

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**Recherche et étude de gènes différentiellement
exprimés dans des modèles de tolérance à l'allogreffe
chez le rat**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de CHIMIE BIOLOGIE
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie

Présentée

Et soutenue publiquement par

Jean-Benoît LE LUDUEC

Le 17 novembre 2006, devant le jury ci-dessous

Président	Mr Gilles BLANCHO, Professeur, Nantes
Rapporteurs	Mme Sabine SARNACKI, Professeur, Paris Mr Hervé WATIER, Professeur, Tours
Examineur	Mr Gilles BLANCHO, Professeur, Nantes
Directeur de thèse	Mme Maria-Cristina CUTURI, Directeur de Recherche, Nantes

Unité INSERM U643
Dirigée par le Pr. Jean-Paul Souillou

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AICD	"Activation Induced Cell Death"
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CD	Cluster de Différenciation
CDR	"Complementary Determining Region"
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTLA-4	"Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4"
Foxp3	"Forkhead box P3"
FSTL1	Follistatin-like 1
GITR	"Glucocorticoid-Induced TNF-related Receptor"
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyl Transférase
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
GIC	Graft infiltrating cells
LEW	Lewis
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocytes T
MLR	"Mixed Leucocyte Reaction"
MOS	Mirror oriented selection
NK	"Natural Killer"
PBL	"Peripheral Blood Lymphocyte"
PBS	"Phosphate Buffer Saline"
RT-PCR	Reverse transcription Polymerase Chain Reaction
S1fn3	Schlafen-3
TCR	"T Cell Receptor"
TGF- β	"Transforming Growth Factor-beta"
Th	"T helper"
TNF	"Tumor Necrosis Factor"
Treg	Cellule T régulatrice
TSD	Transfusion de Sang du Donneur

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des CMH de classe I et de classe II.....	15
Figure 2 : Représentation de la voie de présentation classique et de la cross-présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe I	16
Figure 3 : Représentation de la voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II.....	17
Figure 4 : Différenciation des thymocytes dans le thymus.....	18
Figure 5 : Représentation du complexe TCR.....	19
Figure 6 : Représentation de la voie de présentation directe et indirecte.....	20
Figure 7 : Mécanismes périphériques de l'induction de tolérance.....	27
Figure 8 : Principe du differential display.....	37
Figure 9 : Principe de l'hybridation Soustractive Suppressive (HSS).....	38
Figure 10 : Principe du Differential Analysis of Transcripts with Alternative Splicing.....	39
Figure 11 : Principe du SAGE.....	41
Figure 12 : Principe de fonctionnement des puces à ADN.....	42
Figure 13 : Représentation du nombre de publications.....	45
Figure 14 : Modèle d'induction de tolérance à l'allogreffe cardiaque par TSD.....	50
Figure 15 : Expression des ARNm correspondant aux clones 2F10, 2H11, et 3B2 dans les greffons syngéniques.....	57
Figure 16 : Expression des ARNm correspondant à CD4 et FSTL1 dans les greffons syngéniques, rejetés, et tolérés.....	58
Figure 17 : Etude de la banque spécifique des greffons tolérés par la technique des puces ADN.....	58
Figure 18 : Expression de l'ARNm correspondant à la tropomyosine dans les greffons syngéniques, rejetés, et tolérés.....	59
Figure 19 : Alignement des séquences protéiques codantes pour la protéine FSTL1 chez l'homme, la souris et le rat.....	62

Figure 20 : Localisation chromosomique et structure exonique et intronique de FSTL1 de rat	64
Figure 21 : Séquence primaire de la protéine FSTL1 de rat	65
Figure 22 : Séquence tridimensionnelle prédictive de la protéine FSTL1 de rat	65
Figure 23 : Construction de la protéine de fusion.....	96
Figure 24 : Mesure de l'expression protéique de FSTL1-flag par Western Blot dans les cellules et le surnageant.....	97
Figure 25 : Mesure de l'effet de la protéine FSTL1	97
Figure 26: Hypothèse du mécanisme d'action de FSTL1 dans la TSD	98
Figure 27 : Modèle hypothétique de l'induction de tolérance à l'allogreffe par TSD	102
Figure 28 : La structure chimique du LF15-0195.	104
Figure 29 : Modèle d'induction de tolérance à l'allogreffe cardiaque par traitement avec le LF15-0195.....	106
Figure 30 : Contrôles de la prolifération de la MLR.....	110
Figure 31 : Stratégie de recherche de gènes.....	111
Figure 32 : Contrôle des étapes de l'Hybridation Soustractive Suppressive.....	112
Figure 33 : Comparaison des profils d'électrophorèse des produits de PCR.....	113
Figure 34 : Gel de contrôle des produits de PCR.....	113
Figure 35 : Criblage différentiel des clones des banques de la MLR.....	114
Figure 36 : Représentation graphique de l'expression différentielle des clones.....	115
Figure 37 : Etude de la redondance par criblage des clones sur puces à ADN.....	115
Figure 38 : Vérification de l'expression différentielle des clones sélectionnés.....	116
Figure 39 : Représentation des trois groupes protéiques de la famille Schlafen.....	117
Figure 40 : Localisation chromosomique et structure exonique et intronique de Slfn3 de rat	119
Figure 41 : Séquence primaire de la protéine Slfn3 de rat	119
Figure 42 : Expression transcriptionnelle de Slfn3 dans différentes populations de thymocytes.....	152
Figure 43 : Cartographie de la construction des vecteurs Slfn3-IRES-GFP et GFP.....	155
Figure 44 : Analyse par western blot de la spécificité de l'anticorps polyclonal.....	155

Figure 45 : Marquage par Immuno-histochimie sur des cellules 2.93.....	156
Figure 46 : Analyse par western blot de l'expression protéique de Slfn3 dans une cinétique de LT activés par anti-CD3 et anti-CD28.....	157
Figure 47 : Cartographie de la séquence transcriptionnelle de Slfn3 et étude de l'épissage alternatif.....	158
Figure 48 : Cartographie de la séquence protéique de Slfn3.....	159
Figure 49 : Expression transcriptionnelle de Slfn3 dans une cinétique d'activation de DCs...	160
Figure 50 : Marquage par immuno-histochimie de BMDCs.....	161
Figure 51 : Représentation de l'hypothèse de fonctionnement et de la régulation de la protéine Slfn3.....	162
Figure 52 : Principe de fonctionnement des puces à ADN.....	176
Figure 53 : PCR quantitative en temps réel.....	183

Sommaire

Introduction.....	12
I Immunologie de la transplantation.....	13
A. La greffe allogénique.....	13
1. La reconnaissance	13
1.1 Les acteurs de la reconnaissance antigénique.....	13
1.1.1 Le Complexe Majeur d’Histocompatibilité (CMH).....	13
1.1.1.1 Le CMH de classe I.....	14
1.1.1.2 Le CMH de classe II.....	15
1.1.2 Les lymphocytes T et leur récepteur.....	16
1.1.2.1 La différenciation des LT dans le thymus.....	16
1.1.2.1.1 Le Stade I.....	16
1.1.2.1.2 Le Stade II.....	16
1.1.2.1.3 Le Stade III.....	17
1.1.2.2 Le récepteur des lymphocytes T (TCR).....	17
1.2 L’alloreconnaissance	18
1.2.1 La voie de présentation directe.....	19
1.2.2 La voie de présentation indirecte.....	19
1.3 L’Activation des LT allospécifiques.....	20
2. Le rejet.....	21
2.1 Le rejet hyperaigu.....	21
2.2 Le rejet aigu.....	22
2.3 Le rejet chronique.....	23
B. La tolérance.....	23
1. La tolérance centrale.....	23
2. La tolérance périphérique.....	25
2.1 La délétion.....	25
2.2 L’anergie.....	26
2.3 L’ignorance.....	26
2.4 La régulation ou suppression.....	26
2.4.1 Les cellules T régulatrices CD4+CD25+.....	26
2.4.1.1 Les cellules T régulatrices «naturelles» CD4+CD25+.....	27
2.4.1.1.1 Origine	27
2.4.1.1.2 Phénotype	28
2.4.1.1.3 Mécanismes d’action	29
2.4.1.2 Les cellules T régulatrices «induites»	30

2.4.1.3 Implications des cellules régulatrices CD4+CD25+ dans la tolérance en allotransplantation.....	30
2.4.1.4 Les autres cellules régulatrices.....	31
II La recherche des gènes différentiellement exprimés.....	32
A. De la génomique structurale à la post-génomique : utilité de l'étude de l'expression transcriptionnelle.....	33
B. Les différentes méthodes de recherche de gènes différentiellement exprimés.....	34
1. Les méthodes de criblage de l'expression différentielle des gènes.....	35
1.1 Le « Differential Display »	35
1.2 L'hybridation soustractive.....	35
1.3 Differential Analysis of Transcripts with Alternative Splicing (DATAS)	36
2. Les méthodes à haut débit d'analyse de l'expression différentielle des gènes.....	38
2.1 Les cartes microfluidiques.....	38
2.2 Le criblage électronique	38
2.3 Le SAGE	38
2.4 Les macroarrays, les puces à ADNc et à oligonucléotides.....	40
C. Quel avenir pour l'étude de l'expression différentielle ?.....	41
D. Objectifs de thèse et approche que nous avons eu en 2001 pour aborder la recherche de gènes différentiellement exprimés	43
Partie I.....	45
I Recherche de gènes dans le modèle de Transfusion du sang du donneur (TSD)..	46
A. La transfusion du sang du donneur.....	46
1. Les différents modèles expérimentaux de transfusion spécifique du donneur.....	46
2. Modèle d'induction de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat par TSD.....	47
2.1 Les souches de rat utilisées.....	47
2.2 La transplantation.....	47
2.3 Le modèle.....	48
3. Résultats obtenus dans notre modèle de TSD.....	48
3.1 Infiltrat leucocytaire dans les greffons.....	49
3.2 Absence de délétion clonale des CTL alloréactifs contre le donneur.....	49
3.3 La réponse humorale.....	50
3.4 Expression des cytokines dans les greffons.....	50
3.5 Répertoire des cellules T infiltrant le greffon au niveau de la chaîne V β du TCR.....	51
3.6 Composants critiques de l'induction de tolérance.....	52
B. Recherche de gènes différentiellement exprimés dans notre modèle de TSD.....	54
1. Objectif et situation étudiée.....	54

2. Hybridation soustractive et criblages.....	54
2.1 Première banque et premier criblage.....	54
2.2 Amélioration de la soustraction et second criblage.....	55
2.3 Criblage par les puces à ADN.....	56
3 Bilan des molécules isolées à partir de cette HSS.....	57
3.1 CX3CR1.....	57
3.2 TORID.....	58
3.3 CD4.....	58
3.4 FSTL1.....	60
3.4.1 Etat des connaissances sur FSTL1.....	60
3.4.2 FSTL1 chez le rat.....	62
II Etude de la Follistatin-Like 1 (FSTL1).....	64
III Discussion et perspectives.....	92
IV Intégration des nouvelles molécules dans le modèle de tolérance.....	97
Partie II.....	101
I Recherche de gènes dans le modèle de tolérance induite par traitement avec le LF15-0195.....	102
A. Le LF15-0195 un analogue de la Deoxyspergualine.....	102
1. Modèles d'étude du LF15-0195.....	102
2. Mécanismes moléculaires d'action du LF15-0195	103
2.1 Interaction avec les protéines de choc thermique.....	103
2.2 Induction de la voie des caspases.....	103
2.3 Inhibition de la voie NF- κ B.....	103
B. Modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat par traitement au LF15-0195	104
C. Résultats obtenus dans notre modèle de transplantation	104
1. Le LF15-0195 induit une tolérance durable et spécifique.....	104
2. Inhibition des macrophages.....	105
3. Inhibition de la production des anticorps anti-donneur.....	105
4. Inhibition de la différenciation Th1.....	105
5. Induction de cellules T régulatrices.....	105
5.1 Transfert de tolérance.....	105
5.2 Augmentation de la population CD4+CD25+.....	105
5.3 Expression de Foxp3.....	106
5.4 Prolifération et production de cytokines.....	106
5.5 Spécificité des cellules régulatrices.....	106

D. Recherche de gènes différentiellement exprimés dans le modèle de tolérance induit par le LF15-0195.....	108
1. Situation étudiée.....	108
2. Stratégie utilisée.....	109
2.1 L'Hybridation soustractive suppressive.....	110
2.2. Utilisation des puces à ADN comme méthode de criblage.....	111
3. Etat des connaissances de la famille Schlafen.....	114
3.1 Les différents membres de la famille Schlafen.....	114
3.2 Schlafen 3 chez le rat.....	116
II Etude de Schlafen-3 (Slfn3).....	118
III Discussion et perspectives.....	149
A. Discussion des résultats	149
B. Perspectives.....	152
1. Construction d'un vecteur lentiviral pour étudier la fonction de Slfn3.....	152
2. Production et caractérisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre Slfn3.....	153
3. Analyse de l'expression protéique de Slfn3 lors de l'activation des LT	154
GAPDH.....	155
4. Slfn3 dans les DCs	158
Conclusion.....	161
Annexe I.....	162
Annexe II.....	172
Bibliographie.....	184

Avant propos

La transplantation d'organes occupe une place essentielle en médecine. Elle permet de pallier à de nombreuses pathologies irréversibles mettant en péril la survie du malade. Les premières transplantations rénales réalisées avec succès furent effectuées au début des années 50. Malheureusement, la survie du greffon était très relative et n'est apparue qu'après une greffe faite entre jumeaux (1954), faisant la démonstration du problème de compatibilité du système HLA (Human Leucocyte Antigens) mis en avant dans les travaux de DAUSSET publiés en 1952. La greffe s'est ensuite étendue à d'autres types d'organes comme le cœur, le foie, le pancréas notamment grâce au développement des immunosuppresseurs, qui englobent toutes les substances capables de provoquer une diminution ou une abolition des réponses immunitaires tels que la Cyclosporine A (1972).

L'évolution des connaissances dans le domaine de l'immunologie a permis le développement de nombreuses stratégies thérapeutiques. Le rejet aigu, qui était à l'origine d'une grande partie des échecs en transplantation, est maintenant très bien contrôlé grâce à l'utilisation de drogues immunosuppressives et à la recherche des donneurs les plus compatibles. Mais tous ces traitements, pour la plupart non spécifiques, ont à long terme des effets néfastes pour l'organisme (cancer, infections à répétition, etc...). De plus, ces immunosuppresseurs ne permettent pas de prévenir la survenue du rejet chronique, rejet qui intervient à distance de la greffe et entraîne la perte du greffon. Ce processus de dégradation de l'organe est mal connu et suscite un grand intérêt en transplantation.

En clinique, l'induction de tolérance à l'allogreffe est devenue un objectif majeur. La tolérance est définie par l'acceptation définitive du greffon, en l'absence d'immunosuppression, sans développement de lésions caractérisant le rejet chronique, tout en conservant une capacité intacte du système immunitaire à se défendre contre d'autres antigènes étrangers. Cet état idéal d'immunosuppression spécifique vis-à-vis des alloantigènes du donneur, a été atteint dans de nombreux modèles d'allogreffe chez l'animal, mais n'a encore jamais pu être applicable à l'homme. L'étude des mécanismes impliqués dans les états de tolérance observés dans les modèles animaux est importante pour mieux comprendre le système immunitaire et représente une chance certaine de trouver de nouveaux traitements plus ciblés.

Durant ces dix dernières années, des révolutions techniques ont changé notre façon d'aborder l'étude du vivant. Cette évolution a été très forte dans le domaine de la biologie moléculaire, et notamment en ce qui concerne l'étude de l'expression du génome. En 2001, le séquençage complet du génome humain a marqué une avancée scientifique spectaculaire et majeure, mais a aussi constitué un tournant important qui a ouvert de nouvelles perspectives. La recherche de gènes différentiels qui a été grandement facilitée par ces avancées, constitue une stratégie intéressante pour isoler de nouveaux acteurs moléculaires à l'échelle d'une cellule, d'un organe, ou même d'un organisme entier.

L'objectif de ma thèse était d'identifier de nouvelles molécules jouant un rôle dans les mécanismes de tolérance, dans deux modèles différents de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat, développés au sein de notre laboratoire. Le premier est un modèle de tolérance induit par un protocole de Transfusion de Sang du Donneur (TSD). Le second est un modèle de tolérance basé sur l'administration d'un nouvel immunosuppresseur analogue à la 15-déoxyspergualine, le LF15-0195.

En introduction je décrirai de manière non exhaustive les mécanismes de la reconnaissance antigénique et le cas particulier que représente l'allorecognition. Je présenterai également les mécanismes impliqués dans le rejet et la tolérance. Je décrirai ensuite des méthodes de recherche de gènes et la réflexion que nous avons pu avoir au début de ma thèse pour mettre en place une méthode adaptée à notre problématique. L'étude en elle-même comportera deux parties. La première sera consacrée à la recherche de molécules dans le modèle d'induction de tolérance par TSD, et la seconde à la recherche de nouvelles molécules impliquées dans le modèle de tolérance par traitement au LF15-0195. Ces parties réuniront à chaque fois une description du modèle animal, une description des résultats antérieurs obtenus dans notre modèle, les résultats de la recherche de gènes différentiellement exprimés, les résultats de l'étude de la molécule présentés sous la forme d'articles, et des résultats additionnels accompagnés d'une discussion.

Introduction

I Immunologie de la transplantation

La transplantation allogénique est un transfert d'organe, ou d'un tissu, entre deux individus de la même espèce, mais génétiquement différents. Cette situation spécifique amène le système immunitaire de l'individu receveur à rencontrer des déterminants génétiques du greffon qui seront reconnus comme des alloantigènes. Le succès d'une transplantation implique d'éviter les phénomènes de rejet, le système immunitaire du receveur devant tolérer le greffon à court et long terme.

A. La greffe allogénique

Les mécanismes de reconnaissance antigénique, avec les lymphocytes T qui reconnaissent les alloantigènes jouent un rôle majeur lors du rejet de greffe.

1. La reconnaissance

1.1 Les acteurs de la reconnaissance antigénique

La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T se déroule par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces cellules présentent l'antigène sous la forme de peptides au niveau des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La reconnaissance sera différente selon le CMH exprimé: in vitro, on observe que la réponse du lymphocyte T à l'antigène est différente lorsque l'on utilise des CPA provenant de différents haplotypes CMH. La reconnaissance optimale se fait lorsque la CPA est histocompatible avec le lymphocyte T. Il s'agit du mécanisme de restriction par les molécules du CMH mis en évidence par Zinkernagel et Doherty en 1974 (Zinkernagel et al. 1974). Les études par cristallographie ont clairement montré que le récepteur des cellules T (TCR) interagissait avec un ligand composite constitué du peptide et du CMH (Garboczi et al. 1996; Garcia et al. 1996). La spécificité de la réponse engendrée grâce à cette reconnaissance par le TCR du complexe [CMH-peptide], est un élément clé de la reconnaissance antigénique.

