FC > 40) in tolerated kidney grafts is the result of noncanonical WNT signaling.

Regulation of MMP7 in the tolerated kidneys and hearts in the same strain combination following different protocols of tolerance induction

To determine whether MMP7 up-regulation was tissue specific, we next compared MMP7 expression in kidney grafts and spleens from tolerant animals and syngeneic controls. As shown in Fig. 5A, MMP7 transcripts were only detected in tolerated kidney grafts, being very weak in the other compartments (spleen and blood). Kinetic studies also showed that MMP7 expression in tolerant kidneys was time dependent, with a high level of transcript as soon as day 25 after transplantation (24.8 ± 8.7 -fold tolerant vs syngeneic) (data not shown). We then asked whether MMP7 up-regulation was specific to tolerated kidneys or could it also be relevant to

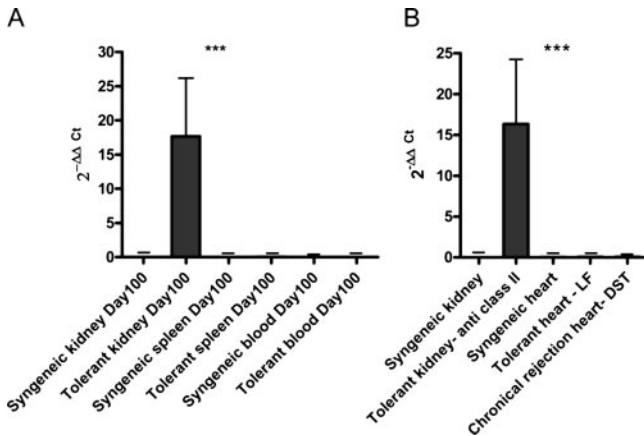


FIGURE 5. Expression of MMP7 in different immunological compartments of anti-class II-tolerant rats and grafts from other models of allograft tolerance or rejection in the same rat strain combination. *A*, MMP7 transcription in tolerant kidneys ($n = 12$) at >100 days posttransplantation was compared with syngeneic kidneys on day 100 ($n = 5$), syngeneic spleen on day 100 ($n = 3$), tolerant spleen on day 100 ($n = 5$), syngeneic blood on day 100 ($n = 3$), and tolerant blood on day 100 ($n = 3$). Results are expressed as mean \pm SD of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ threshold cycle values; ***, $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test). *B*, MMP7 transcription in syngeneic ($n = 5$) vs tolerant ($n = 12$) kidneys compared with syngeneic ($n = 3$), tolerant ($n = 3$), or chronically rejected ($n = 3$) heart allografts in the same strain combination (see *Materials and Methods* for details of induction protocols). Results are expressed as mean \pm SD of $2^{-\Delta\Delta C_t}$; ***, $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test). LF, LF015-095.

tolerated hearts. We therefore compared MMP7 expression in tolerated kidneys to that observed in long-surviving heart grafts (day 100 posttransplantation) transplanted in the same allogeneic strain