1.1.1 Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

Les molécules du CMH sont codées par un ensemble de gènes polyalléliques regroupés en deux classes I et II (Bjorkman et al. 1987; Klein et al. 2000). Ces deux types de molécules se distinguent notamment par l'origine des peptides qu'ils présentent.

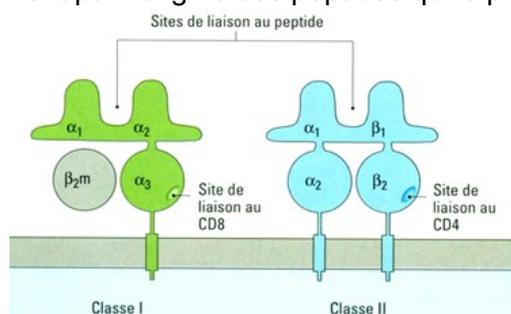


Figure 1 : Représentation des CMH de classe I et de classe II.

1.1.1.1 Le CMH de classe I

Les molécules du CMH de classe I sont formées par l'association non covalente d'une chaîne légère non polymorphique, la $\beta 2$ microglobuline et d'une chaîne lourde polymorphique α . Cette dernière comporte trois domaines extramembranaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), une région transmembranaire et une région intracytoplasmique (Figure 1). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment le site de liaison au peptide. Il est constitué d'une zone de fort polymorphisme appelée le sillon peptidique, et une zone de plus faible polymorphisme, les bordures. Le domaine $\alpha 3$ est impliqué dans l'association à la $\beta 2$ microglobuline et constitue le site de liaison du corécepteur CD8 (Bjorkman, Saper et al. 1987; Bjorkman et al. 1990; Klein and Sato 2000).

Les molécules du CMH de classe I sont fortement exprimées à la surface de la plupart des cellules nucléées de l'organisme. Chaque molécule du CMH de classe I peut présenter un peptide de petite taille (7 à 10 acides aminés), provenant principalement de la dégradation physiologique des protéines endogènes (Figure 2) (Townsend et al. 1989; Rock et al. 2002; Saveanu et al. 2005; Shastri et al. 2005; Hammer et al. 2006). Ce mode de présentation, le plus courant, cohabite avec une présentation dite croisée (Ackerman et al. 2004). Il s'agit de la présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I.

Ce complexe [CMH I du soi – peptide] peut alors être reconnu par les lymphocytes cytotoxiques T $CD8^+$ (Ackerman and Cresswell 2004; Heath et al. 2004; Ackerman et al. 2005; Cresswell et al. 2005; Groothuis et al. 2005; Groothuis et al. 2005; Rock et al. 2005; Shen et al. 2006).

Il existe également des molécules de classe I non classiques dont le rôle reste encore peu connu (Shawar et al. 1994; Rodgers et al. 2005).

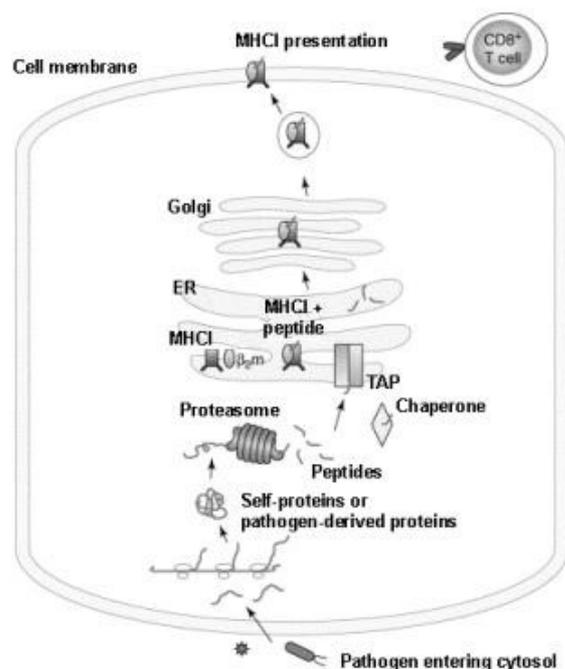


Figure 2 : Représentation de la voie de présentation classique et de la cross-présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe I (Source internet, auteur iconnu). 14

1.1.1.2 Le CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II sont formées par l'association d'une chaîne lourde β et d'une chaîne légère α , chacune comportant deux domaines extra-membranaires, un domaine membranaire et un domaine intracellulaire (Figure 1). La structure du sillon peptidique est proche de celle des molécules du CMH de classe I mais comporte des extrémités plus ouvertes ce qui permet la liaison de peptides plus longs (13-26 acides aminés contre 7-10) (Maffei et al. 1998).

Les molécules du CMH de classe II ont une expression généralement restreinte aux CPA telle que les cellules dendritiques (Villadangos et al. 2005), les lymphocytes B, les macrophages et les cellules endothéliales. Une fois synthétisées dans le réticulum endoplasmique (Figure 3), les molécules du CMH de classe II sont associées avec une chaîne invariante Ii, qui empêche la fixation des antigènes endogènes (Cresswell 1996). Suite à l'action de protéases de la famille des cathepsines, les antigènes capturés sont digérés en peptides (Germain et al. 1993) ainsi que la chaîne invariante Ii. L'élimination de la chaîne invariante permet la fixation du peptide (Pierre et al. 1998) et ce complexe est présenté à la surface de la CPA. Ce complexe [CMH II du soi – peptide exogène] est reconnu par les lymphocytes auxiliaires T CD4⁺.

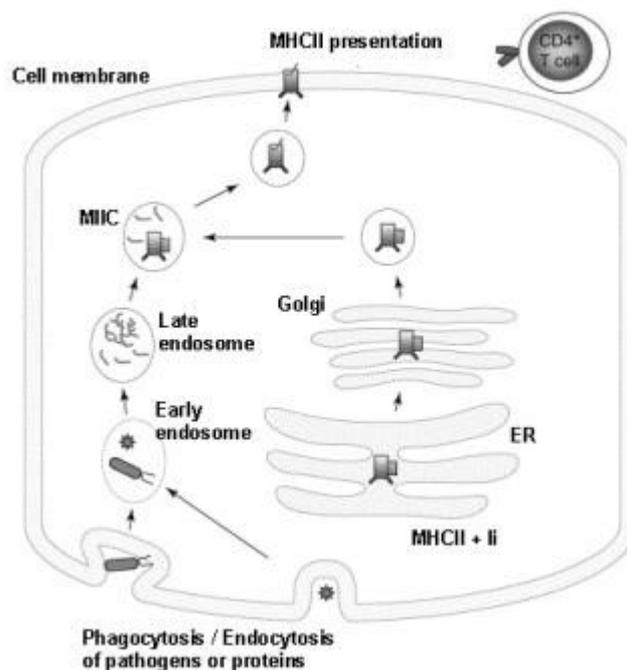


Figure 3 : Représentation de la voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II. (Source internet, auteur inconnu).

1.1.2 Les lymphocytes T et leur récepteur

1.1.2.1 La différenciation des LT dans le thymus

Les cellules souches pluripotentes présentes dans la moelle osseuse se différencient en cellules souches lymphoïdes, précurseurs communs des LB et des LT. Les LB continuent leur différenciation dans la moelle, tandis que les précurseurs des LT la quittent pour migrer dans le thymus et s'y différencier en LT (Figure 4). Les glycoprotéines de surface CD4 et CD8, le récepteur à l'IL2, ainsi que d'autres molécules de surface comme les différentes chaînes composant le TCR, permettent de suivre la différenciation des thymocytes en LT. Les étapes majeures du développement des LT sont marquées par l'apparition des co-récepteurs CD4 et CD8 à la surface cellulaire. Les thymocytes vont passer par un état double négatif (DN) $CD4^- CD8^-$, pour devenir double positif (DP) $CD4^+ CD8^+$, puis simple positif (SP) $CD4^+ CD8^-$ ou $CD4^- CD8^+$.

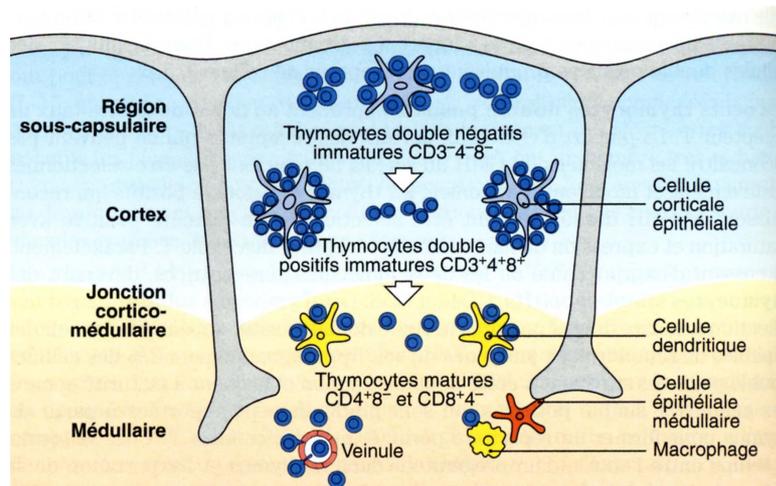


Figure 4 : Différenciation des thymocytes dans le thymus.

1.1.2.1.1 Le Stade I

A ce stade, les cellules sont double négatives, les chaînes β , et $\delta:\gamma$ subissent un réarrangement. Les thymocytes expriment à leur surface un pré TCR composé d'une pseudo chaîne α et de la chaîne β , accompagné du CD3. Les cellules entrent alors dans une phase de prolifération, puis se mettent à co-exprimer les glycoprotéines CD4 et CD8. Les thymocytes sont alors au stade DP.

1.1.2.1.2 Le Stade II

Au stade II ou DP, les thymocytes vont subir un réarrangement de leur chaîne α , puis vont être sélectionnés en fonction de l'affinité de leur TCR vis à vis du CMH : c'est la sélection positive. Dans le cortex, les cellules épithéliales corticales vont présenter les CMH de classes I et de classe II aux thymocytes DP. Le thymocyte devra avoir une affinité suffisamment forte avec le CMH pour déclencher des signaux de survie qui vont lui

permettre de continuer sa différenciation. Dans le cas contraire, le thymocyte DP entre en apoptose et est éliminé par les macrophages présents dans le cortex. C'est également à cette étape de sélection positive, qu'est déterminée, la différenciation de la cellule DP vers la voie T CD4 ou la voie T CD8. En effet, si le TCR se lie à un CMH de classe II le thymocyte deviendra T CD4 alors que si il se lie au CMH de classe I, il deviendra T CD8.

Une seconde phase de sélection, la sélection négative, va permettre de supprimer les thymocytes reconnaissant les antigènes du soi présentés dans le contexte du CMH. Les cellules reconnaissant les peptides du soi vont alors entrer en apoptose, alors que celle ne reconnaissant pas le soi vont arrêter d'exprimer un des co-récepteurs CD4 ou CD8.

1.1.2.1.3 Le Stade III

Au stade III, ou SP, les thymocytes retenus lors de la sélection négative voient leur densité de TCR augmenter et perdent l'expression d'une des deux molécules co-réceptrices: le résultat en est l'obtention de lymphocytes T simples positifs matures $TCR\alpha\beta^{high} CD4^+$ ou $TCR\alpha\beta^{high} CD8^+$ prêts à migrer en périphérie. Durant les 3 semaines que dure la maturation thymique, lors de laquelle ils subissent les sélections positive et négative, 95 % des thymocytes sont éliminés (pour revue de l'ensemble du phénomène de la différenciation thymique: (Reza et al. 1998; Hunig et al. 2001; Liu et al. 2004; Nikolich-Zugich et al. 2004; Kappes et al. 2005).

1.1.2.2 Le récepteur des lymphocytes T (TCR)

Le récepteur des lymphocytes T correspond à un complexe qui comprend le CD3 et le TCR (Figure 5). La fonction du CD3 est double, il doit assurer la signalisation et le transport du TCR à la membrane. Il est formé d'un complexe de cinq chaînes différentes. Trois d'entre elles ($CD3\gamma$, δ et ϵ) présentent un domaine extracellulaire (apparenté à celui retrouvé dans les immunoglobulines), un domaine transmembranaire et un domaine intra-cytoplasmique. Les 2 autres ζ et η sont composés d'un court segment extracellulaire, d'un segment transmembranaire et d'un long segment intra-cytoplasmique. Le complexe multimoléculaire CD3 est ainsi constitué de 3 dimères dont deux hétérodimères $\gamma\epsilon$ et $\delta\epsilon$ et un dimère $\zeta\zeta$ ou $\zeta\eta$ (Malissen et al. 1996). Les parties intra-cytoplasmiques possèdent pour la plupart des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) qui vont intervenir dans les voies de transduction du signal (activation du lymphocyte T) (Davis 1990; Horejsi et al. 2004). Le TCR est un hétérodimère formé par l'association covalente de deux chaînes polypeptidiques α et β ou γ et δ . Plus de 90% des lymphocytes T de l'organisme portent des récepteurs $TCR\alpha\beta$ (Davis 1990).

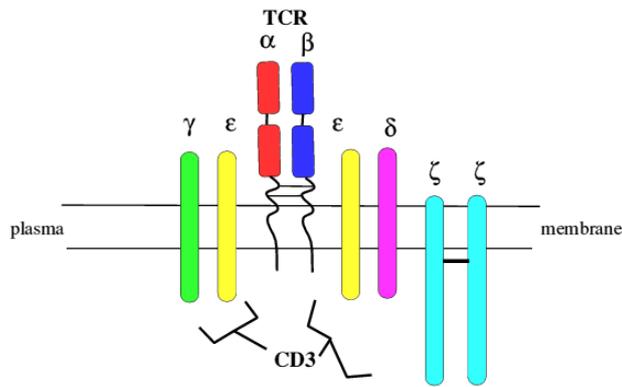


Figure 5 : Représentation du complexe TCR. (Source internet, auteur inconnu).

Les chaînes α et β qui constituent le TCR sont formées de deux régions, une constante (C) du côté C-terminal et une variable, les domaines variables $V\alpha$ et $V\beta$ suivant la chaîne, du côté N-terminal, dérivant de l'assemblage des segments géniques (Chothia et al. 1988). Le domaine variable de la chaîne α est formée de deux segments géniques $V\alpha$ et $J\alpha$. Le domaine variable de la chaîne β est formée de trois segments géniques $V\beta$, $D\beta$ et $J\beta$. Ces segments géniques initialement séparés sur l'ADN sont réarrangés dans le thymus. Les domaines variables présentent les trois boucles hypervariables CDR1, 2 et 3 qui sont impliquées dans l'interaction du TCR avec son ligand (Garcia, Degano et al. 1996; Reinherz et al. 1999). La région CDR3, qui est la plus hypervariable et la plus centrale, est composée de l'extrémité 3' du segment V et de l'extrémité 5' du segment J (plus le segment D pour la chaîne β) et confère au TCR sa spécificité antigénique (Chothia, Boswell et al. 1988; Housset et al. 2003).

1.2 L'allorecognition

L'allorecognition implique des interactions [CMH-peptide]-TCR particulières. Les lymphocytes du receveur peuvent reconnaître directement les complexes allogéniques [CMH-peptide] présents à la surface des cellules allogéniques du greffon (présentation directe), mais aussi les peptides allogéniques présentés par les CPA du receveur (présentation indirecte)(Figure 6).

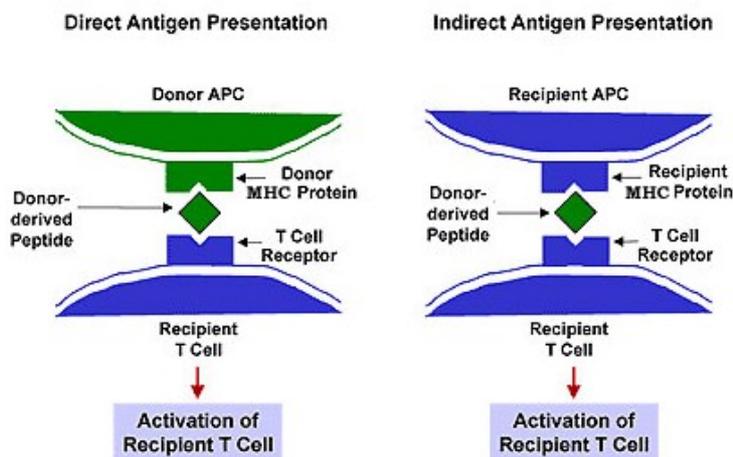


Figure 6 : Représentation de la voie de présentation directe et indirecte (www.medscape.com).

1.2.1 La voie de présentation directe

Les cellules T CD8⁺ et CD4⁺ du receveur peuvent reconnaître directement la molécule allogénique du CMH de classe I ou de classe II, avec ou sans peptide, exprimée par une CPA du donneur (Lechler et al. 1990). En dehors de toute sensibilisation préalable, les cellules alloréactives préexistent chez tous les individus et représentent environ 10% du répertoire (Benichou et al. 1996; Suchin et al. 2001). Le mécanisme d'alloréactivité est comme une forme particulière de « mimétisme moléculaire » (Lechler et al. 1992) où la cellule T assimile la structure tridimensionnelle du complexe [CMH allogénique-peptide] à celle d'une configuration du complexe [CMH du soi-peptide]. La reconnaissance par les lymphocytes T de peptides dans le contexte du CMH allogénique démontre que la restriction de reconnaissance des lymphocytes T dans le contexte du CMH du soi n'est pas exclusive. La reconnaissance directe joue un rôle primordial dans certains modèles d'allogreffe. Lechler et al. ont démontré chez le rat que la transplantation d'un greffon rénal toléré, dépourvu de ses leucocytes, à un second receveur non-traité ne conduit pas au rejet de la greffe. La re-injection de cellules dendritiques du donneur induit le rejet. Ceci démontre que, dans ce modèle, la réponse directe joue un rôle primordial dans le processus de rejet (Lechler et al. 1982). De même, dans un autre modèle d'allogreffe rénale chez le rat, l'élimination des leucocytes passagers du greffon avant la transplantation permet de prolonger la survie de la greffe (McKenzie et al. 1984). D'autres travaux réalisés avec des greffons d'animaux déficients en molécules du CMH aboutissent aux mêmes résultats. Markmann et al. montrent qu'une allogreffe d'îlots de pancréas issus de souris dépourvues de molécules du CMH de classe I est acceptée de façon définitive (Markmann et al. 1992). De même, une allogreffe cardiaque provenant de souris déficientes en molécules du CMH de classe II n'est pas rejetée (Campos et al. 1995).

La reconnaissance directe n'est cependant pas le seul mécanisme qui peut entraîner le rejet d'allogreffe. Il a en effet été démontré, dans différents modèles d'allogreffe, que la reconnaissance indirecte est suffisante et/ou nécessaire pour initier un rejet.

1.2.2 La voie de présentation indirecte

La présentation indirecte est un phénomène physiologique qui correspond à la voie classique pour des antigènes exogènes où les lymphocytes T du receveur reconnaissent les molécules du CMH du donneur présentées par les CPA du receveur (Figure 6). Lorsqu'il s'agit de peptides exogènes chargés par des molécules de classe I, on parle de « cross priming », mais ce mécanisme ne paraît pas essentiel dans l'alloréactivité (Valujskikh et al. 2002). La voie indirecte, dans les réponses alloimmunes, s'applique surtout aux lymphocytes T CD4 reconnaissant des peptides issus des molécules de classe I ou II du donneur ou

d'antigènes mineurs, présentés par les molécules du CMH de classe II du receveur (Benichou, Tam et al. 1996; Game et al. 2002; Shirwan et al. 2003; Jiang et al. 2004). Dans certains modèles, des greffons dépourvus de molécules du CMH de classe II sont rejetés très rapidement, ce qui démontre que, la présentation directe étant inexistante, la présentation indirecte est suffisante pour induire le rejet de l'allogreffe (Auchincloss et al. 1993; Josien et al. 1998; Valujskikh et al. 1998; Yamada et al. 2003). Des travaux ont démontré que les lymphocytes T CD4⁺ sont suffisants pour induire le rejet d'une allogreffe dépourvue de molécules du CMH de classe I ou de classe II, donc par présentation indirecte (Dalloul et al. 1996). Un autre modèle a permis de démontrer que la présentation indirecte d'un seul déterminant allogénique aux lymphocytes T CD4⁺ est suffisante pour entraîner le rejet d'une greffe de cœur (Smith et al. 2001). D'autres travaux suggèrent que la réponse indirecte est responsable de l'installation du rejet chronique (Liu et al. 1993; Sayegh et al. 1996).

En résumé, l'implication des deux voies de présentation antigénique dans le rejet d'allogreffe semble dépendre du modèle allogénique utilisé et interviendrait de façon séquentielle. La présentation directe entraînerait une réponse immédiate et serait plus impliquée dans le rejet aigu alors que la présentation indirecte serait plus impliquée dans la mise en place du processus de rejet chronique (Liu, Sun et al. 1993; Shirwan et al. 1997).

1.3 L'Activation des LT allospécifiques

Les cellules endothéliales d'un greffon vascularisé constituent le premier point de contact avec les cellules immunitaires du receveur, et peuvent ainsi jouer un rôle important dans la présentation directe (Kreisel et al. 2002; Kreisel et al. 2002). Cependant, les CPA les plus efficaces sont les cellules dendritiques (DCs); ces cellules ayant la capacité d'activer complètement des cellules T naïves, notamment grâce à l'expression de molécules de costimulation.

Les DCs fournissent deux signaux aux cellules T alloréactives naïves pour initier la cascade de signalisation intracellulaire menant à leur activation (Janeway et al. 1994). Le signal 1 consiste en l'engagement du TCR par le CMH de la DC, tandis que le signal 2 correspond à l'interaction des molécules de costimulation de la DC avec leur récepteur présent à la surface des lymphocytes T. Il existe de nombreuses molécules de costimulation (Frauwirth et al. 2002), mais les mieux caractérisées sont B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) qui lient le CD28 (Linsley et al. 1993). Une fois activées, les cellules T expriment CTLA4 (CD152) qui lie les molécules B7 avec une très forte affinité. CTLA4 délivre un signal négatif à la cellule T activée, permettant une régulation de la réponse immune (Walunas et al. 1996; Lee et al.

1998). Une autre voie de costimulation d'importance majeure en transplantation est l'interaction CD40-CD40L (gp39, CD154) (Larsen et al. 1997). CD40L est induit sur les cellules T CD4⁺ activées et permet en retour une activation de la DC exprimant le CD40.

L'activation complète des cellules T mène à la production d'IL2 (considérée comme le signal 3) qui favorise leur prolifération et l'amplification du pool réactif. Les cellules T CD4⁺, une fois activées par les cellules présentatrices d'antigène, jouent un rôle primordial en activant de nombreuses cellules effectrices par l'intermédiaire de leur production de cytokines. Les cytokines, responsables de la communication intercellulaire, sont, avec les anticorps, les médiateurs solubles impliqués dans le développement de la réponse immunitaire. Selon le phénotype des DCs, les cytokines présentes, et la reconnaissance TCR/CMH, les précurseurs CD4 (Th0) se différencient en cellules Th1, Th2 (Mosmann et al. 1996), ou T régulateurs (Th3 ou Tr1) (Chen et al. 1994; Groux 2003). Les cellules Th1 sont associées à une réponse à médiation cellulaire et secrètent principalement de l'IL2, de l'INF- γ et du TNF- α , alors que les cellules Th2 sont généralement associées à une réponse de type humoral et secrètent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ainsi que de l'IL-13, (Mosmann and Sad 1996). Les cellules Th3 et Tr1 sont des cellules régulatrices induites. Les Th3 secrètent du TGF- β (Chen, Kuchroo et al. 1994) tandis que les Tr1 secrètent de l'IL-10 (Asiedu et al. 2005). Très récemment, une nouvelle voie de différenciation (Th17), à été mise en évidence dans les réactions inflammatoires responsables de maladies auto-immunes et secrètent l'IL17-A, l'IL-17F, l'IL-6 et le TNF- α (Kolls et al. 2004). Les cellules Th17 sont proches des Th1, mais des études récentes montrent que leur différenciation serait indépendante (Harrington et al. 2005; Park et al. 2005). Pour le moment aucune étude n'a décrit cette population dans le cadre de la greffe d'organe, mais de nombreux groupes de travail s'intéressent à l'effet de ces cellules en transplantation.

2. Le rejet

Le rejet d'allogreffe est un terme général qui recouvre de nombreux mécanismes de la réponse immune dirigée contre le greffon. Il existe plusieurs types de rejet apparaissant de manière séquentielle: le rejet hyper aigu, aigu et chronique.

2.1 Le rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu (*rejet vasculaire*) se manifeste dans les minutes ou les heures qui suivent le rétablissement de la continuité vasculaire dans le cas de greffe d'organes vascularisés. Le principal mécanisme de ce rejet est lié à la fixation d'alloanticorps anti-greffon, présents chez le receveur. Les anticorps préformés sont le plus souvent dirigés contre les protéines du système sanguin ABO ou contre les molécules du CMH étranger qui ont pu être rencontrées au cours d'une grossesse, de transfusions sanguines ou d'une transplantation précédente. Ils se lient à l'endothélium vasculaire du greffon et activent le complément, induisant des

lésions entraînant l'agrégation plaquettaire responsable d'une thrombose massive du greffon. Le rejet suraigu se manifeste par un infarctus du transplant avec des lésions irréversibles pour l'organe.

Suite aux travaux de Dausset (Dausset 1981) et de Terasaki sur la recherche de compatibilité HLA entre donneur et receveur, pour éviter ce type de rejet, on pratique systématiquement une épreuve de compatibilité lymphocytaire directe entre le donneur et le receveur avant la greffe (cross-match). Cette épreuve consiste à vérifier que les lymphocytes du donneur ne sont pas lysés par le sérum du receveur.

2.2 Le rejet aigu

En l'absence de rejet hyper aigu, le greffon peut subir un rejet dit aigu. Le rejet aigu est caractérisé par un fort infiltrat interstitiel de macrophages et de lymphocytes T. L'infiltrat est d'abord localisé dans les sites périvasculaires. Les lymphocytes T déclenchent une réponse dite d'hypersensibilité retardée qui a pour principaux effecteurs les lymphocytes T CD4⁺ « helpers » (Th1). Les cytokines sécrétées (IL-2, TNF- β , IFN- γ) ont de multiples activités pro-inflammatoires qui entraînent une activation et une infiltration massive du greffon. Certaines cytokines (par exemple le TNF- α) sont directement cytotoxiques alors que d'autres comme l'IFN- γ et l'IL-1, déclenchent l'activité cytotoxique d'autres cellules infiltrantes comme les macrophages. Cette activation entraîne également une augmentation de la production de chimiokines, la synthèse d'enzymes protéolytiques, de monoxyde d'azote (NO), et d'autres facteurs solubles qui entretiennent la réponse inflammatoire (Le Moine et al. 2002).

L'accumulation d'antigènes du donneur et de lymphocytes T activés dans les ganglions drainants, permet l'activation des lymphocytes B produisant des immunoglobulines dirigées contre le greffon et jouent également un rôle dans le rejet aigu (Le Moine, Goldman et al. 2002).

Les traitements immunosuppresseurs actuellement utilisés comme la cyclosporine A, le FK506 ou l'azathioprine pour prévenir le rejet aigu ciblent les événements critiques de la réponse lymphocytaire T aux alloantigènes, tels que l'expansion clonale et la production de cytokines (pour revues : (Cara et al. 2004 ; Yoshimura et al. 2004 ; Lee et al. 2005)), et ont une très bonne efficacité. Cependant, le traitement avec des immunosuppresseurs, n'est pas sans conséquences, et a une incidence importante sur le déclenchement de maladies cardiovasculaires, infectieuses, et de cancers chez le patient greffé (Dantal et al. 2005).

2.3 Le rejet chronique

Un problème majeur non résolu aujourd'hui en transplantation est le rejet chronique, responsable d'une altération fonctionnelle progressive et la perte du greffon. Aujourd'hui, un patient recevant un greffon rénal, ayant surmonté avec succès les risques de la première année, possède un peu plus d'une chance sur deux de conserver son greffon fonctionnel 10 ans plus tard (61,9%, données extraites du bilan 2004 des activités de prélèvement et de greffe en France de l'agence de la biomédecine sur un ensemble de patients greffés entre 1993 et 2003). Le rejet chronique se manifeste au niveau histologique par une occlusion de la lumière des artérioles et parfois des veinules à l'intérieur du greffon, résultant d'un épaissement de l'intima des vaisseaux. Cette obstruction des vaisseaux entraîne des insuffisances vasculaires, des nécroses et des fibroses des tissus greffés (Libby et al. 2001). Bien que les mécanismes utilisés soient encore peu connus, il a été établi un rôle clé des anticorps et du complément (Russell et al. 1994; Russell et al. 1997; Hancock et al. 1998), ainsi que de l'apoptose (Plissonnier et al. 2000). Chez l'homme, le rejet chronique semble faire intervenir des anticorps anti-HLA A (Lee et al. 2002), et particulièrement des anti-classe II A (Pelletier et al. 2002). Actuellement, aucun traitement ne permet de prévenir et/ou d'éliminer le rejet chronique.

B. La tolérance

La tolérance immunologique désigne un état de non réponse spécifique vis à vis d'un antigène, tandis que les réponses pour d'autres antigènes sont maintenues. Cette notion a été définie par les travaux d'Owen, Medawar et Billingham au début des années 50 (Billingham et al. 1953). En transplantation, la tolérance allogénique se définit par l'acceptation définitive du greffon, en l'absence d'immunosuppression, sans développement de rejet chronique, avec une capacité intacte du système immunitaire à se défendre contre d'autres antigènes étrangers. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'état de tolérance est un des objectifs majeurs pour le succès des transplantations chez l'homme. Plusieurs mécanismes de tolérance ont été décrits: la délétion clonale, l'anergie, l'ignorance et la régulation ou suppression.

1. La tolérance centrale

Nous avons vu précédemment, dans la partie consacrée à la différenciation des LT dans le thymus, que ceux-ci subissaient deux types de sélection, la sélection positive et la sélection négative, basées sur l'affinité de leur TCR vis à vis des CMH ainsi que des antigènes qui leur étaient présentés. De par la déplétion négative, le thymus a un rôle essentiel dans la tolérance aux antigènes du soi en éliminant une grande majorité des cellules T

autoréactives. Cette sélection peut être médiée par les cellules épithéliales de la médulla ou les DCs thymiques (Figure 5), ces dernières jouant très probablement le rôle prédominant (Anderson et al. 1998). Récemment, il a été montré que le répertoire de peptides du soi présenté dans le thymus était étonnamment large, c'est à dire incluant aussi des antigènes exclusivement exprimés dans certains tissus comme l'insuline ou la thyroglobuline (Kyewski et al. 2002). La découverte du gène *aire* (autoimmune regulator) (AIRE chez l'homme), potentiellement responsable d'une dérégulation transcriptionnelle menant à l'expression de nombreux antigènes spécifiques de tissus périphériques, par cellules épithéliales de la médulla du thymus, permet de mieux comprendre ce phénomène (Anderson et al. 2002; Liston et al. 2003). Un défaut d'expression du gène *aire* va être responsable de maladies autoimmunes spécifiques d'organes appelées APECED (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)(Nagamine et al. 1997; Aaltonen et al. 1999).

La tolérance centrale en transplantation peut avoir lieu lorsqu'un chimérisme s'est créé au sein du thymus du receveur. Un chimérisme thymique se définit par la présence de CPA du donneur dans le thymus. Ainsi, les CPA du donneur induisent par sélection négative l'élimination des clones T allogéniques reconnaissant les molécules du CMH du donneur.

De nombreux protocoles expérimentaux visent à obtenir un chimérisme chez les petits (Tomita et al. 1994; Manilay et al. 1998; Wekerle et al. 1998) ou grands modèles animaux (Kawai et al. 1995; Fuchimoto et al. 2000; Huang et al. 2000). L'injection de cellules allogéniques ou de peptides allogéniques du donneur directement dans le thymus du receveur permet d'induire la tolérance à des allogreffes cardiaques. La présentation des antigènes du CMH du donneur par les CPA du receveur permet ainsi l'élimination des cellules alloréactives (Goss et al. 1993; Chowdhury et al. 1997). La greffe d'épithélium thymique allogénique permet également d'induire une tolérance spécifique envers les mêmes antigènes que ceux portés par les cellules épithéliales thymiques. Cette tolérance est induite et transférable par des cellules régulatrices spécifiques des antigènes des cellules du donneur (Salaun et al. 1990; Modigliani et al. 1995; Modigliani et al. 1996). La greffe de faibles quantités de moelle osseuse allogénique permet d'induire des cellules régulatrices spécifiques des antigènes du donneur (Bemelman et al. 1998). Ainsi, au sein du thymus, la présentation directe (présence de cellules du donneur) ou la présentation indirecte de peptides allogéniques permet d'éliminer les cellules alloréactives mais aussi de générer des cellules régulatrices spécifiques et responsables du maintien de la tolérance (voir la partie 2.4 Régulation ou suppression).

Les thymocytes réactifs au soi ne sont cependant pas tous éliminés après la déplétion négative dans le thymus (Bouneaud et al. 2000). Les mécanismes périphériques du maintien

de la tolérance sont donc également essentiels et peuvent constituer des approches pour l'induction de tolérance aux alloantigènes.

2. La tolérance périphérique

Plusieurs mécanismes de tolérance périphérique ont été décrits: la délétion clonale, l'anergie, l'ignorance et la régulation ou suppression. La figure 7 illustre la description de ces différents mécanismes.

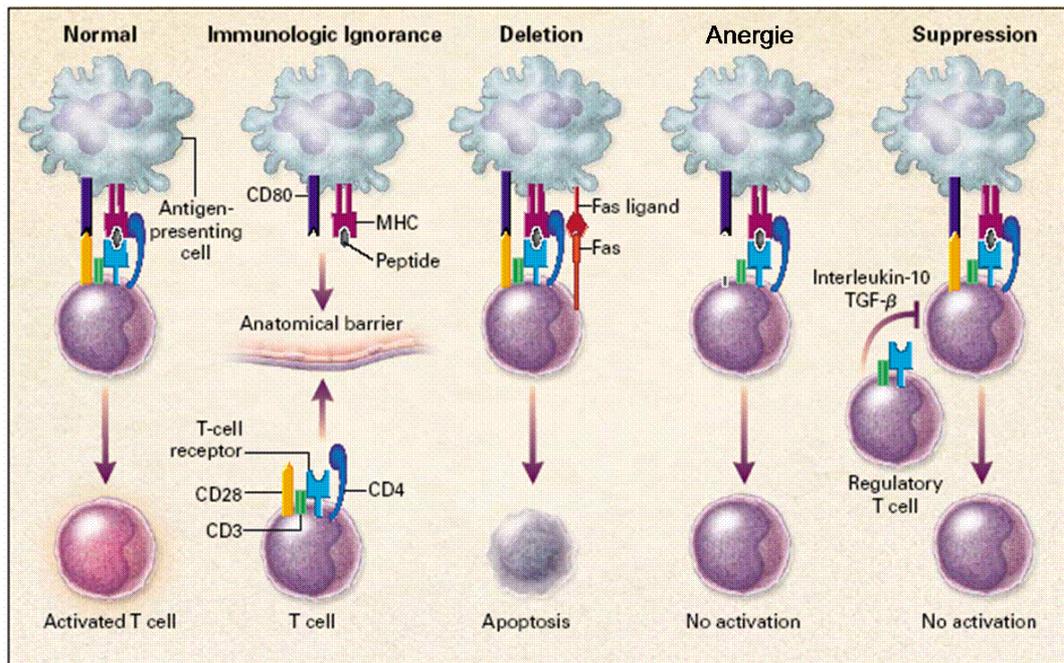


Figure 7 : Mécanismes périphériques de l'induction de tolérance (Mackay 2000).

2.1 La délétion

Nous avons vu que les mécanismes de tolérance centrale permettent d'éliminer les cellules autoréactives dans le thymus, avant leur maturation. La délétion des cellules T peut également avoir lieu à la périphérie, lorsque celles-ci rencontrent l'antigène dans des conditions particulières (Kabelitz et al. 1993). Deux situations peuvent aboutir à la mort des cellules T : soit un défaut de signaux de survie, par exemple en l'absence de facteurs de croissance comme l'IL-2 (Steller 1995), soit une activation trop importante. Ce deuxième mécanisme est nommé « mort cellulaire induite par l'activation » (AICD), et fait intervenir principalement le système Fas/FasL (Brunner et al. 1995). En transplantation les mécanismes de délétion périphérique des lymphocytes alloréactifs sont envisagés comme un moyen très efficace pour obtenir un état de tolérance durable (Li et al. 1999; Wells et al. 1999).