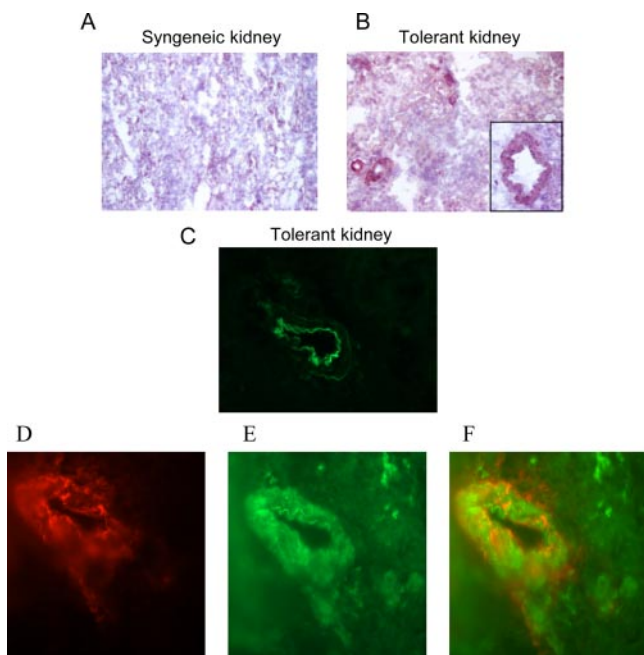


FIGURE 6. Expression of MMP7 protein in tolerant kidney allografts. *A–C*, Staining of MMP7 in kidney grafts of syngeneic (*A*) and tolerant (*B*) animals >100 days posttransplantation using a three-step indirect immunoperoxidase technique (original magnification $\times 20$ in the main panels and $\times 40$ in the *inset* of *B*) and of tolerant allografts by immunofluorescence (original magnification $\times 40$) (*C*). *D–F*, To confirm MMP7 expression by the smooth muscle cells, double staining for α -actin (*D*) and MMP7 (*E*) was performed and images were superimposed (*F*).

combination (LEW.1W to LEW.1A). To induce heart allograft tolerance, we used different protocols: DST 7 and 14 days before transplantation (grafts showing clear histological signs of chronic rejection) (9) or a 20-day course of the deoxyspergualin analog LF015-095 (grafts showing no signs of rejection; i.e., tolerated) (21). The results clearly show an absence of MMP7 expression in heart grafts from both DST-treated (chronic rejection) and LF015-095-treated (tolerated) recipients at this time (Fig. 5*B*), suggesting that MMP7 expression is specific to kidney graft tolerance induced by the anti-donor MHC class II protocol.

MMP7 expression by tolerated kidney vascular smooth muscle cells

Localization of MMP7 was next assessed by the immunostaining of syngeneic vs tolerated kidneys using immunoperoxidase (Fig. 6, *A* and *B*) or immunofluorescence (Fig. 6*C*) techniques. Within the tolerated kidney allografts, MMP7 protein was found to be expressed primarily by the smooth muscle cells of blood vessels (Fig. 6, *B* and *C*). This was confirmed using double staining for MMP7 and anti-actin as a marker for the smooth muscle cells. Photos of red fluorescence (α -actin staining; Fig. 6*D*) and green fluorescence (MMP7 staining; Fig. 6*E*) were superimposed (Fig. 6*F*) and orange fluorescence indicated that MMP7 was expressed by the smooth muscle cells.

Discussion

In this study, we further explored the mechanisms involved in the maintenance phase of tolerance to kidney allografts induced by the administration of anti-donor class II serum to rat recipients of renal allografts on the day of transplantation (18). By analyzing intra-graft gene expression profiles of tolerated compared with syngeneic kidneys 100 days posttransplantation using microarray technology, we show that the maintenance phase of tolerance brings into play multiple gene pathways and biological processes. In particular, our data reveal a potentially important role for a signaling pathway that has not previously been described in transplantation, that of WNT signaling, as well as for one of its key targets, MMP7 (25), which was up-regulated 40-fold in tolerated kidneys.

WNT signaling, which is initiated by binding members of the WNT family of glycoproteins to their respective receptors (also known as Frizzled proteins), is known to be involved in the regulation of cell growth and differentiation (27). Two main WNT signaling pathways exist, the so-called canonical and the less classical noncanonical pathways. The canonical pathway, when activated, results in a complex signaling cascade ultimately leading to β -catenin-mediated gene transcription. In this pathway's resting state, β -catenin is degraded by the proteasome. The noncanonical pathway is a Ca^{2+} -dependant pathway thought to act through G protein-coupled receptors. Activation of this pathway results in gene transcription via the transcription factor NFATc1. Although the precise and relative roles of both pathways in mammals are largely unknown, deregulation of WNT signaling has been reported in a number of human pathologies, from cancer to cardiovascular disease (31–33). To date, its role in transplantation is unknown. However, our findings of an up-regulation of the potential WNT inhibitor DKK3 (34) as well as the up-regulation of other inhibitory molecules acting downstream within the canonical pathway such as Axin2 (35), together with the absence of β -catenin, suggest that this pathway was not responsible for MMP7 up-regulation in the tolerated kidneys. In contrast, the overexpression of components of the noncanonical pathway such as Frizzled 6, Frizzled 2, and NFATc1 in tolerated kidneys indicates that MMP7 expression was driven by this alternative pathway. These results thus imply a role for noncanonical WNT signaling in maintaining

kidney transplant tolerance in this model, with MMP7 being a key target.

MMP7 is the smallest matrix metalloproteinase (36), a family of enzymes classically described as being responsible for the turnover and degradation of connective tissue proteins (37, 38) and for the turnover, degradation, catabolism, and destruction of the extracellular matrix (39, 40). The time-dependent up-regulation of MMP7 transcripts in tolerated kidneys (no expression on day 0 and increasing expression on day 25 to day 100 after transplantation compared with syngeneic or acutely rejected grafts) suggests that this molecule may play a role in maintaining tolerance. Interestingly, this role appears to be specific to the anti-donor class II model of kidney transplantation, as no up-regulation of MMP7 was observed in other models of kidney transplant tolerance in the same strain combination (anti-CD28 tolerance induction protocol (41); data not shown) or in models of heart tolerance or chronic rejection (LF015-095 and DST protocols) (9, 21, 42). We have already shown in the laboratory that different mechanisms may operate following different tolerance induction protocols, even in the same genetic LEW.1W to LEW.1A background (8). Indeed, whereas the anti-MHC II Ab-induced tolerant state can be successfully transferred to naive recipients by both T cells and CD103⁺ cells (18), transfer failed in the same kidney allograft model when tolerance was induced using anti-CD28 Abs (41). In the heart allograft model, Degauque et al. showed that in donor specific transfusion-induced tolerance, spleen CD25⁺ T cells from tolerant rats were unable to transfer tolerance into naive rats (8), whereas Chiffolleau et al. provided evidence that 20-day treatment with LF015-0195, a deoxyspergualin analog, induced spleen CD4⁺CD25⁺ cells able to transfer tolerance (43). Finally, in the same heart allograft model when recipients were treated with CD40Ig, only the adoptively transferred CD8⁺CD45RC^{low} subset resulted in donor-specific long-term survival, whereas CD8⁺CD45RC^{low} T cells from naive animals did not (44). All of these examples show that, in the same allograft model, different protocols lead to specific and distinct mechanisms of tolerance induction and maintenance.

The mechanisms whereby MMP7 contributes to tolerance maintenance require further investigation. One possibility is that MMP7 helps to maintain tolerance through protective effects, because MMPs have been shown to contribute to tissue repair (45). Another possibility is that MMP7 acts by regulating cellular transmigration to the graft. Indeed, MMPs can act on nonmatrix proteins such as cytokines and chemokines to potentiate their activity (46). As such, MMPs have been shown to regulate inflammatory cell influx by determining the bioavailability of chemokines (46, 47). Thus, MMP7-deficient mice are more sensitive to acute lung injury after the administration of a chemotactic peptide (48). Although the tolerated grafts display a larger infiltrate than their syngeneic counterparts (18), MMP7 may serve to regulate the type of cells entering the graft, perhaps favoring a “friendly” infiltrate as previously suggested (18). Along these lines, MMP7 has been shown to direct cell migration rather than just movement per se (48). Interestingly, the regulation of cell transmigration has been reported to be not only due to the MMP7 proteinase but also to other proteinases such as MMP2, MMP12, and the ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) molecule (49), which were up-regulated (>11-fold, >8-fold, and >2.8-fold, respectively) in the tolerated kidney grafts vs syngeneic controls.