2.2 L'anergie

L'activation efficace d'un lymphocyte T naïf requiert la transduction de deux types de signaux distincts faisant intervenir le récepteur pour l'antigène et les récepteurs de costimulation. L'activation d'un lymphocyte T uniquement par la voie du récepteur en l'absence de transduction de signaux de costimulation, induit un état d'anergie qui se traduit par une inactivation de ses capacités fonctionnelles et prolifératives et où il devient réfractaire à une restimulation antigénique (Lechler et al. 2001; Schwartz 2003). Suite à une anergie, les lymphocytes ont une durée de vie plus courte et meurent par apoptose.

2.3 L'ignorance

Le terme d'ignorance s'applique à une situation dans laquelle des cellules T potentiellement réactives ne répondent pas à une stimulation antigénique. Ces cellules ne sont pas inactivées, ce qui les différencie des cellules anergiques, mais elles ignorent l'antigène (Miller et al. 1990). L'ignorance concerne des sites « privilégiés », tels que l'œil ou le système nerveux central (Barker et al. 1977), où l'antigène ne sera pas accessible aux cellules T réactives ou pas présenté par les CPA. Elle peut aussi être due à une faible concentration des antigènes, qui les rend invisibles aux cellules T (Kurts et al. 1999).

2.4 La régulation ou suppression

Contrairement aux autres mécanismes de tolérance centrale et périphérique, il s'agit d'un processus actif dans lequel une population de cellules contrôle ou régule l'activité d'une autre population. En 1985, le groupe de Hall a montré que l'état de tolérance allogénique pouvait être transféré à des receveurs naïfs par l'injection de cellules T CD4⁺ CD25⁺ dérivant d'animaux tolérants (Hall et al. 1985), fournissant ainsi la première démonstration du caractère actif de la suppression.

La suppression est réalisée par des cellules régulatrices. De nombreux types de cellules régulatrices ont été décrits, certains présents de façon naturelle dans l'organisme, et d'autres pouvant être induits dans des conditions de stimulations particulières. Les principales cellules régulatrices décrites sont les cellules T CD4⁺, mais les cellules régulatrices ont également été décrites dans la population T CD8⁺ et dans d'autres types cellulaires, comme les cellules NKT et les cellules T $\gamma\delta$ (Jameson et al. 2003; Van Kaer 2004).

2.4.1 Les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺

C'est la principale population décrite pour ses fonctions régulatrices. Elles ont d'abord été mises en évidence chez la souris (Sakaguchi et al. 1995) puis plus récemment chez

l'Homme (Dieckmann et al. 2001; Jonuleit et al. 2001). Un déficit quantitatif et/ou qualitatif de ces cellules est associé à des pathologies autoimmunes chez l'animal (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995; Suri-Payer et al. 1998) comme chez l'homme (Sakaguchi 2003; Ehrenstein et al. 2004; Kriegel et al. 2004; Viglietta et al. 2004). Ces cellules régulatrices ont surtout pour fonction de maintenir la tolérance au soi mais leur rôle a été évoqué dans la tolérance en transplantation. On distingue actuellement des cellules T régulatrices (Tregs) CD4⁺CD25⁺ «naturelles» et «induites» (pour revue (Jonuleit et al. 2003; Cottrez et al. 2004; Sakaguchi 2004; Walsh et al. 2004)).

2.4.1.1 Les cellules T régulatrices «naturelles» CD4+CD25+

2.4.1.1.1 Origine

Elles proviennent du thymus et représentent 5 à 10% des thymocytes CD4⁺CD8⁻ (Wing et al. 2002) et près de 10% des lymphocytes TCD4⁺ en périphérie mais leur nombre diminue avec l'âge (Tsaknaridis et al. 2003).

Chez la souris, l'apparition des Tregs se fait dans le thymus après la naissance. Une thymectomie néonatale entre les jours 2 et 3 après sa naissance provoque l'apparition de maladies auto-immunes telles que l'anémie hémolytique, la gastrite, la thyroïdite, ou l'orchite (Yunis et al. 1967; Kojima et al. 1976; Kojima et al. 1980; Taguchi et al. 1980; Kojima et al. 1981; Taguchi et al. 1981; Tung et al. 1987). L'injection de T CD4+CD25+ de la périphérie d'une souris adulte permet de prévenir l'apparition de ces maladies (Asano et al. 1996). L'apparition de Tregs paraît tardive. Il y a une très faible présence de T CD25+ en périphérie à J3 (Asano, Toda et al. 1996), et on observe une réduction très importante des T CD4+CD25+ chez les animaux thymectomisés à J3 (Dujardin et al. 2004). Cependant, les mécanismes précis de sélection des Tregs ne sont pas clairement définis.

Les Tregs sont sélectionnées non seulement pour leur reconnaissance des molécules du CMH du soi mais aussi pour une affinité assez forte envers le complexe [CMH-antigène du soi] (Jordan et al. 2001; Jonuleit and Schmitt 2003). Le TCR joue un rôle important dans leur différenciation. Les souris transgéniques pour le TCR, déficientes en protéine Rag (responsable du réarrangement des gènes du TCR), ne produisent pas de Tregs alors que les souris non déficientes en produisent (Lafaille et al. 1994; Olivares-Villagomez et al. 1998).

Les molécules de costimulation sont également très importantes dans le développement des ces cellules. La quantité des Tregs est très diminuée dans les souris KO en CD28 ou B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) (Salomon et al. 2000; Tang et al. 2003). Ce déficit est dû à un effet

direct sur la production intra thymique des Tregs et de la sécrétion d'IL2 en périphérie produit par les T non régulateurs en absence des interactions CD28-CD80 et CD28-CD86 (Jenkins et al. 1991; Tang, Henriksen et al. 2003).

Il a été décrit chez l'homme, un rôle actif des corpuscules d'Hassall, dans la génération des Tregs (Watanabe et al. 2005). En sécrétant de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), les corpuscules d'Hassall activeraient les cellules dendritiques thymiques CD11c⁺ en les faisant exprimer fortement CD80 et CD86 et le CMH II. Une fois activées, ces cellules dendritiques CD11c⁺ permettraient de différencier des cellules T CD4⁺CD8⁻CD25⁻ en Tregs CD4⁺CD25⁺.

Le TGF- β induit des fonctions régulatrices chez les T CD4⁺CD25⁻ lors d'une stimulation du TCR et d'une costimulation du CD28 in vitro (Chen et al. 2003; Fantini et al. 2004; Fu et al. 2004), mais in vivo ne paraît pas indispensable pour le développement intra thymique des Tregs (Piccirillo et al. 2002).

Les souris déficientes en IL-2 ou en IL-2R souffrent de désordres auto-immuns. Mark et al. ont montré que l'expression restreinte au niveau du thymus de la chaîne β du récepteur à l'IL-2, dans un modèle de souris KO pour cette chaîne est suffisante pour éviter une maladie auto-immune fatale (Malek et al. 2000; Malek et al. 2002), ce qui démontre le rôle actif de l'IL-2 dans le développement thymique des Tregs.

2.4.1.1.2 Phénotype

Il n'existe pas de marqueur phénotypique discriminant permettant d'identifier précisément ces cellules (Stephens et al. 2000). Le CD25, correspondant à la chaîne α du récepteur à l'IL-2, est inducible après l'activation d'un lymphocyte CD4⁺ naïf et ne permet donc pas de distinguer une cellule activée d'une cellule régulatrice. Chez l'homme, les cellules exprimant fortement le CD25 (CD25^{hi}) possèderaient des propriétés suppressives (Baecher-Allan et al. 2001), alors qu'un niveau d'expression intermédiaire correspondrait aux cellules activées, mais cette distinction n'est pas absolue (Tsaknaridis, Spencer et al. 2003). Elles expriment par ailleurs fréquemment les marqueurs CD45RO (marqueur « mémoire ») (Baecher-Allan, Brown et al. 2001), CD122 (chaîne β du récepteur de l'IL-2) (Wing, Ekmark et al. 2002), CD62L (L-sélectine). Elles sont caractérisées également par une expression constitutive de CTLA-4 (CD152, ligand « régulateur » des molécules de costimulation B7) et de GITR (Glucocorticoid-Induced- TNF-R) (McHugh et al. 2002; Tsaknaridis, Spencer et al. 2003). Le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3) est également un marqueur de ces cellules régulatrices (Sakaguchi 2003). Il jouerait un rôle dans la génération des cellules CD4⁺CD25⁺ au niveau thymique, mais interviendrait également dans les fonctions

suppressives (Fontenot et al. 2003). Cependant, des travaux récents montrent que l'expression de FoxP3 n'est pas limitée aux seules cellules régulatrices chez l'Homme, il semble être également un marqueur retrouvé sur des cellules activées (Morgan et al. 2005). Contrairement à la souris (Fontenot, Gavin et al. 2003), et le rat (Heslan et al. 2005) (article en annexe), pour lesquels FoxP3 n'est pas induit lors de l'activation des cellules T. De plus, l'hème oxygénase 1 (HO-1) est exprimée constitutivement par les cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Pae et al. 2003). Il semblerait que ce soit FoxP3 qui induirait l'expression de HO-1, qui interviendrait ensuite dans le mécanisme de suppression de ces cellules (Choi et al. 2005).

Très récemment Seddiki et al ont montré que chez l'homme, le CD127 (Chaîne α du récepteur à l'IL7) était très faiblement exprimé par les Tregs CD4⁺CD25⁺RA⁺ périphériques, alors qu'il est fortement exprimé à la surface des cellules T mémoire CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺, (Seddiki et al. 2006). L'expression du CD127 est en corrélation inverse de celle de FoxP3 dans les Tregs CD4⁺ (Liu et al. 2006). Ce nouveau marqueur paraît très intéressant pour discriminer de façon plus efficace les Tregs chez l'homme. Cependant, il a été observé chez la souris qu'en dépit d'une faible expression du CD127 par les Tregs, cette expression reste trop importante pour être utilisée comme critère de séparation vis-à-vis des autres populations T (Gavin et al. 2002; Cozzo et al. 2003).

2.4.1.1.3 Mécanismes d'action

Ces cellules sont activées par leur TCR (Sanchez-Fueyo et al. 2006) et nécessite l'IL-2 pour exercer leurs propriétés suppressives (Thornton et al. 2004). Par la suite, leur action suppressive n'est pas dépendante de l'antigène qui les a stimulées. Cette action régulatrice s'exerce en inhibant la transcription d'IL-2 dans les autres cellules T et elle nécessite un contact cellulaire (Thornton et al. 1998; Dieckmann, Plottner et al. 2001). Après leur activation, les cellules régulatrices produisent du TGF- β (Levings et al. 2002), un peu d'IL-10 et d'IL-4 (Dieckmann, Plottner et al. 2001; Stephens et al. 2001). Cependant, l'action suppressive ne dépend pas directement de la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 et le TGF- β puisque par exemple un anticorps anti-IL-10 n'annule pas l'effet supprimeur (Suri-Payer et al. 2001; Piccirillo, Letterio et al. 2002; Camara et al. 2003; Trzonkowski et al. 2004). En plus de l'action sur les autres lymphocytes CD4⁺, les Lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ inhibent la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules NK (Trzonkowski, Szmit et al. 2004), des cellules TCD8⁺ (Camara, Sebille et al. 2003; Trzonkowski, Szmit et al. 2004), des cellules NKT (Azuma et al. 2003), des monocytes-macrophages (Taams et al.

2005), les lymphocytes B (Zhao et al. 2006) et la maturation des cellules dendritiques (Misra et al. 2004).

2.4.1.2 Les cellules T régulatrices «induites»

Deux populations cellulaires principales parmi les CD4⁺ ont été décrites : les cellules Th3 (Chen, Kuchroo et al. 1994) et les cellules Tr1 (Groux et al. 1997). Leur mode d'action ne dépend pas du contact cellulaire, comme les cellules T régulatrices naturelles, mais est lié à l'action de cytokines, TGF- β pour les cellules Th3 (Chen, Kuchroo et al. 1994) et IL-10 pour les cellules Tr1 (Foussat et al. 2003; Groux 2003).

Ces cellules ne sont pas caractérisées par des marqueurs phénotypiques spécifiques. FoxP3 semble induit lors de la conversion des cellules CD4⁺CD25⁻ en CD4⁺CD25⁺ aux propriétés régulatrices par le TGF- β (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori et al. 2003; Walsh, Taylor et al. 2004), mais FoxP3 n'est pas exprimé dans les cellules Tr1. Les cellules dendritiques immatures peuvent également générer ces cellules régulatrices «acquises» (Jonuleit and Schmitt 2003). Ce phénomène a également été observé après stimulation par des cellules dendritiques plasmacytoïdes matures (Verhasselt et al. 2004) ou immatures (Wakkach et al. 2003).

Les cellules régulatrices semblent pouvoir induire elles-mêmes d'autres cellules régulatrices. Des clones T allo-réactifs pourraient être régulés par des cellules T régulatrices de même spécificité si l'allo-antigène est présenté par la même cellule présentatrice d'antigènes (Davies et al. 1996; Walsh, Taylor et al. 2004). Ils deviennent à leur tour eux-mêmes régulateurs, via l'action de cytokines comme l'IL-10 ou le TGF- β . Les cellules régulatrices peuvent donc «transmettre» leurs propriétés régulatrices. C'est probablement ce mécanisme qui est en jeu dans la «tolérance infectieuse» qui permet le transfert d'une tolérance d'allogreffe d'un receveur tolérant à un deuxième receveur sans autre traitement immunosuppresseur, uniquement par transfert de cellules (Qin et al. 1993).

2.4.1.3 Implications des cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺ dans la tolérance en allotransplantation

Les cellules CD4⁺CD25⁺ décrites ci-dessus ne sont pas seulement impliquées dans le maintien de la tolérance au soi, même si cela reste leur fonction principale. Elles sont également retrouvées dans des modèles de tolérance en transplantation. Ceci est suggéré dès 1985 car des cellules « régulatrices » sont mises en évidence dans le pool de cellules CD4⁺ après une greffe cardiaque chez le rat « tolérant ». Ces cellules CD4⁺ peuvent

transférer la tolérance à un deuxième receveur (Hall, Jelbart et al. 1985). Par la suite, différents travaux ont montré que les cellules CD4⁺CD25⁺ étaient indispensables pour l'induction et/ou le maintien de la tolérance aux allo-antigènes dans certains modèles chez les rongeurs (Zhang et al. 2000; Hara et al. 2001; Taylor et al. 2001; Chiffolleau et al. 2002). Ces cellules T régulatrices sont générées au niveau des organes lymphoïdes secondaires et sont présentes dans le greffon puisque les cellules infiltrantes peuvent transférer la tolérance dans un modèle de greffe de peau (Graca et al. 2002) et de cœur (Heslan, Beriou et al. 2005) (article en annexe).

Le rôle de ces cellules régulatrices a encore été démontré par la rupture de tolérance ou par l'accélération de la survenue du rejet lors de greffe de peau si les cellules CD4⁺CD25⁺ sont déplétées chez le receveur avant la greffe (Benghiat et al. 2005).

2.4.1.4 Les autres cellules régulatrices

Les cellules suppressives CD8⁺CD28⁻ reconnaissent les molécules du CMH de classe I exprimées par les CPA et entraîneraient leur différenciation en CPA tolérogènes (Liu et al. 1998) en induisant notamment ILT3 et ILT4 (Cortesini et al. 2001; Chang et al. 2002). Elles inhibent également l'expression de CD40-Ligand à la surface des lymphocytes CD4⁺ helper (Ciubotariu et al. 1998). Les CPA ne peuvent donc plus activer complètement le lymphocyte TCD4⁺, les voies de costimulation étant inhibées. Elles induisent ainsi leur anergie (Jiang et al. 2004). Ces cellules suppressives expriment FoxP3 (Manavalan et al. 2004). Une augmentation du nombre de ces cellules CD8⁺CD28⁻ est observée chez des sujets transplantés cardiaques par rapport à des sujets normaux non greffés, et cette population cellulaire ne présente pas de cytotoxicité envers les antigènes du donneur (Colovai et al. 2003). Plus récemment, ces cellules régulatrices CD8⁺CD28⁻ ont été retrouvées après transfusions spécifiques du donneur chez le rat (Liu et al. 2004).

Certaines cellules NKT semblent avoir un rôle régulateur notamment pour la prévention des maladies auto-immunes, à médiation Th1 (Jiang and Chess 2004; Van Kaer 2004). Elles semblent également impliquées dans des modèles de tolérance en allo-transplantation, notamment dans la tolérance néonatale (Kawamura et al. 2002), lors du blocage de la costimulation (Seino et al. 2001) ou après un traitement non-myéloablatif et une greffe de moelle osseuse chez la souris (Higuchi et al. 2002). Chez l'homme, les cellules NKT auraient également des propriétés régulatrices, et des déficits quantitatifs et/ou qualitatifs ont été corrélés à certaines pathologies auto-immunes, comme la sclérose en plaques (Araki et al. 2003) et le diabète (Wilson et al. 1998). Les cellules T doubles négatives TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁻CD8⁻ représentent chez l'homme environ 1% des lymphocytes CD3⁺. Elles peuvent réguler l'action

de cellules T spécifiques d'un antigène donné chez l'Homme (Fischer et al. 2005). En transplantation, elles sont impliquées dans la tolérance après Transfusion spécifique du donneur (TSD) dans des modèles de greffe de peau (Young et al. 2002) et de cœur (Chen, Ford et al. 2003) chez la souris en entraînant la délétion de clones CD8⁺ allo-réactifs.

II La recherche des gènes différentiellement exprimés

Durant ces dix dernières années, des révolutions techniques ont changé notre façon d'aborder l'étude du vivant. Cette évolution a été très forte dans le domaine de la biologie moléculaire, et notamment pour l'étude de l'expression du génome.

Le terme génomique proposé par Thomas H. Roderick en 1986, caractérise la cartographie, le séquençage et l'analyse du génome. Cette analyse peut être menée en deux étapes : la génomique structurale et la génomique fonctionnelle. La génomique structurale est la phase initiale de l'analyse du génome. Cette approche a pour but d'établir les cartes physiques et génétiques, ainsi que les cartes des transcrits d'un organisme. La génomique fonctionnelle aussi appelée post-génomique a pour objectif d'étudier le fonctionnement des gènes. Plusieurs approches complémentaires peuvent être utilisées à cette fin. On pourra notamment étudier les régulations au niveau transcriptionnel et traductionnel, ou encore supprimer (Knock out) ou induire (Transgénique) l'expression d'un gène pour en observer les conséquences.

Dans cette partie je discuterai des enjeux du passage de la génomique structurale à la post-génomique et de l'importance de l'étude de l'expression transcriptionnelle des gènes dans ce processus. Je m'attacherai ensuite à faire le point sur les différents outils disponibles afin d'étudier l'expression différentielle des gènes, étant donné que nous avons choisi cette approche pour l'étude de nos modèles animaux. Je discuterai ensuite des perspectives réservées à ces techniques et de l'évolution de la post-génomique.

A. De la génomique structurale à la post-génomique : utilité de l'étude de l'expression transcriptionnelle

En 2001, le séquençage complet du génome humain (McPherson et al. 2001; Venter et al. 2001) a marqué une avancée scientifique spectaculaire. Pourtant, ce n'était pas un aboutissement, mais seulement une première étape vers la connaissance de notre génome. Le séquençage ne sert finalement qu'à délimiter et répertorier des fragments d'ADN. L'objectif ultime est de déterminer la fonction de ces fragments, leurs interactions et dans quelle mesure leurs altérations peuvent être pathologiques dans les cellules où ils s'expriment.

Si ces fragments d'ADN correspondent à des gènes alors ils codent pour des protéines, certains codant pour des ARN fonctionnels ne sont pas traduits en protéines, tandis que d'autres interviennent dans la régulation de l'expression des gènes, la réplication de l'ADN ou le maintien de la structure des chromosomes. La connaissance de la séquence d'un génome permet de déduire les séquences des ARN messagers (ARNm), les séquences régulatrices et les séquences protéiques correspondant aux séquences codantes. Elle peut aussi également renseigner sur leurs fonctions. Mais elle ne renseigne en aucun cas sur leur niveau d'expression dans tel ou tel type cellulaire, des modifications que peuvent subir les transcrits, et qui font qu'un seul gène peut coder pour des dizaines de protéines différentes.

La séquence d'un génome ne prédit pas non plus les modifications chimiques que peut subir une protéine, et qui influencent sa fonction.

C'est pour répondre à ces interrogations que les scientifiques ont développé de nouveaux outils pour aller au delà de la génomique structurale, vers la génomique fonctionnelle et la post-génomique. Ce nouveau domaine permet de déterminer quelles sont les séquences actives à l'échelle d'un organisme, d'un tissu ou même d'une cellule, à un moment donné de leur fonctionnement, de déterminer les fonctions de milliers de gènes et des protéines correspondantes, de placer les molécules dans une logique fonctionnelle, dans des voies métaboliques caractéristiques des types cellulaires d'un organisme.

A l'utilisation habituelle de la «Real Time Polymerase Chain Reaction» (Real Time PCR), du RNA protection assay, ou du Northern Blot, qui sont des techniques dédiées à l'étude d'un ou de quelques gènes, s'est ajouté le développement des techniques à haut débit comme les puces à ADN, ou le « Serial Analysis of Gene Expression » (SAGE) qui permettent d'étudier parallèlement plusieurs milliers de gènes. L'analyse de cette grande quantité de données nécessite une puissance informatique, des statistiques, ainsi que des outils bioinformatiques tels que des algorithmes et des bases de données adaptées.

Pour décoder le lien qui existe entre les séquences d'ADN et des fonctions biologiques, la première étape consiste à analyser les séquences exprimées dans un tissu donné en s'intéressant aux ARNm. La génomique fonctionnelle regroupe différentes méthodes qui permettent de comparer l'expression des ARNm entre plusieurs situations biologiques différentes.

B. Les différentes méthodes de recherche de gènes différentiellement exprimés

Il est possible d'aborder la recherche de gènes différentiellement exprimés, entre deux situations biologiques différentes, de deux manières différentes. On peut quantifier l'expression d'un ensemble de gènes connus et comparer les résultats obtenus. Ce sera le cas avec des techniques comme la PCR ou les puces à ADN. Ou alors, on peut isoler d'une manière globale, les gènes connus et inconnus, ayant une expression différentielle, sans s'attacher aux gènes non différentiels. Ce sera le cas avec le differential display ou l'HSS.

Au cours de cette partie, j'aborderai les différentes techniques de criblage de gènes différentiels, ainsi que les différentes techniques d'étude, à grande échelle ou exhaustives, de l'expression différentielle des gènes.

1. Les méthodes de criblage de l'expression différentielle des gènes

1.1 Le « Differential Display »

Le "Differential Display" permet d'isoler des ARNm sur-exprimés ou sous-exprimés entre deux ou plusieurs situations (Liang et al. 1992). Le principe de cette méthode est exposé dans la figure 8.

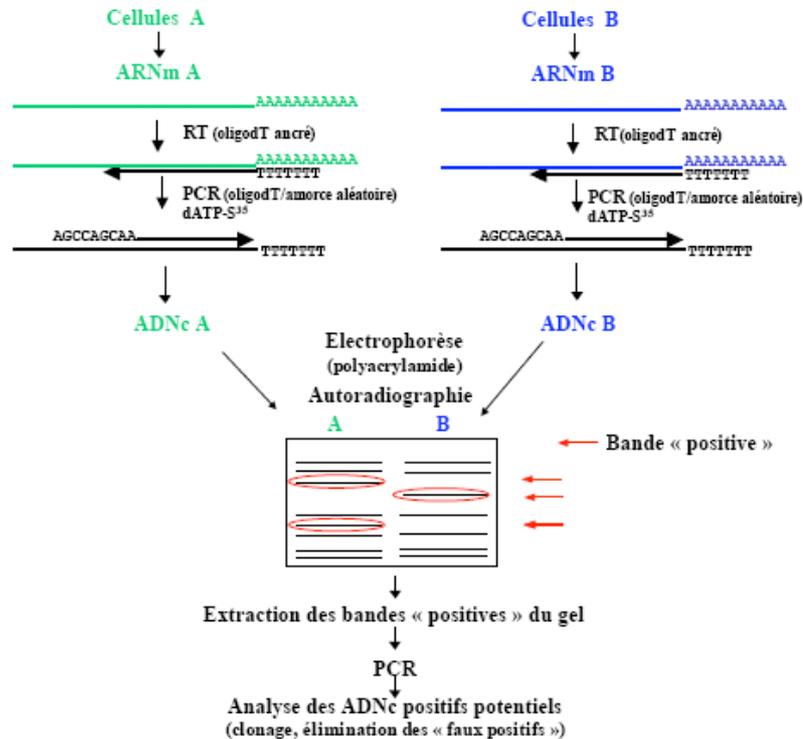


Figure 8 : Principe du différentiel display (Source internet auteur inconnu).

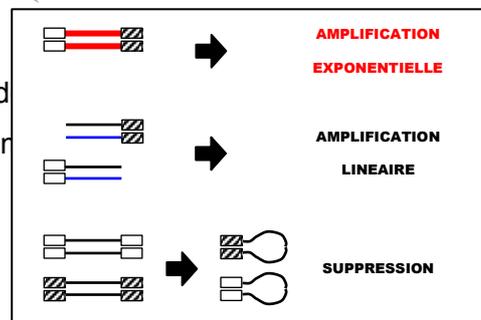
Le differential display est une technique qui consiste à amplifier et radio-marquer par PCR, de façon aléatoire, des portions d'ARNm préalablement rétrotranscrits en ADNc. Les primers utilisés lors de la PCR ont des séquences aléatoires qui s'hybrident de manière peu spécifique. De cette façon, une grande partie des ARNm du génome est amplifiée. Les produits de PCR sont alors soumis à une électrophorèse puis à une autoradiographie. Les ADNc possédant un profil d'expression différent entre les deux situations peuvent être excisés du gel, réamplifiés par PCR, clonés puis séquencés.

L'intérêt essentiel de cette méthode réside dans la possibilité de comparer plusieurs populations d'ARNm de façon simultanée. L'utilisation du « Differential Display » a permis à notre équipe d'identifier des molécules jusqu'ici non décrites dans les greffons rejetant ou tolérant par DST (Chimoleau et al. 2000). Cependant, en raison du grand nombre de faux positifs générés par cette technique et du manque d'information fourni par les séquences, souvent dans la région 3' UTR, notre équipe a décidé de changer de méthode d'analyse de l'expression différentielle des gènes.

1.2 L'hybridation soustractive

L'hybridation soustractive est une méthode pour enrichir les gènes différentiellement exprimés.

1^{ère} → 2^{ème} PCR ("Nested")



années 60
RNm du

phage T4 (Bautz et al. 1966). L'HS a également été à l'origine de la découverte de nombreuses molécules clés du système immunitaire. On peut citer notamment le clonage du TCR en 1984, identifié comme spécifique des lymphocytes T comparés aux B (Hedrick et al. 1984). Cette technique a été grandement améliorée par l'intégration de l'amplification des cibles par PCR, rendant alors possible l'analyse de plus petites quantités d'ARN et diminuant le nombre de faux-positifs (Duguid et al. 1990; Hara et al. 1991; Lisitsyn et al. 1993; Hubank et al. 1994). Diatchenko et al. ont finalement introduit des étapes de normalisation et de suppression durant la PCR afin d'augmenter significativement la probabilité d'obtenir des ADNc d'intérêt, même de faible abondance (Diatchenko et al. 1996). Les gènes différentiels peuvent alors être enrichis plus de 1000 fois. La technique est appelée Hybridation Soustractive Suppressive (HSS), et est utilisable plus facilement depuis la commercialisation d'un kit regroupant tous les réactifs nécessaires ainsi que des contrôles (*Clontech*). Son principe est détaillé dans la figure 9. Cette méthode requiert ensuite un système de criblage des clones générés afin de limiter leur séquençage (Jin et al. 1997).

Figure 9 : Principe de l'hybridation Soustractive Suppressive (HSS).

L'HSS est une méthode de clonage des gènes différentiellement exprimés. Après une rétrotranscription en ADNc double brin et une digestion en fragments d'environ 500 pb, on définit le pool d'ADNc dont on cherche les transcrits spécifiques (en rouge dans la figure) comme SONDEUR. L'autre pool sert de référence et est appelé MENEUR. La première hybridation consiste à saturer (*), par le meneur, deux portions séparées du sondeur auxquelles ont été ajoutés des adaptateurs différents. Ces deux portions sont ensuite réunies, en présence d'une saturation du meneur. Les extrémités des adaptateurs sont élonguées en double brin. Deux PCR successives sont alors réalisées avec des amorces spécifiques des adaptateurs. Les hybrides qui possèdent un seul adaptateur, représentant les fragments d'ADNc communs au sondeur et au meneur, seront amplifiés linéairement. Les hybrides avec des adaptateurs identiques aux deux extrémités subiront le processus de suppression et ne seront donc pas amplifiés. En effet, chaque brin se replie sur lui-même par les séquences complémentaires de l'adaptateur, ce qui empêche les amorces d'accéder à leurs sites spécifiques. La majorité des ces hybrides proviennent de fragments du sondeur, présents aussi dans le meneur, mais qui n'ont pas été saturés et qui se sont donc appariés sur eux-mêmes. Enfin, seules les molécules portant deux adaptateurs différents seront amplifiées exponentiellement. Elles représentent des transcrits présents uniquement, ou sur-exprimés, dans le pool sondeur.

C'est une technique développée, par la société ExonHit, pour détecter les variations d'épissage des ARNm entre différentes conditions pathologiques ou cellulaires

(Schweighoffer et al. 2000). Cette technologie fournit une méthode rapide pour la génération de banques relevant uniquement des événements d'épissage alternatif. DATAS identifiera ainsi les variations qualitatives des ARNm (conservation d'intron, suppression d'exon, etc.), alors que les autres techniques sont conçues pour caractériser la sur-expression ou la sous-expression des gènes. Le principe de cette technique est exposé dans la figure 10.

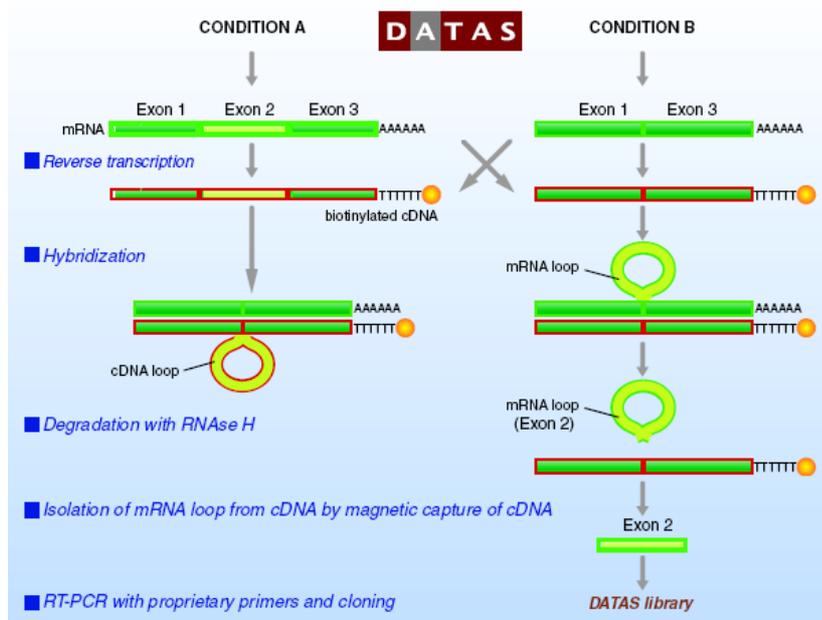


Figure 10 : Principe du Differential Analysis of Transcripts with Alternative Splicing (DATAS) (www.exonhit.com). DATAS est réalisée en hybridant les ADNc d'une population, avec l'ARNm d'une seconde population. La combinaison est réalisée dans les deux sens pour permettre de détecter les changements des deux conditions. L'ADNc est produit en utilisant une amorce d'oligonucléotides biotinylées, qui permet la purification des hétéroduplexes avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Ces hétéroduplexes sont alors traités avec de la RNase H pour exciser les portions d'ARNm non hybridées. Ces fragments d'ARNm libérés sont alors isolés, rétrotranscrits, amplifiés et clonés dans des banques. Le séquençage des clones donne alors des informations, non seulement sur l'identification des gènes ayant subi un épissage alternatif, mais aussi sur la partie du gène épissé.

Ces méthodes de criblage différentiel de gènes permettent donc d'étudier les épissages alternatifs (DATAS), ainsi que les gènes faiblement exprimés (SSH), mais ne sont pas exhaustives. La masse d'information de données générées par le séquençage et l'annotation du génome a permis le développement de techniques d'analyse globale de l'expression différentielle des gènes.

2. Les méthodes à haut débit d'analyse de l'expression différentielle des gènes

2.1 Les cartes microfluidiques

Les cartes microfluidiques ont été développées par la société Applied Biosystems. Le principe de cette technique est de comparer les variations d'expression de gènes d'intérêt au niveau transcriptionnel. Cette technique est identique à la PCR quantitative en temps réel (Cf. Matériel et méthode en Annexe). Les amorces sont organisées dans une plaque de 384 puits. La particularité de ces plaques est qu'elles possèdent un système de capillaires qui relie les puits à un réservoir principal. Les réactifs et les ADNc sont déposés dans ce réservoir et une centrifugation permet la distribution de ces derniers dans les puits. Les données sont alors analysées comme une RT-PCR classique. En parallèle du développement de cette technique, la société Applied Biosystems a développé une collection de sondes permettant de quantifier la quasi-totalité des gènes de souris, de rat et d'homme.

L'avantage principal de cette technologie est sa sensibilité. Elle est souvent utilisée pour valider les résultats des puces à ADN et détecte des variations ou un seuil d'expression plus faible que ceux mis en évidence avec les puces. Cette technologie est aussi intéressante, par la modularité « à façon », et le fait qu'elle n'utilise que peu de matériel.

2.2 Le criblage électronique

Le criblage électronique est une méthode qui consiste à rétrotranscrire les ARNm extraits à partir d'un tissu ou de cellules d'une situation biologique, à les cloner, puis à les séquencer en grande quantité. Pour chaque situation il faut alors réaliser 1000 à 3000 séquences, afin que les ARNm ayant une faible prévalence puissent être détectés. L'avantage de cette méthode est que les données ainsi obtenues sont réutilisables. Par contre, comme le nombre de séquences à réaliser est très important, l'utilisation de cette méthode est réservée à de grandes structures telles que des laboratoires pharmaceutiques. Aujourd'hui, avec l'amélioration de techniques moins « lourdes », le criblage électronique représente surtout un intérêt pour l'étude d'organismes peu étudiés, non séquencés, pour lesquels l'utilisation des puces à ADN ou du SAGE n'est pas possible.

2.3 Le SAGE

Le SAGE (serial analysis of gene expression) est une méthode qui permet une analyse de la fréquence d'un ARN messager parmi les milliers produits dans une cellule à un moment donné (Velculescu et al. 1995). Cette méthode est une amélioration du criblage électronique. La technique repose sur l'idée qu'une séquence de 9 ou 10 nucléotides, suffit à constituer une étiquette (tag) caractéristique de chacun des ARNm d'une cellule. Son principe est

illustré dans la figure 11. Cette technique très employée, était cependant limitée par la quantité importante d'ARNm nécessaire, ce qui la rendait peu fonctionnelle lorsque l'on travaille avec de petits échantillons. Récemment, des modifications y ont été apportées pour en améliorer le rendement et permettre de diminuer la quantité de matériel de départ. Le micro-SAGE et le SADE (Adaptation for Downsized Extracts), ont permis de réduire de mille fois la quantité de matériel nécessaire, ce qui rend maintenant cette technique utilisable pour des échantillons de petite taille comme des biopsies. Malgré cela, la sensibilité du SAGE reste problématique pour des gènes faiblement exprimés. Un autre facteur limitant de cette méthode, est qu'il est nécessaire que le séquençage de l'organisme étudié soit très avancé afin de limiter au maximum le nombre de tags non identifiés par rapport à leur gène.

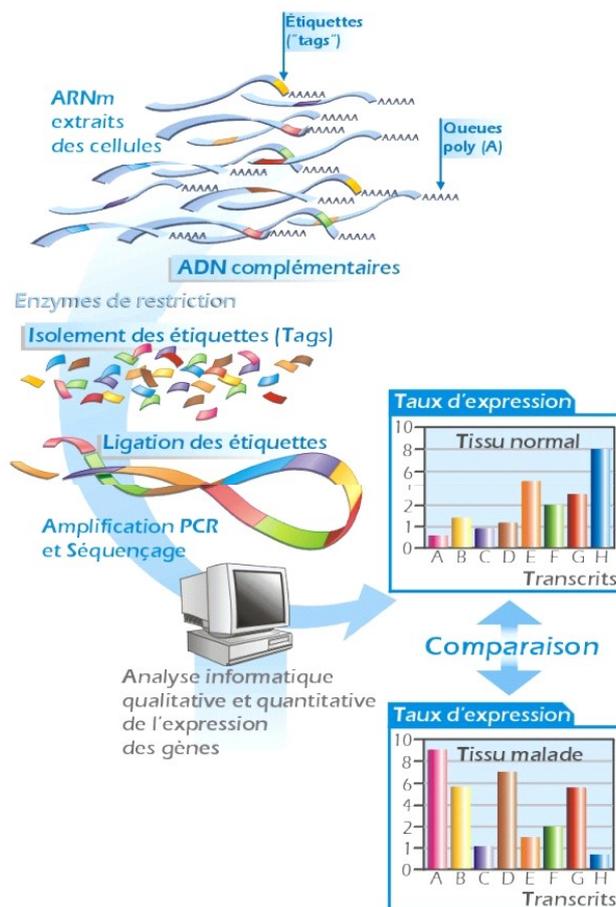


Figure 11 : Principe du SAGE (Source internet, auteur inconnu).