Another hypothesis is that MMP7 cleaves particular substrates, releasing molecules with tolerogenic activity. Along these lines, MMP7-deficient mice have been reported to reject a skin allograft significantly earlier than wild-type mice, possibly through its cleavage of FasL and TNF- α (50). Perhaps even more relevant to

our findings, however, is the fact that MMP7 has been described as one of the most potent MMPs in its ability to degrade the ubiquitous proteoglycan decorin, thereby releasing transforming growth factor (TGF)- β 1 (51), a cytokine long known for its immunomodulatory capacities (52, 53) and its involvement in transplant tolerance (54). Supporting this hypothesis, in the same LEW.1W to LEW.1A strain combination we have previously shown that TGF- β 1 is significantly increased in rat heart allografts with prolongation of graft survival in the first days following transplantation (17). TGF- β 1 was also up-regulated in this present study in the tolerated rat kidney allografts >100 days posttransplantation (*data not shown*). Furthermore, in the same model of tolerance induction to mismatched kidney grafts, anti-TGF- β mAb breaks the tolerance process (17). Finally, it is important to note that MMP7 has already been detected in smooth muscle cells in the medium and in the stenotic region in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams Beuren syndrome and that remodeling of the stenotic part of the aorta has been shown to be an adaptive mechanism to preserve a correct function of the aorta (55).

To conclude, we report for the first time, a role for noncanonical WNT signaling in the state of kidney allograft tolerance induced by administration of anti-donor class II Abs in rats. We also report on a new potential role for MMP7, a target of this pathway, in maintaining tolerance in this model. Determining the underlying mechanisms of this pathway and MMP7 may help in the design of strategies to improve long-term graft outcome.

Acknowledgments

We acknowledge technical assistance from the staff at IFR26-OUEST-genopole in Nantes, France, Ralouka Teusan and Alice Lebars. We thank Dr. Anthony Warrens for providing helpful information on his MMP7 knockout mouse model.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Josien, R., M. Heslan, S. Brouard, J. P. Souillou, and M. C. Cuturi. 1998. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 92: 4539–4544.
- Souillou, J. P., F. Blandin, E. Gunther, and V. Lemoine. 1984. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 38: 63–67.
- Opelz, G. 1995. Influence of treatment with cyclosporine, azathioprine, and steroids on chronic allograft failure: the collaborative transplant study. *Kidney Int.* (Suppl. 52): S89–S92.
- Solez, K., R. B. Colvin, L. C. Racusen, B. Sis, P. F. Halloran, P. E. Birk, P. M. Campbell, M. Cascalho, A. B. Collins, A. J. Demetris, et al. 2007. Banff '05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (“CAN”). *Am. J. Transplant.* 7: 518–526.
- Dantal, J., M. Hourmant, D. Cantarovich, M. Giral, G. Blanco, B. Dreno, and J. P. Souillou. 1998. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 351: 623–628.
- Salama, A. D., K. L. Womer, and M. H. Sayegh. 2007. Clinical transplantation tolerance: many rivers to cross. *J. Immunol.* 178: 5419–5423.
- Bugeon, L., M. C. Cuturi, M. M. Hallet, J. Paineau, D. Chabannes, and J. P. Souillou. 1992. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats: characterization by low interleukin-2 and interferon- γ mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation* 54: 219–225.
- Degaugue, N., D. Lair, C. Braudeau, F. Haspot, F. Sebillé, A. Dupont, E. Merieau, S. Brouard, and J. P. Souillou. 2007. Development of CD25- regulatory T cells following heart transplantation: evidence for transfer of long-term survival. *Eur. J. Immunol.* 37: 147–156.
- Lair, D., N. Degaugue, P. Miqueu, V. Jovanovic, M. Guillet, E. Merieau, A. Moreau, J. P. Souillou, and S. Brouard. 2007. Functional compartmentalization following induction of long-term graft survival with pregraft donor-specific transfusion. *Am. J. Transplant.* 7: 538–549.
- Kitade, H., M. Kawai, O. Rutgeerts, W. Landuyt, M. Waer, C. Mathieu, and J. Pirenne. 2005. Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion. *J. Immunol.* 175: 4963–4970.
- Madsen, J. C., R. A. Superina, K. J. Wood, and P. J. Morris. 1988. Immunological unresponsiveness induced by recipient cells transfected with donor MHC genes. *Nature* 332: 161–164.

12. Wong, W., J. S. Billing, S. A. Stranford, K. Hyde, J. Fry, P. J. Morris, and K. J. Wood. 2003. Retroviral transfer of donor MHC class I or MHC class II genes into recipient bone marrow cells can induce operational tolerance to alloantigens in vivo. *Hum. Gene Ther.* 14: 577–590.
13. Sonntag, K. C., D. W. Emery, A. Yasumoto, G. Haller, S. Germana, T. Sablinski, A. Shimizu, K. Yamada, H. Shimada, S. Arn, et al. 2001. Tolerance to solid organ transplants through transfer of MHC class II genes. *J. Clin. Invest.* 107: 65–71.
14. LeGuern, C. 2004. Potential role of major histocompatibility complex class II peptides in regulatory tolerance to vascularized grafts. *Transplantation* 77: S35–S37.
15. Peche, H., B. van Denderen, J. C. Roussel, B. Trinite, J. P. Souillou, and M. C. Cuturi. 2004. Presentation of donor major histocompatibility complex class II antigens by DNA vaccination prolongs heart allograft survival. *Transplantation* 77: 733–740.
16. Souillou, J. P., C. B. Carpenter, A. J. d'Apice, and T. B. Strom. 1976. The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J. Exp. Med.* 143: 405–421.
17. Gagne, K., S. Brouard, M. Guillet, M. C. Cuturi, and J. P. Souillou. 2001. TGF- β 1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur. J. Immunol.* 31: 3111–3120.
18. Degauque, N., D. Lair, A. Dupont, A. Moreau, G. Roussey, F. Moizant, F. X. Hubert, C. Louvet, M. Hill, F. Haspot, et al. 2006. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103⁺ cells. *J. Immunol.* 176: 3915–3922.
19. Al-Daccak, R., N. Mooney, and D. Charron. 2004. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 108–113.
20. Clevers, H. 2006. WNT/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469–480.
21. Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutarte, C. Usal, J. P. Souillou, and M. C. Cuturi. 2002. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation: evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am. J. Transplant.* 2: 745–757.
22. Heslan, J. M., K. Renaudin, P. Thebault, R. Josien, M. C. Cuturi, and E. Chiffolleau. 2006. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 82: 1185–1193.
23. Ono, K., and E. S. Lindsey. 1969. Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 57: 225–229.
24. Ashton-Chess, J., and G. Blancho. 2005. An in vitro evaluation of the potential suitability of peripheral blood CD14⁺ and bone marrow CD34⁺-derived dendritic cells for a tolerance inducing regimen in the primate. *J. Immunol. Methods* 297: 237–252.
25. Hovanes, K., T. W. Li, J. E. Munguia, T. Truong, T. Milovanovic, J. Lawrence Marsh, R. F. Holcombe, and M. L. Waterman. 2001. β -catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat. Genet.* 28: 53–57.
26. Shina, H., M. Igawa, J. Breault, L. Ribeiro-Filho, D. Pookot, S. Urakami, M. Terashima, M. Deguchi, M. Yamana, M. Shirai, et al. 2003. The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, WNT signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9: 2121–2132.
27. Staal, F. J., and H. C. Clevers. 2005. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 21–30.
28. Buchholz, M., A. Schatz, M. Wagner, P. Michl, T. Linhart, G. Adler, T. M. Gress, and V. Ellenrieder. 2006. Overexpression of *c-myc* in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcein signaling pathway. *EMBO J.* 25: 3714–3724.
29. Huelsken, J., and J. Behrens. 2002. The WNT signalling pathway. *J. Cell Sci.* 115: 3977–3978.
30. Thomas-Tikhonenko, A., I. Viard-Leveugle, M. Dewes, P. Wehrli, C. Sevnigani, D. Yu, S. Ricci, W. el-Deiry, B. Aronow, G. Kaya, et al. 2004. Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo. *Cancer Res.* 64: 3126–3136.
31. Segditsas, S., and I. Tomlinson. 2006. Colorectal cancer and genetic alterations in the WNT pathway. *Oncogene* 25: 7531–7537.
32. Luo, J., J. Chen, Z. L. Deng, X. Luo, W. X. Song, K. A. Sharif, N. Tang, R. C. Haydon, H. H. Luu, and T. C. He. 2007. WNT signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab. Invest.* 87: 97–103.
33. Van Gijn, M. E., M. J. Daemen, J. F. Smits, and W. M. Blankesteyn. 2002. The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 55: 16–24.