Après avoir été extraits, les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc et sont digérés en fragments de 9 à 10 nucléotides (tags). Ces étiquettes, isolées grâce à l'action d'enzymes de restriction, sont liées bout à bout, en série, formant une longue molécule d'acide nucléique qui peut être clonée, amplifiée par PCR et séquencée. Grâce à l'analyse informatique, le niveau d'expression d'un ARN messager particulier dans la cellule étudiée est alors donné par le nombre de fois où l'étiquette correspondante est détectée.

2.4 Les macroarrays, les puces à ADN et à oligonucléotides

L'objectif de ces technologies est d'étudier de manière simultanée l'expression d'un nombre de gènes allant jusqu'à plusieurs dizaines de milliers. Le principe utilisé par ces techniques est le même et est illustré par la figure 12. Entre ces différentes techniques, le système de marquage des « cibles » diffère. Ainsi pour les macroarrays, on utilisera un isotope radioactif (le P33), alors que pour les microarrays, on utilisera le plus souvent des marqueurs fluorescents de type cyanine.

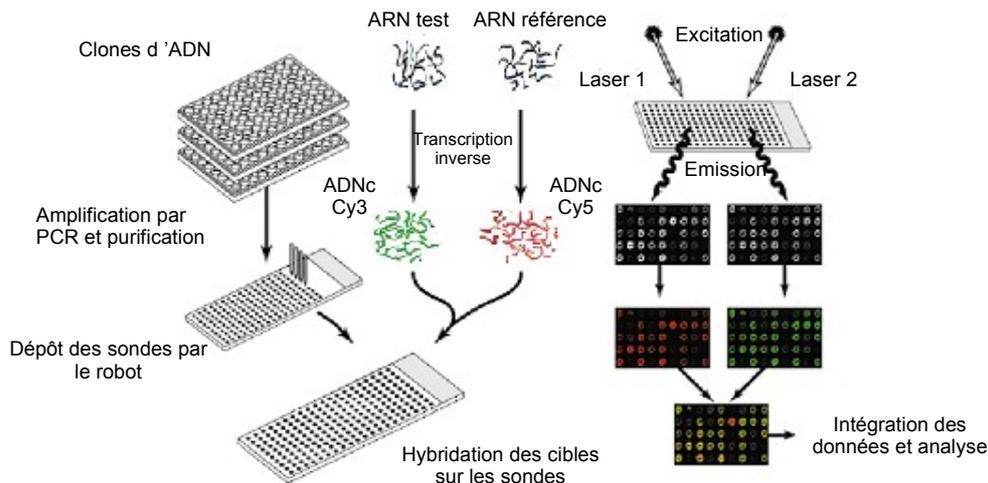


Figure 12 : Principe de fonctionnement des puces à ADN. (Adapté de Duggan et al., 1999).

Les puces à ADN permettent d'étudier parallèlement l'expression de plusieurs milliers de gènes. De très nombreuses sondes moléculaires connues (oligonucléotides ou ADNc) sont fixées sur une surface de quelques centimètres carrés, de manière ordonnée sous formes d'unités d'hybridation (spots), par des pointes métalliques équivalentes à des micro-pipettes (spotter). Ces sondes correspondent à un panel de gènes dont on veut analyser le niveau d'expression dans des situations biologiques données. Deux populations de cibles venant de deux situations biologiques différentes, sous la forme d'ADNc, vont être couplées à des fluorochromes différents (la cyanine 5 et la cyanine 3). La mise en présence des séquences cibles marquées et des sondes conduit à la formation par hybridation de duplexes selon la règle d'appariement définie par Watson et Crick. Les deux populations de cibles étant déposées en même temps sur la puce, elles rentrent en compétition pour s'hybrider avec les différentes sondes. L'expression d'un gène dans une situation donnée est donc en corrélation directe avec la quantité de fluorochrome présent sur le spot correspondant. Après une étape de lavage, la puce est lue à l'aide d'un scanner, ce qui va permettre l'enregistrement d'une image. Il en suit des étapes d'extraction de données, de normalisation, puis une analyse statistique des données. C'est à ce niveau que l'on va pouvoir déterminer quels gènes ont une expression différentielle dans les situations étudiées.

Différents types de support existent. Le premier à avoir été utilisé est la membrane de nylon, en 1979 par l'équipe de Kafatos (Kafatos et al. 1979), pour réaliser le macroarray. Puis l'utilisation de supports solides comme le verre a permis d'augmenter la densité des puces. On parle alors de microarray. Ce nouveau type de puces a été développé dans le laboratoire de Pat Brown pour l'étude de l'expression des gènes chez la levure (Schena et al. 1995), puis fut utilisé pour l'étude de génomes plus complexes.

Les sondes, représentant les gènes d'intérêt peuvent être sous forme d'oligonucléotides courts (20-50pb), longs (200pb), ou encore sont issues de produits de PCR faisant de 200 à 1000pb de long. Dans tous les cas, la sonde doit être pure et spécifique du gène.

En moyenne, la densité des dépôts sur lame de verre se situe autour de 10 000 spots par cm², alors qu'elle n'est que de 2 à 3000 dépôts sur membrane de nylon. Au lieu d'être déposés sur la lame de verre, les oligonucléotides peuvent également être synthétisés *in situ* par photolithographie. Ce procédé a permis à la société Affymérix de créer la première puce haute densité en 1994 (Pease et al. 1994). Actuellement les puces Affymérix ont la plus forte densité avec 180 000 spots/ cm² (Lipshutz et al. 1999).

L'avantage de ces techniques est de pouvoir quantifier l'ensemble des ARNm d'un génome de façon simultanée. De plus, les puces à oligonucléotides permettent de distinguer certains transcrits alternatifs. Par contre, avec cette technique, il est nécessaire de travailler sur des espèces dont le transcriptome est complètement séquencé, pour être exhaustif par rapport aux gènes spottés. L'inconvénient principal de cette technologie est un manque de sensibilité. Elle permet difficilement de détecter les gènes faiblement exprimés. Ceux-ci sont souvent écartés au cours de l'analyse du fait d'un ratio signal/bruit trop faible, ou d'une grande variabilité d'intensité de signal.

C. Quel avenir pour l'étude de l'expression différentielle ?

Des techniques puissantes sont désormais disponibles pour analyser de façon globale les profils d'expression de tissus ou de cellules. Ces nouvelles technologies nous permettent d'avoir une vision globale des variations du transcriptome dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques données. Elles ont permis de mettre en évidence toute la complexité des mécanismes physiologiques.

La meilleure compréhension de ces mécanismes est liée au développement de la bioinformatique. Elle permet l'analyse du flot de données, ainsi que son archivage informatique, et le recoupement avec toutes les données déjà existantes.

Les technologies à haut débit nous apportent l'espoir d'une révolution médicale dans les années à venir, car elles ont complètement modifié les approches de la recherche, dans un premier temps, dans des domaines comme la cancérologie et la pharmacologie, et plus récemment dans toutes les disciplines de l'étude du vivant. Elles permettent de classer de façon plus précise les pathologies, et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

En effet, les puces à ADN présentent un potentiel clinique certain, et dans de nombreux domaines, les équipes travaillent sur des puces thématiques, qui pourraient aider au diagnostique et à classer les pathologies non plus sur des critères histologiques, mais par l'étude des profils transcriptionnels (Kari et al. 2003; Daidone et al. 2004; Raetz et al. 2004), et ainsi de mettre en place un panel de traitements beaucoup plus personnalisés et adaptés. En transplantation rénale, notre laboratoire travaille sur la mise au point d'une puce à ADN

permettant de suivre l'évolution des patients greffés et de discriminer, à partir de sang périphérique, les patients présentant des signes histologiques de rejet chronique, des patients qui tolèrent leur greffon en l'absence de traitement immunosuppresseur. L'étude menée a abouti à la sélection d'un groupe de gènes dont l'expression met en évidence une signature de l'état de tolérance (Brouard et al., soumis; Braud et al., en préparation). Quelques études sont également en cours pour caractériser, par des signatures transcriptionnelles, la classification de Banff qui standardise, par des paramètres histologiques, l'échelle de gravité d'un rejet pour la greffe de rein (Solez et al. 1993; Solez et al. 1996; Racusen et al. 1999; Demetris et al. 2000; Racusen et al. 2003). Les puces ont également facilité le développement de la pharmacologie (Debouck et al. 1999). L'objectif est de mieux comprendre les mécanismes d'action des médicaments. Ces données devraient aussi favoriser la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques, et faciliter la réduction des effets secondaires éventuels d'une molécule.

En recherche fondamentale, les puces à ADN, dites exhaustives ou « pan-génomique », ainsi que les outils bioinformatiques qui leur sont associés, facilitent grandement le travail de décryptage d'une situation biologique, ou encore l'identification d'une molécule non étudiée. Ils permettent de dissocier les voies métaboliques dans lesquelles les gènes s'expriment. Ainsi les puces permettent d'analyser de manière globale, l'effet de la sur expression (transgénique), ou de la non expression (KO) de gènes précis.

De nouvelles puces développées par la société Applied Biosystems, avec des systèmes d'hybridation non compétitive, utilisant un système de mono-hybridation, normalisées par des systèmes de gammes, et couplées à des techniques d'amplification d'ARNm, permettent aujourd'hui aux puces à ADN de devenir un outil robuste pour la recherche de gènes différentiels. Notre équipe a réalisé une étude, en utilisant ces puces, pour comparer, à partir d'ARNm de greffons entiers, un modèle de tolérance à long terme induit par le traitement avec la molécule LF15-0195 et un modèle d'induction de tolérance par Transfusion sanguine du donneur avec des signes de rejet chronique à long terme. Cette étude montre l'importance du contrôle de la réponse humorale et de la cytoprotection du greffon, pour la prévention du rejet chronique (Heslan et al., sous presse).

Pour les puces à ADN, il n'existait pas de procédure de standardisation des résultats. De ce fait, les nombreuses expériences générées dans différents laboratoires, sont difficilement comparables. Par conséquent une standardisation de la nomenclature, des conditions expérimentales et de l'analyse informatique était nécessaire (Bassett et al. 1999). La mise en place de sites d'utilisateurs mettant à disposition des outils pour l'analyse des puces (www.bioconductor.org), permet d'aller vers un standard d'analyse. Enfin, ces données nécessitent d'être archivées, organisées, et disponibles au public. Certaines organisations

comme Cardiogenomics ou NCBI (Base Geo profiles) ont commencé à diffuser leurs données sur internet.

De part l'évolution des techniques et de nos connaissances sur les génomes, les puces à ADN semblent aujourd'hui être la technique offrant le meilleur compromis entre la sensibilité et l'exhaustivité de l'analyse, pour des organismes dont le génome est entièrement séquencé. La figure 13 montre l'évolution des publications utilisant les techniques de HSS, de SAGE et de puces à ADN entre 2000 et 2005. Alors que les publications décrivant l'utilisation de la HSS et du SAGE restent constantes durant cette période, celles décrivant l'utilisation des puces à ADN ont été en très forte croissance.

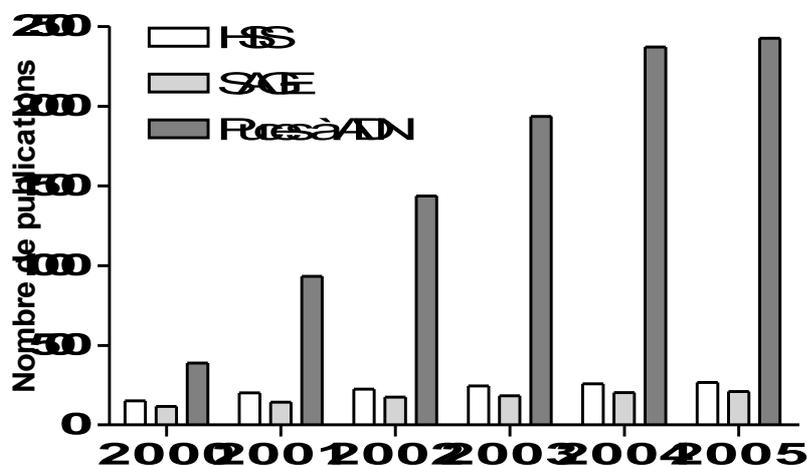


Figure 13 : Représentation du nombre de publications, par années entre 2000 et 2005, utilisant les techniques de HSS, SAGE et puces à ADN.

Il faut garder à l'esprit que tous les changements au niveau transcriptionnel n'ont pas forcément de conséquence au niveau fonctionnel. Il y a également des régulations au niveau protéique par une régulation traductionnelle, mais aussi post-traductionnelle : par des phosphorylations, des glycosylations, des interactions et des clivages protéiques. De nouvelles révolutions technologiques, permettant d'étudier à haut débit le protéome, sont en marche.

D. Objectifs de thèse et approche que nous avons eu en 2001 pour aborder la recherche de gènes différentiellement exprimés

L'objectif de ma thèse a été de participer à l'étude de l'analyse différentielle des gènes dans un modèle d'induction de tolérance par transfusion sanguine du donneur, et dans un modèle

de tolérance induit par traitement avec le LF15-0195. L'approche choisie pour ce travail a été de chercher de nouvelles molécules différentiellement exprimées dans la tolérance et d'étudier certaines de ces molécules pour évaluer leur importance et essayer de déterminer leurs mécanismes d'action.

Au moment où je débutais ma thèse, la technologie des puces ADN était en plein essor, notamment par la mise sur le marché de puces commerciales contenant des milliers de gènes. Il était alors possible de mesurer simultanément l'expression de tous les gènes et ainsi de comparer deux situations biologiques différentes. Cependant, pour plusieurs raisons, nous n'avons pas choisi d'utiliser cette technique dans l'étude de nos modèles.

Tout d'abord, les offres proposées au niveau des puces ADN commerciales étaient réservées aux génomes humain et murin, mais pas à celui du rat. De ce fait, l'étude d'un nombre de gènes limités chez le rat ne paraissait pas une bonne stratégie pour mettre en évidence l'importance de nouveaux gènes dans les greffons tolérés.

D'autre part, bien que de nombreuses innovations aient permis une meilleure sensibilité de détection, cette technique n'était pas encore suffisamment sensible pour les transcrits de faible abondance. Une étude assez récente atteste d'ailleurs de ce problème (Evans et al. 2002).

Enfin, malgré le nombre croissant de gènes « disponibles », on ne peut prétendre encore à une exhaustivité réelle, englobant tous les ARNm existants, avec une représentation complète de toutes les formes d'épissages possibles. Cependant, nous verrons par la suite que l'utilisation de la technologie des puces à ADN comme outil de criblage des banques soustraites peut être une approche intéressante.

Ainsi, l'HSS, par ses caractéristiques et son efficacité, apparaissait comme la méthode la plus adaptée pour notre problématique. Nous avons mis en place une stratégie de recherche de gènes combinant la soustractive avec un criblage des banques réalisé à partir de la technique des puces à ADN. Cette stratégie est expliquée dans la seconde partie de mes résultats.

Partie I

Recherche de gènes dans le modèle de transfusion de sang du donneur: Etude de la Follistatin-like 1 (FSTL1)

I Recherche de gènes dans le modèle de Transfusion du sang du donneur (TSD)

A. La transfusion du sang du donneur

L'effet bénéfique des transfusions de sang sur la survie des organes vascularisés tels que les greffons rénaux allogéniques est reconnu depuis des décennies (Morris et al. 1968; Opelz et al. 1973). La neutralisation de la réponse immune contre la greffe induite par la TSD ne semble pas affecter les autres réponses immunes contre les pathogènes microbiens (Jensen et al. 1996; van de Watering et al. 1998) ou les tumeurs (Houbiers et al. 1994).

1. Les différents modèles expérimentaux de transfusion spécifique du donneur

Les modèles expérimentaux répondant à la désignation « TSD » sont assez hétérogènes. La transfusion spécifique du donneur désigne la transfusion de sang mais aussi le transfert de différents types cellulaires. De nombreuses études ont montré que les cellules spléniques, thymiques ou de la moelle osseuse pouvaient induire une suppression/régulation des cellules alloréactives chez l'animal adulte. Les différentes populations constituant le sang ont également été testées pour leur capacité d'induction de survie du greffon dans différents modèles de greffes. Il a ainsi été montré que, chez le rongeur, chacun des composants cellulaires était capable d'induire une tolérance in vivo: les leucocytes (Jenkins et al. 1971; Faustman et al. 1982), les hématies (Jenkins and Woodruff 1971; Wood et al. 1985) et les plaquettes (Hibberd et al. 1983).

L'efficacité de la transfusion spécifique du donneur peut varier selon les espèces considérées. Chez la souris, dans un modèle de transplantation d'îlots pancréatiques entre souris incompatibles pour les molécules du CMH de classe I et II, l'administration d'une transfusion spécifique du donneur quatre semaines avant la transplantation entraîne un rejet accéléré (Roy-Chaudhury et al. 1997). Chez le rat, l'administration de deux transfusions quatorze et sept jours avant une greffe de cœur entre rats incompatibles pour les molécules du CMH de classe I et II permet la survie indéfinie du greffon (Souillou et al. 1984). Ces modèles animaux mettent en évidence les effets divergents des transfusions (présensibilisation/induction de tolérance). L'efficacité de la TSD peut également avoir des résultats différents selon les souches utilisées au sein d'une même espèce (Hamano et al. 1989; Wasowska et al. 1992; Yang et al. 1998) ou encore en fonction de l'organe transplanté (Okada et al. 1998 ; Akst et al. 2006).

Très souvent, les protocoles utilisant la présentation des antigènes du donneur sont associés à un blocage sélectif d'une voie de costimulation ou d'un corécepteur. Cette association induit la mise en place de mécanismes de régulation différents de ceux induits par la seule

présentation des antigènes du donneur. Dans le modèle murin d'allogreffe d'îlots pancréatiques de Roy-Chaudhury et al (Roy-Chaudhury, Nickerson et al. 1997), des traitements associés permettent d'obtenir une acceptation du greffon : avec l'anti-CD40L (Zheng et al. 1999) ou avec un anticorps anti-CD4 (Bushell et al. 1995). De nombreuses études sont ainsi basées sur l'association de la présentation des antigènes du donneur, avec un traitement complémentaire d'une ou plusieurs molécules.