34. Roman-Gomez, J., L. Cordeu, X. Agirre, A. Jimenez-Velasco, E. San Jose-Eneriz, L. Garate, M. J. Calasanz, A. Heiniger, A. Torres, and F. Prosper. 2007. Epigenetic regulation of WNT-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 109: 3462–3469.
35. Salahshor, S., and J. R. Woodgett. 2005. The links between axin and carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* 58: 225–236.
36. Burke, B. 2004. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology* 209: 51–56.
37. Bode, W., F. X. Gomis-Ruth, and W. Stockler. 1993. Astacins, serralsins, snake venom, and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXHXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins.' *FEBS Lett.* 331: 134–140.
38. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69: 562–573.
39. Birkedal-Hansen, H. 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 728–735.
40. Rudolph-Owen, L. A., D. L. Hulboy, C. L. Wilson, J. Mudgett, and L. M. Matrisian. 1997. Coordinate expression of matrix metalloproteinase family members in the uterus of normal, matrilysin-deficient, and stromelysin-1-deficient mice. *Endocrinology* 138: 4902–4911.
41. Haspot, F., C. Seveno, A. S. Dugast, F. Coulon, K. Renaudin, C. Usal, M. Hill, I. Anegon, M. Heslan, R. Josien, et al. 2005. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am. J. Transplant.* 5: 2339–2348.
42. Koshiba, T., H. Kitade, B. Van Damme, A. Giulietti, L. Overbergh, C. Mathieu, M. Waer, and J. Pirenne. 2003. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 76: 588–596.
43. Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutarte, C. Usal, J. P. Souillou, and M. C. Cuturi. 2002. Role for thymic and splenic regulatory CD4⁺ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J. Immunol.* 168: 5058–5069.
44. Guillonnet, C., M. Hill, F. X. Hubert, E. Chiffolleau, C. Herve, X. L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Menoret, 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.
45. Holmbeck, K., P. Bianco, J. Caterina, S. Yamada, M. Kromer, S. A. Kuznetsov, M. Mankani, P. G. Robey, A. R. Poole, I. Pidoux, et al. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99: 81–92.
46. Van den Steen, P. E., P. Proost, A. Wuyts, J. Van Damme, and G. Opdenakker. 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96: 2673–2681.
47. Haro, H., H. C. Crawford, B. Fingleton, K. Shinomiya, D. M. Spengler, and L. M. Matrisian. 2000. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor- α in a model of herniated disc resorption. *J. Clin. Invest.* 105: 143–150.
48. Li, Q., P. W. Park, C. L. Wilson, and W. C. Parks. 2002. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 111: 635–646.
49. Parks, W. C., C. L. Wilson, and Y. S. Lopez-Boado. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 617–629.
50. Herbert, P., R. Kumar, L. Ambrose, and A. Warrens. 2006. Matrilysin and its substrate TNF- α prolong skin graft survival across an HLA mismatch in a murine model of acute rejection. European Congress of Immunology, PD-2967, Paris.
51. Imai, K., A. Hiramatsu, D. Fukushima, M. D. Pierschbacher, and Y. Okada. 1997. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses, and transforming growth factor- β release. *Biochem. J.* 322: 809–814.
52. Ruscetti, F. W., and M. A. Palladino. 1991. Transforming growth factor- β and the immune system. *Prog. Growth Factor Res.* 3: 159–175.
53. Wahl, S. M., N. McCartney-Francis, and S. E. Mergenhagen. 1989. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- β . *Immunol. Today* 10: 258–261.
54. Josien, R., P. Douillard, C. Guillot, M. Muschen, I. Anegon, J. Chetrit, S. Menoret, C. Vignes, J. P. Souillou, and M. C. Cuturi. 1998. A critical role for transforming growth factor- β in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J. Clin. Invest.* 102: 1920–1926.
55. Dridi, S. M., A. Foucault Bertaud, S. Igondjo Tchen, K. Senni, A. L. Ejeil, B. Pellat, S. Lyonnet, D. Bonnet, P. Charpiot, and G. Godeau. 2005. Vascular wall remodeling in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams Beuren syndrome. *J. Vasc. Res.* 42: 190–201.

IX- Annexe 4 Publications/Communications/Poster

Publications

2005 Haspot F., Seveno C, **Dugast A-S**, Coulon F, Renaudin K, Usal C, Hill M, Anegon I, Heslan M, Josien R, Brouard S, Soulillou J-P, Vanhove B. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR- class II- B7+ regulatory cells in American Journal of transplantation 2005 Oct; 5(10):2339-48

2007 Haudebourg T, **Dugast A-S**, Coulon F, Usal C, Triebel F, Vanhove B. Antibody-mediated depletion of LAG-3 (CD223)-positive cells prevents rejection of cardiac allografts in rats but does not induce tolerance in Transplantation 2007

2007 Guillonneau C, Seveno C, **Dugast A-S**, Li X-L, Renaudin K, Haspot F, Usal C, Veziere J, Anegon I and Vanhove B. Anti-CD28 antibodies modifies regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40-Ig treated heart allograft recipients in Journal of Immunology.

2007 Jovanovic Vojislav, **Dugast A-S**, Ashton-Chess J, Heslan J-M, Giral M, Degauque N, Moreau A, Pallier A, Chiffolleau E, Lair D, Usal C, Smit H, Lemauff B, Vanhove B, Soulillou J-P, Brouard S. Implication of Matrix Metalloproteinase 7 and the Noncanonical Wingless-Type Signaling Pathway in a Model of Kidney Allograft Tolerance Induced by the Administration of Anti-Donor Class II Antibodies in Journal of Immunology

2007 **Dugast A-S**, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, Vuillefroy de Silly R, Usal C, Smit H, Martinet B, Thebault P, Renaudin K, Vanhove B. Myeloid derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion in Journal of Immunology

Communications

Identification of regulatory NK cells in kidney allograft tolerance induced by anti-CD28 antibodies. **Dugast A-S**, Haspot F, Seveno C, Coulon F, Heslan M, Soulillou J-P and Vanhove B. Basic Science Symposium. La Baule June 2005.

Myeloid suppressor cells (MSC) in tolerant allograft recipients inhibits effector but not T reg cells in a heme oxygenase-I and iNOS-controlled manner. **Dugast A-S**, Heslan M, Usal C, Smit H, Hill Marcelo, Anegon I and Vanhove B. American Transplant Congress. San Francisco May 2007.

Evidence of Dickkopf homolog 3 (DKK-3) over expression in tolerant allograft recipients in the rat. **Dugast A-S**, Jovanovic V, Coulon F, Usal C, Smit H, Brouard S and Vanhove B. European Congress Of Transplantation. Prague September 2007

Specific inhibition of effector T cells by myeloid derived suppressor cells (MDSC) in tolerant recipients of rat kidney allografts. **Dugast A-S**, Heslan M, Usal C, Smit H and Vanhove B. American Transplant Congress. Toronto May 2008

Specific inhibition of effector T cells by myeloid derived suppressor cells (MDSC) in tolerant recipients of rat kidney allografts. **Dugast A-S**, Heslan M, Usal C, Smit H and Vanhove B. FOCIS Boston June 2008

Prix

Best poster distinction at the World Transplant Congress (Boston, 2006)

Trainee award of the FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societes, Boston June 2008)

Travel Award at FOCIS, Boston, June 2008

Posters

Increased blood B7+ NK cells in tolerance to kidney allograft induced by anti-CD28 antibodies. **Dugast A-S**, Haspot F, Seveno C, Coulon F, Soulillou JP and Vanhove B. Société Francophone d'Immunologie. Paris October 2004

Accumulation of myeloid suppressor cells (MSC) producing nitric oxide in blood of tolerant kidney allograft recipients. **Dugast A-S**, Heslan M, Smit H, Usal C, Haspot F, Seveno C, Brouard S, Vanhove B. World Transplant Congress. Boston August 2006.