2. Modèle d'induction de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat par TSD

2.1 Les souches de rat utilisées

Le modèle d'allogreffe cardiaque étudié dans ce travail utilise des souches de rat congéniques de fond génétique Lewis. Le donneur d'organe est d'haplotype RT1^u (souche LEW.1W) et le receveur d'haplotype RT1^a (souche LEW.1A). RT1 est le système du CMH chez le rat (Gill et al. 1987; Gunther et al. 2001). Du fait que le donneur et le receveur partagent le même fond génétique Lewis, les mécanismes immunologiques mis en jeu dans cette combinaison sont donc entièrement dépendants de l'histo-incompatibilité du CMH de classe I et de classe II.

2.2 La transplantation

Dans cette combinaison LEW.1W → LEW.1A, les donneurs et receveurs sont des rats mâles âgés de 8 à 12 semaines. La greffe de cœur est réalisée selon la technique décrite par Ono et Lindsey (Ono et al. 1969). Le greffon cardiaque est prélevé sur le donneur, anesthésié par une combinaison oxygène/isoflurane, après ligature des veines caves inférieure et supérieure et des veines pulmonaires, l'aorte et l'artère pulmonaire étant sectionnées 2 à 3 millimètres en aval de leur origine. Les cavités cardiaques sont lavées avec du sérum physiologique hépariné, puis le greffon est conservé à 4°C dans ce même milieu jusqu'à la greffe. Le greffon est placé chez le receveur en position hétérotopique intra-abdominale et transversale en dessous des pédicules rénaux. Les anastomoses entre l'aorte du donneur et l'aorte abdominale du receveur ainsi qu'entre l'artère pulmonaire du donneur et la veine cave inférieure du receveur sont de type termino-latéral. La durée de la greffe est d'environ 30 à 40 minutes. La position du greffon permet de surveiller son fonctionnement par simple palpation à travers la paroi abdominale. Une échelle arbitraire de battements, allant de 0 à +++ est utilisée, et le rejet est défini par la cessation des battements.

2.3 Le modèle

Ce modèle, permet d'induire une survie à long terme du greffon, par deux transfusions du sang du donneur (TSD) au receveur de la greffe, 14 et 7 jours avant la transplantation (figure 14) (Souillou, Blandin et al. 1984). Le sang est prélevé d'un rat LEW.1W, préalablement anesthésié, par ponction cardiaque transthoracique dans une seringue héparinée (concentration finale d'héparine : 20U/mL). Il est immédiatement injecté au receveur LEW.1A, également anesthésié, dans la veine dorsale du pénis, à raison de 1 mL par transfusion.

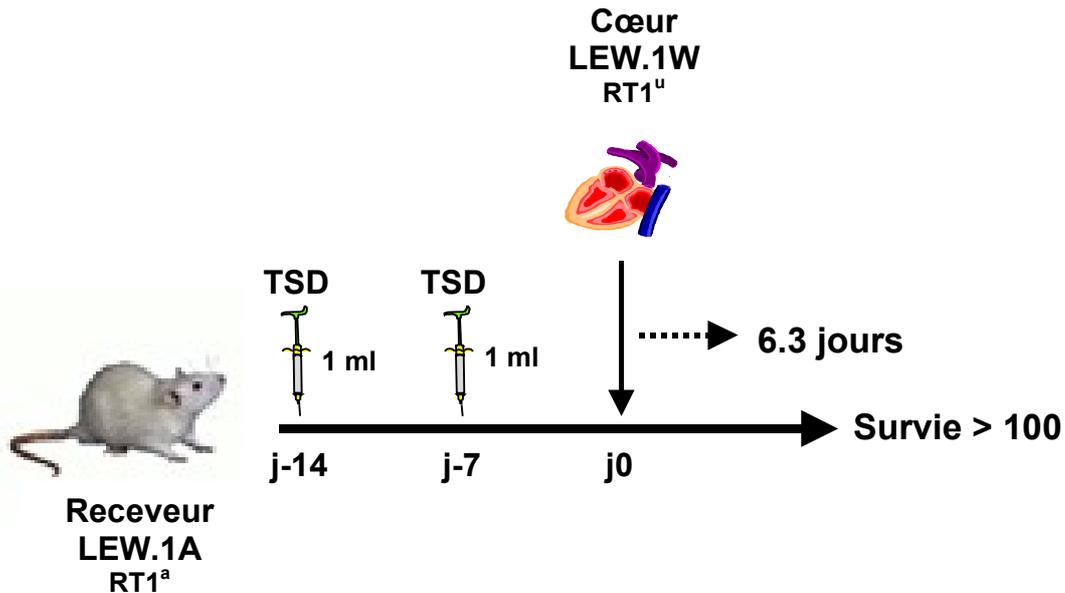


Figure 14 : Modèle d'induction de tolérance à l'allogreffe cardiaque par TSD.

Alors qu'une allogreffe cardiaque est normalement rejetée en 6 ± 0.6 jours, une TSD 7 jours avant la greffe permet de prolonger cette survie. Deux TSD 14 et 7 jours avant la greffe induisent une acceptation définitive de l'allogreffe chez 100% des animaux (Souillou, Blandin et al. 1984).

3. Résultats obtenus dans notre modèle de TSD

Dans cette partie seuls les résultats des études utilisant uniquement la présentation préalable des cellules du donneur sans aucun traitement additionnel seront décrits. L'effet transfusionnel est spécifique du donneur puisque des transfusions d'une souche autre que LEW.1W ne prolongent pas la survie de l'allogreffe dans cette combinaison (Souillou, Blandin et al. 1984). De plus, il est possible de mettre en évidence dans la rate des receveurs transfusés et greffés des cellules suppressives produisant de l'IL2 spécifique du donneur (Chevalier et al. 1987). Enfin, les animaux tolérants à long terme (>100 jours) acceptent une greffe de peau du type du donneur mais pas d'une tierce partie (Josien, Heslan et al. 1998).

3.1 Infiltrat leucocytaire dans les greffons

Une des caractéristiques du modèle de « tolérance » induite par TSD est la présence d'un important infiltrat leucocytaire dans les greffons « tolérés » pendant. Cet infiltrat est quantitativement équivalent à celui retrouvé dans les greffons des animaux non traités, pendant la première semaine après la greffe, et apparaît même plus précocement (Armstrong et al. 1987; Josien et al. 1995). Il persiste dans les greffons tolérés pendant environ un mois, puis décroît lentement. La quantité importante et la précocité de cet infiltrat leucocytaire sont les premiers arguments en faveur d'un processus actif de la suppression du rejet induit par les TSD.

Le phénotype de l'infiltrat a été caractérisé dans notre modèle (Josien, Pannetier et al. 1995) ainsi que dans des modèles équivalents (Armstrong, Bolton et al. 1987). Au jour 5 après la greffe, 60 à 70% des GICs sont des monocytes/macrophages/DCs. Les lymphocytes T ne représentent qu'environ 20% des GICs, sans différence significative entre les greffons rejetés et tolérés. Le pourcentage de cellules T CD4⁺ est également équivalent. Les seules différences observées sont une diminution significative du pourcentage de cellules CD8⁺ (lymphocytes T CD8 et cellules NK) et de cellules CD45RC⁺ (lymphocytes B, cellules NK, une partie des lymphocytes T CD4 périphériques, associés au type Th1, et la majorité des lymphocytes T CD8 périphériques) dans les greffons des animaux transfusés par rapport aux contrôles (Armstrong, Bolton et al. 1987; Josien, Pannetier et al. 1995). Au jour 7 après la greffe, l'infiltrat reste majoritairement de type myéloïde (70%), et le pourcentage de cellules CD8α⁺ est deux fois moins important dans les greffons tolérés que dans les contrôles. Cette différence dans les pourcentages de cellules CD8α⁺ aux jours 5 et 7 est également retrouvée par Armstrong et al. (1987) dans un modèle de tolérance à une allogreffe rénale induite par TSD. Les T CD8α⁺ infiltrent rapidement le greffon rénal et au jour 3, ces cellules sont plus nombreuses dans les greffons tolérés que dans les contrôles, mais atteignent un plateau, ce qui n'est pas le cas pour les animaux non traités (Armstrong, Bolton et al. 1987).

3.2 Absence de délétion clonale des CTL allo-réactifs contre le donneur

Comme dans d'autres modèles de tolérance induite par TSD chez le rat (Armstrong, Bolton et al. 1987; Dallman et al. 1987; Wasowska et al. 1991), Bugeon et al. ont démontré la présence de CTL spécifiques du donneur dans le greffon et la rate des animaux transfusés (Bugeon et al. 1992). Ces CTL exercent aux jours 5 et 6 après la greffe, et sans restimulation *in vitro*, une activité cytotoxique contre les cellules du donneur équivalente à celle retrouvée dans les animaux contrôles non traités. Cette activité cytotoxique est retrouvée au moins 21 jours plus tard. De plus, les mêmes auteurs ont trouvé une expression équivalente de perforine et de granzyme B (deux molécules importantes de la cytotoxicité cellulaire) dans

les deux types de greffons (Bugeon et al. 1993). Ces travaux montrent clairement l'absence de délétion clonale dans ce modèle, au niveau de la population T CD8+. Les greffons tolérés expriment autant, sinon plus, les molécules du CMH de classe I et de classe II, indiquant que l'absence de destruction du greffon des animaux transfusés par les CTL n'est pas due à un défaut d'expression des cibles alloantigéniques (Bugeon, Cuturi et al. 1992). Ce phénomène a également été décrit par d'autres groupes de recherche (Armstrong, Bolton et al. 1987; Wood et al. 1988).

3.3 La réponse humorale

Chez les receveurs transfusés, la réponse IgG anti-donneur induite après la greffe est excessivement faible comparée à celle des receveurs non traités (Cuturi et al. 1994). Cependant, cette réponse n'est pas diminuée de façon homogène : alors que les animaux non traités développent une réponse IgG dirigée contre le CMH de classes I et II du donneur, les receveurs transfusés produisent essentiellement des IgG anti-classe II et très peu d'anti-classe I. De plus, ces IgG sont principalement de sous-classe IgG2 qui, chez le rat, est associé à une immunité de type Th2. Dans une étude plus récente, Gagne et al. ont montré que l'injection d'anticorps anti-classe II chez des receveurs non traités par TSD permettait une prolongation de survie de l'allogreffe mais ne suffisait pas à induire de tolérance (Gagne et al. 2001). Ce traitement ne permet pas de diminuer l'expression des cytokines inflammatoires dans les greffons, alors qu'il s'agit d'une caractéristique essentielle chez les receveurs traités par TSD. Bien que le rôle de la présence de ces anticorps chez les animaux transfusés ne soit pas encore expliqué, il est possible que leur effet se conjugue avec d'autres mécanismes pour installer un état de tolérance spécifique des alloantigènes du donneur.

3.4 Expression des cytokines dans les greffons

Par hybridation in situ et analyse en Northern Blot, Bugeon et al. ont montré une diminution très significative de l'expression des ARNm de l'IL2 et de l'IFN γ dans les greffons tolérés durant la première semaine après la greffe, par rapport aux greffons rejetés dans lesquels ces deux cytokines sont fortement transcrites (Bugeon, Cuturi et al. 1992). Le rôle de l'absence d'IFN γ dans la tolérance est de plus renforcé par le fait que l'injection d'IFN γ recombinant aux animaux transfusés restaure un rejet aigu rapide. Dans une étude postérieure utilisant une technique de PCR quantitative compétitive, Josien et al. ont confirmé la diminution de ces deux cytokines de type Th1, mais montraient également l'inhibition de l'expression de l'IL4, l'IL13 et l'IL10 dans les greffons tolérés (Josien, Pannetier et al. 1995). Ces résultats ne s'accordaient donc pas avec l'hypothèse d'une déviation de la

réponse Th1 vers un phénotype Th2, qui avait été posée par plusieurs groupes de recherche dans des modèles de tolérance équivalents ou différents (Takeuchi et al. 1992; Hancock et al. 1993). Enfin, l'expression des messagers de Fas-Ligand (CD95L) et de TNF α est aussi fortement diminuée dans les greffons tolérés, ce qui corrèle avec la diminution du nombre de cellules apoptotiques (Josien et al. 1998).

Seules deux cytokines ont été trouvées sur-exprimées dans les greffons tolérés par rapport aux greffons rejetés : la sous-unité p40 de l'IL12 (Cuturi et al. 1997), et le TGF- β 1 (Josien et al. 1998). L'expression de l'ARNm du TGF- β 1 est corrélée avec l'expression de la forme active de la protéine et à une infiltration précoce dans les greffons de leucocytes exprimant le messager. Le TGF- β 1 est impliqué de manière critique dans la tolérance induite par TSD puisque celle-ci est rompue par l'injection d'un anticorps anti-TGF- β 1 neutralisant. De plus, l'injection dans le cœur au moment de la greffe d'un adénovirus recombinant pour TGF- β 1 conduit à une prolongation de la survie de l'allogreffe chez des receveurs non transfusés. Ces résultats suggèrent que des cellules produisant du TGF- β 1 soient impliquées dans la suppression du rejet.

3.5 Répertoire des cellules T infiltrant le greffon au niveau de la chaîne V β du TCR

Dans ce modèle de tolérance, la reconnaissance des antigènes du donneur par les lymphocytes T a lieu au moment des transfusions pré-greffe puis lors de la greffe. Au contraire, les receveurs non traités reconnaissent pour la première fois ces antigènes au moment de la greffe. Ainsi, les mêmes antigènes présentés différemment induisent deux processus immunologiques opposés. L'analyse du répertoire de la chaîne β du TCR au niveau du CDR3 a montré qu'il était fortement perturbé aussi bien dans les greffons rejetés que dans les tolérés, si on le compare à celui obtenu à partir du sang des animaux naïf. Cependant, des caractéristiques communes sont retrouvées entre receveurs tolérants et receveurs rejetants (Douillard et al. 1996; Douillard et al. 1998).

Il a tout d'abord été mis en évidence que la TSD induisait l'expansion d'un clone T portant au niveau de sa chaîne β le réarrangement V β 18-D β 1-J β 2.7 (Douillard, Pannetier et al. 1996). Ce clone est détecté dans le sang des receveurs dès le 7^{ème} jour après la première transfusion (donc avant la greffe), puis infiltre le greffon dès le premier jour après la transplantation. Il appartient à la population T CD8⁺. Enfin, il est spécifique du CMH du donneur car les TSD d'un rat LEW.1N (RT1ⁿ) n'induisent pas son expansion. Ces résultats suggéraient alors un rôle de ce clone T CD8⁺ pour l'induction de tolérance à l'allogreffe.

3.6 Composants critiques de l'induction de tolérance

La tolérance induite par TSD est caractérisée par l'inhibition de l'expression des cytokines d'activation, notamment l'IFN γ et l'IL2. Dès 1992, Bugeon et al. avaient montré que l'administration d'IFN γ à des receveurs traités par TSD abrogeait la tolérance (Bugeon, Cuturi et al. 1992). Dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat, Dallman et al. avaient montré que l'injection d'IL2, une autre cytokine de type Th1, menait également au rejet du greffon chez les receveurs transfusés (Dallman et al. 1991). Plus récemment, Josien et al. ont analysé les mécanismes de la rupture de tolérance provoquée par l'IFN γ (Josien et al. 1999). De façon surprenante, l'IFN γ ne restaure pas l'expression des cytokines d'activation, ni celle d'iNOs, un produit d'activation des macrophages, mais restaure la réponse humorale anti-donneur. La suppression de cette réponse humorale chez les receveurs transfusés apparaît donc essentielle dans l'induction et la maintenance de la tolérance.

Il a été établi que les TSD à elles seules ne permettaient pas d'inhiber la réponse proliférative anti-donneur des lymphocytes T de la rate, la greffe cardiaque étant nécessaire (Josien, Heslan et al. 1998). Dans cette étude, Josien et al. ont démontré que la déplétion des cellules passagères du greffon empêchait l'induction de tolérance par TSD. Ces cellules, principalement des DCs interstitielles, migrent rapidement vers la rate du receveur. Elles constituent donc un composant indispensable de la reconnaissance et de la tolérance des alloantigènes du donneur chez les receveurs transfusés. Par ailleurs il a été montré que ces cellules n'ont aucun rôle dans l'induction du rejet aigu chez les animaux non transfusés.

La mise en évidence d'un clone T CD8 portant le réarrangement V β 18-D β 1-J β 2.7 de la chaîne β du TCR suggérait un rôle des cellules T CD8 dans la tolérance par TSD. Cette hypothèse a été confirmée puisque la déplétion des cellules CD8⁺ des receveurs avant la greffe abroge la tolérance (Douillard et al. 1999). Grâce à la technique de vaccination par ADN, il a été possible de cibler le clone V β 18-D β 1-J β 2.7 (Vignes et al. 2000). Dans cette étude, la vaccination rompt la tolérance à l'allogreffe chez les animaux traités par TSD, contrairement aux vaccinations utilisant un plasmide vide ou un plasmide codant pour une chaîne V β 13. Après vaccination, le clone T V β 18-D β 1-J β 2.7 est toujours présents chez les receveurs vaccinés et rejetant leur greffe, ce qui suggère une altération de ses fonctions immunorégulatrices plutôt qu'une déplétion. Bien que la fonction précise de ces cellules reste encore inconnue, il est possible qu'il existe un lien direct ou indirect entre les lymphocytes T CD8 infiltrant les greffons des animaux tolérants et la production de TGF- β , également requise pour la tolérance (Josien, Douillard et al. 1998).

On peut alors émettre l'hypothèse que les TSD induiraient des cellules régulatrices T CD8⁺ spécifiques du donneur infiltrant le greffon, reconnaissant les antigènes par le TCR portant le réarrangement V β 18, et qui produiraient de fortes quantités de TGF- β . De plus, le fait que les

cellules passagères du greffon soient requises pour l'induction de tolérance suggère que les cellules régulatrices induites par TSD produiraient du TGF- β à la suite de leur interaction avec ces APC du donneur, dans le greffon et/ou dans la rate. Dans ce cas de figure, les cellules T CD8 reconnaîtraient de façon directe les antigènes du donneur, correspondant théoriquement au CMH de classe I. Pourtant, ce modèle d'induction de tolérance est restreint par les alloantigènes de classe II du donneur de sang et d'organe (Souillou, Blandin et al. 1984). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules régulatrices T CD8+ reconnaîtraient l'alloantigène de façon indirecte, c'est à dire sous la forme d'un peptide issu d'une molécule de classe II du donneur présenté par les molécules de classe I du receveur.

Les différents éléments présentés ci-dessus ont permis de mettre en évidence une partie des mécanismes de tolérance dans ce modèle. Cependant, la persistance de nombreuses zones d'ombre peut s'expliquer par le fait que nous ne connaissons pas tous les acteurs cellulaires ou moléculaires impliqués dans ce modèle. Leur identification pourrait nous permettre de relier plus facilement les éléments déjà connus entre eux, pour mieux comprendre l'état de tolérance spécifique vis-à-vis des alloantigènes du donneur induit par la TSD.