Accumulation of myeloid suppressor cells (MSC) producing nitric oxide in blood of tolerant kidney allograft recipients. **Dugast A-S**, Heslan M, Smit H, Usal C, Haspot F, Seveno C, Brouard S, Vanhove B. European Congress of Immunology. Paris September 2006.

Evidence of Dickkopf homolog 3 (DKK-3) over expression in tolerant allograft recipients in the rat. **Dugast A-S**, Jovanovic V, Coulon F, Usan C, Smit H, Brouard S, Vanhove B. American Transplant Congress Toronto May 2008

Specific inhibition of effector T cells by myeloid derived suppressor cells (MDSC) in tolerant recipients of rat kidney allografts. **Dugast A-S**, Heslan M, Usal C, Smit H and Vanhove B. FOCIS (FOCIS Center of Excellence Trainee Satellite Symposium) June 2008

Mise en évidence de nouveaux mécanismes de tolérance induits par des anticorps anti-CD28 en allotransplantation

L'inhibition de l'activation des lymphocytes T par des cellules régulatrices est un mécanisme naturel qui peut être exploité pour contrôler l'alloréactivité en transplantation. Les lymphocytes T régulateurs agissant par la sécrétion de cytokines inhibitrices ont été parmi les plus étudiés. Nous avons démontré que le blocage spécifique de l'interaction CD28/B7 dans un modèle de greffe de rein chez le rat induit une forme de tolérance contrôlée aussi par d'autres mécanismes. Tout d'abord, nous avons mis en évidence le développement de cellules myéloïdes suppressives capables d'inhiber l'activation des cellules T selon un mécanisme dépendant du monoxyde d'azote (NO). De plus, par une analyse du transcriptome de ces rats, nous avons remarqué une modification de la voie WNT, une voie impliquée dans le contrôle de l'embryogénèse et de la prolifération de cellules tumorales. En particulier, les animaux tolérants leur greffe de rein surexprimaient la protéine DKK-3, un régulateur de cette voie connue pour inhiber la croissance de cellules tumorales. Nous avons observé que cette protéine, sécrétée par les lymphocytes, était immunosuppressive pour les lymphocytes T *in vitro* et bloquait le rejet de greffe *in vivo*. Ces recherches ont contribué à montrer la diversité des mécanismes de contrôle qui peuvent être mis en place par le système immunitaire.

Mots Clés : Allotransplantation, Costimulation, Cellules Régulatrices, Tolérance, CD28, Rat

Identification of novel mechanisms of tolerance induced by anti-CD28 antibodies in allotransplantation

Inhibition of T lymphocyte activation by regulatory cells is a natural mechanism which can be exploited to control alloreactivity in transplantation. Regulatory T lymphocytes acting by secretion of inhibitory cytokines have been largely studied. Here, we demonstrated that the selective blockade of the CD28/B7 interactions in a model of kidney allograft in the rat induced a form of immune tolerance also controlled by other mechanisms. We found that myeloid derived suppressor cells expand in tolerant animals and are able to suppress alloreactive T cells activation using a NO-dependant mechanism. Moreover, using a transcriptomic approach, we found that the Wnt pathway, a pathway known to be involved in the control of embryogenesis and tumorigenesis, was profoundly modified. In particular, tolerated kidney grafts overexpressed DKK-3, a protein known to regulate the Wnt pathway. We observed that this protein, secreted by lymphocytes, was immunosuppressive for T lymphocytes *in vitro* and blocked graft rejection *in vivo*. These researches illustrate the plurality of the mechanisms used by the immune system to prevent unwanted activation. In transplantation, they might be exploited to develop novel therapeutic approaches.

Key words : Allotransplantation, Costimulation, Regulatory cells, Tolerance, CD28, Rat

DUGAST Anne-Sophie
INSERM U643
30, bvd Jean Monnet
44093 Nantes cedex 01