B. Recherche de gènes différentiellement exprimés dans notre modèle de TSD

Cette étude a été réalisée avant celle présentée précédemment, concernant le modèle de tolérance par traitement au LF15-0195. Je suis arrivé au sein de l'équipe, après que ce projet soit commencé, et j'ai travaillé sur le criblage des banques soustraites de cette étude, ainsi que sur une des molécules qui en est ressortie. N'ayant pas participé à la première partie de ce travail, je vais donc présenter plus succinctement la partie consacrée à la recherche de gènes, et je présenterai plus les méthodes dans la seconde partie.

1. Objectif et situation étudiée

Le but de cette étude était d'identifier des gènes exprimés spécifiquement dans les greffons tolérés par TSD, pour mieux comprendre les mécanismes de cette tolérance. L'expression différentielle des gènes a été analysée pendant la première semaine après la transplantation, dans la période d'induction de tolérance, 5 jours après la greffe. C'est le moment où sont retrouvées les différences d'expression les plus significatives pour certaines molécules d'activation entre le rejet et la tolérance, et où l'infiltrat leucocytaire est équivalent dans les deux situations. Une variation d'abondance d'un ARNm peut ainsi résulter d'une régulation transcriptionnelle mais aussi refléter le recrutement d'une population cellulaire particulière, exprimant la molécule d'intérêt.

2. Hybridation soustractive et criblages

2.1 Première banque et premier criblage.

Deux banques enrichies en transcrits spécifiques des cœurs tolérés ou rejetés (sous la forme de fragments d'ADNc amplifiés) ont été générées. Ces deux banques ont ensuite servi à cribler 286 colonies bactériennes résultant du clonage dans un vecteur plasmidique de la banque des greffons tolérés. Les clones bactériens amplifiés en microculture ont ensuite été déposés sur des membranes de Nylon (« macroarray ») en deux exemplaires pour une hybridation différentielle avec les sondes et ont été criblés à partir des produits de PCR soustraits. Par ce criblage, 50 clones ont montré une différence significative et ont été sélectionnés pour être séquencés. Après séquençage et identification des séquences en utilisant le programme *BLAST* (Altschul et al. 1990), sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information), les clones redondants et les séquences non codantes ont été éliminés. Au final, 25 candidats ont été vérifiés par PCR quantitative sur des groupes de 4 greffons prélevés 5 jours après la transplantation pour chacune des situations suivantes: tolérance, rejet, et greffe syngénique. Trois clones ont montré dans les cœurs tolérés une expression supérieure à trois fois celle mesurée dans les cœurs rejetés (Figure 15), et une

expression plus faible ou équivalente à celle retrouvée dans le rejet, dans les greffons syngéniques.

En conclusion, bien que la majorité des 25 candidats soit préférentiellement exprimé dans les greffons tolérés seuls 3 clones montrent une surexpression supérieure à 3 fois. Le clone 2F10 montre seulement une identité partielle avec un clone génomique humain. La séquence du clone 2H11 montre une forte similarité avec deux transcrits clonés chez la souris (Clast1) et chez l'homme (LR8), mais dont la protéine déduite n'a pas de fonction connue, il sera nommé par la suite TORID. Le clone 3B2 correspond à l'ARNm du récepteur de la Fractalkine (CX3CR1, famille des récepteurs aux chimiokines). La soustraction semble donc n'avoir pas été suffisamment efficace pour ne privilégier que les transcrits nettement différenciellement exprimés.

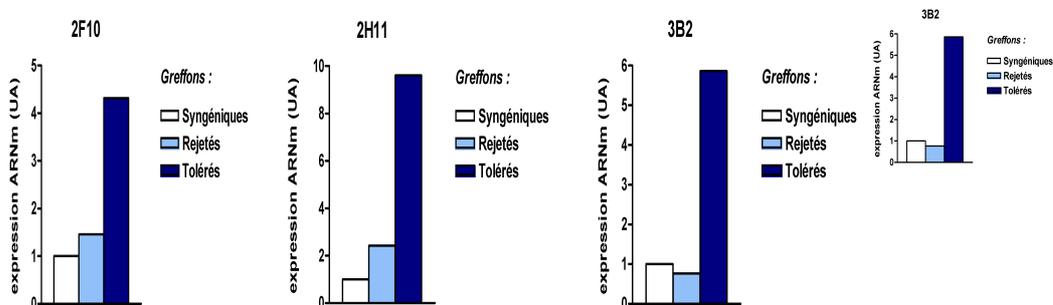


Figure 15 : Expression des ARNm correspondant aux clones 2F10 (inconnu), 2H11 (TORID), et 3B2 (CX3CR1) dans les greffons syngéniques, rejetés, et tolérés. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (UA) pour chaque gène.

2.2 Amélioration de la soustraction et second criblage

Dans le but d'éliminer les nombreux faux positifs présents à l'issue de la soustraction, il a été appliqué la méthode MOS (Rebrikov et al. 2000), décrite dans la seconde partie de cette thèse, sur les banques soustraites d'ADNc. 576 clones générés à partir de la nouvelle banque des greffons tolérés ont ensuite été criblés sur membrane de Nylon. L'étape MOS est apparue être efficace, puisque 360 clones (62%), après criblage, ont montré un signal différentiel. Le séquençage a révélé une forte redondance pour de nombreux clones correspondant à des molécules sans intérêt immunologique direct comme les sous unités de l'actine ou des protéines ribosomales. De façon intéressante, la séquence du clone 3B2 (CX3CR1) est retrouvée 9 fois, et le fragment du CMH de classe I du receveur est aussi représenté par plusieurs clones. Une sélection de 9 nouveaux clones de séquences connues et 8 clones de séquences inconnues ont été analysées par PCR quantitative. Au final, seul 1 clone inconnu (« un3 ») et deux molécules connues, Follistatin-like 1 (FSTL1) et CD4, ont montré une nette surexpression (>3 fois) dans les greffons tolérés (Figure 16).

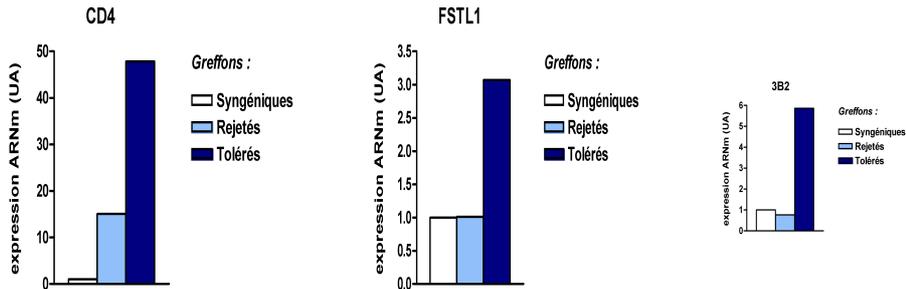


Figure 16 : Expression des ARNm correspondant à CD4 et FSTL1 dans les greffons syngéniques, rejetés, et tolérés. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (UA) pour chaque gène.

2.3 Criblage par les puces à ADN

Puisque le système de criblage en macroarray avec les sondes soustraites apparaissait trop peu sélectif, nous avons testé la technologie des puces ADN pour cribler la banque des greffons tolérés en utilisant les sondes « non soustraites ». Pour ceci nous avons « spotté » des puces avec les banques soustraites, et nous avons par ailleurs ajouté plus de 200 fragments de PCR correspondant à diverses molécules, et particulièrement à des molécules d'activation des leucocytes (interleukines, membres de la famille du TNF), afin d'obtenir des contrôles d'hybridation.

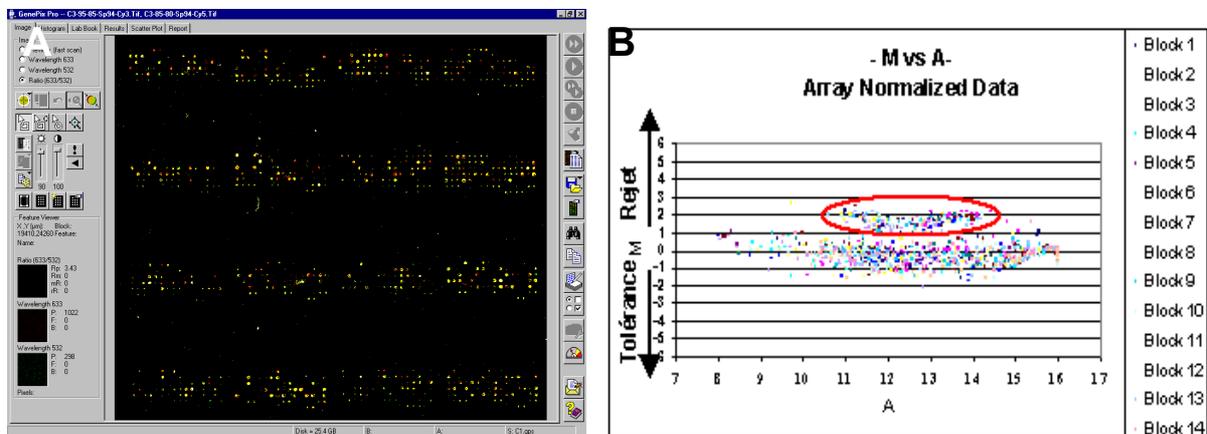


Figure 17 : Etude de la banque spécifique des greffons tolérés par la technique des puces ADN. **(A)** Image globale des spots obtenus après l'hybridation compétitive des ARN des greffons tolérés marqués par la cyanine 3 (vert) et des ARN des greffons rejetés marqués par la cyanine 5 (rouge). Les spots jaunes résultent de signaux verts et rouges équivalents, donc représentent des transcrits non différenciellement exprimés. **(B)** Une valeur de ratio (log base 2) a été attribuée à chaque spot, signifiant le rapport des quantités du transcrite cible dans un échantillon par rapport à l'autre (greffons tolérés *versus* rejetés). L'échelle en abscisse représente l'intensité globale de fluorescence. Le cercle rouge désigne le nuage de molécules d'activation rajoutées sur la puce, qui sont surexprimées dans les greffons rejetés.

Après analyse des résultats, nous avons observé un groupe de spots caractérisés par un décalage de la fluorescence indiquant une surexpression dans les greffons rejetés (Figure

17). Ces spots correspondent essentiellement aux molécules d'activation rajoutées sur la puce, dont plusieurs ont déjà été identifiées dans les greffons rejetés comme par exemple l'iNOs (Josien, Muschen et al. 1998). Quelques molécules de ce groupe ont été analysées par PCR quantitative. Certaines molécules comme la chimiokine CINC2 β (CXCL2, MIP2 α) ont été confirmées comme étant largement surexprimées dans les greffons rejetés. Néanmoins, de nombreuses autres molécules, comme Granzyme B ou eNOs (non montré), n'ont pas été confirmées. Concernant les quelques spots montrant un signal différentiel en faveur des greffons tolérés, les clones de FSTL1 ont été retrouvés, mais pas ceux de CX3CR1 ou CD4. Six clones ont par ailleurs été séquencés et analysés par PCR quantitative, et seule la tropomyosine a montré une modeste surexpression (2,6 fois). Cependant, ce niveau d'expression n'est pas spécifique de la tolérance puisqu'il est retrouvé dans les greffons syngéniques (Figure 18). L'expression de cette molécule semble donc plutôt diminuer dans les greffons en phase de rejet.

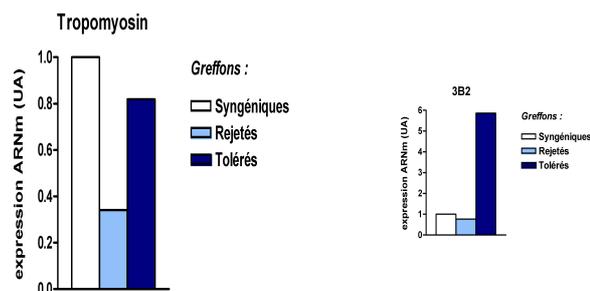


Figure 18 : Expression de l'ARNm correspondant à la tropomyosine dans les greffons syngéniques, rejetés, et tolérés.

3 Bilan des molécules isolées à partir de cette HSS

A partir de l'étude des greffons tolérés à Jour 5 après la greffe, dans notre modèle de TSD, nous avons mis en évidence cinq gènes clairement surexprimés dans les greffons tolérés comparés aux greffons rejetés (au moins >3 fois) : un clone de séquence inconnue (clone 2F10), un gène de fonction inconnue TORID (clone 2H11), le récepteur CX3CR1 (clone 3B2), la molécule de surface CD4, et la molécule FSTL1 (Follistatin-like 1). Ces molécules ont été extraites de la même banque d'ADNc soustraites (avec ou sans l'étape MOS), à la suite de criblages successifs.

3.1 CX3CR1

Le récepteur de la Fractalkine, CX3CR1, a été étudié par Cédric LOUVET et al., et a fait l'objet d'une publication (Louvét et al. 2004). Dans cette étude, notre équipe montre l'importance de l'accumulation de l'ARNm de CX3CR1 dans les greffons tolérés, qui est liée

au recrutement actif de monocytes/macrophages/DCs. Cette accumulation est précédée par une expression précoce de son ligand, la Fractalkine, par les cellules endothéliales de la greffe. Elle a également montré que la déplétion des cellules CD8⁺ du receveur provoque une diminution très importante des niveaux d'ARNm de CX3CR1 et de la Fractalkine. De plus, *in vitro*, les cellules T CD8⁺ des animaux traités par TSD sont capables d'induire une forte expression de Fractalkine dans une lignée de cellules endothéliales allogéniques. Il s'agit de la première étude décrivant la Fractalkine, habituellement décrite dans des phénomènes inflammatoires, comme étant exprimée dans un modèle de tolérance à une allogreffe.

3.2 TORID

TORID pour « tolerance-related and induced transcript » est un gène de rat spécifiquement exprimé dans les cellules infiltrant le greffon d'allogreffes tolérées (Louvet et al. 2005). L'analyse de la séquence prédite d'acides aminés de TORID et de son correspondant humain, LR8, a montré une homologie jusqu'ici non décrite avec la famille du CD20 (ou famille MS4A) comprenant 4 domaines transmembranaires, malgré une localisation chromosomique différente. L'ARNm de TORID est trouvé dans de nombreux tissus de rat et particulièrement dans les organes lymphoïdes. Parmi les sous-populations leucocytaires fraîchement isolées, les macrophages et les cellules dendritiques (DCs) montrent la plus forte expression. Des analyses par immunofluorescence ont révélé que la protéine TORID était localisée à la membrane nucléaire, ce qui suggère une fonction intracellulaire. Dans la rate, bien que de nombreuses cellules exprimant TORID aient été détectées dans la pulpe rouge, elles ont aussi été trouvées disséminées dans les manchons périartériolaires lymphoïdes. Des études de co-expression ont confirmé que TORID était préférentiellement exprimé dans des cellules variées d'origine myéloïde. De façon intéressante, l'expression de l'ARNm de TORID diminue très fortement après la maturation/activation des macrophages ou des DCs. Des résultats similaires ont été obtenus avec des DCs humaines dérivées des monocytes ou des BMDCs de souris (Clast-1). Ces résultats suggèrent que TORID puisse être impliqué dans les fonctions des cellules myéloïdes immatures, ainsi que dans les mécanismes d'induction ou de maintenance de la tolérance.

3.3 CD4

Le CD4 est une protéine de surface définissant par son expression le sous-type des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4⁺. Dans ces cellules, il agit comme co-récepteur en se liant à la face latérale des molécules du CMH de classe II. Le CD4 est impliqué dans l'initiation ou l'augmentation de la phase précoce d'activation des cellules T, et pas simplement dans une

stabilisation du complexe TCR-CMH au sein de la « synapse immunologique » (Grakoui et al. 1999; Krummel et al. 2000). Le CD4 a aussi été décrit à la surface de cellules variées comme certains lymphocytes B, monocytes, macrophages, éosinophiles, ou progéniteurs hématopoïétiques (Maddon et al. 1987; Foti et al. 1995). Par ailleurs, chez le rat, le CD4 définit une sous-population de DC, analogue à la sous-population de DC CD8- chez l'homme en terme de phénotype et de fonction (Voisine et al. 2002). Cette expression dans des cellules non-T suggère que le CD4 puisse médier une fonction indépendante du TCR. En ce sens, en plus de sa liaison au CMH II, le CD4 sert de récepteur à l'IL16 (Cruikshank et al. 1994; Cruikshank et al. 1998). L'activation des cellules T CD4⁺ par l'IL16 provoque alors la motilité cellulaire. Ce chimiotactisme a aussi été observé avec les monocytes (Cruikshank et al. 1987) et les éosinophiles (Rand et al. 1991). Récemment, il a été montré que l'IL16 était stockée constitutivement par les monocytes du sang, et qu'elle était relarguée lors de l'apoptose spontanée de ces cellules (Elssner et al. 2004). De façon intéressante, l'interaction de l'IL16 avec le CD4 est capable d'inhiber l'activation des cellules T dans une culture mixte lymphocytaire, une propriété partagée par la protéine d'enveloppe gp120 du HIV-1 ou des anticorps anti-CD4 (Arthur et al. 1996). Par ailleurs, un autre ligand soluble de CD4 a été identifié (« seminal plasma protein gp17 »), mais sans que l'on connaisse son rôle physiologique (Autiero et al. 1991; Autiero et al. 1995). Le CD4 apparaît donc comme un récepteur multifonctionnel.

Dans les greffons syngéniques, l'expression de l'ARNm du CD4 est très faible, sinon nulle, comparée à celle dans les greffons rejetés ou tolérés (Figure 16). L'augmentation du CD4 dans ces deux types de greffons semble donc être due à l'arrivée massive de GICs qui l'expriment. L'observation d'une expression transcriptionnelle plus forte dans les greffons tolérés que dans ceux rejetés indique soit une accumulation plus importante de cellules CD4⁺, soit une régulation positive de l'expression du CD4. Il a été montré dans ce modèle que les GICs contenaient un nombre équivalent de cellules T CD4⁺ dans les allogreffes de receveurs traités par TSD ou non traités (Josien, Pannetier et al. 1995). Cependant, une analyse par cytométrie en flux de toutes les GICs a montré une nette augmentation des cellules CD4⁺ totales dans les greffons tolérés comparés aux greffons rejetés (≈50% contre ≈25%, résultats non montrés). Ces cellules expriment le CD4 de façon moyenne, au contraire des cellules T CD4⁺ qui l'expriment fortement, et sont donc très probablement des monocytes/macrophages (représentant >70% de l'infiltrat). De façon intéressante, la mesure de l'expression de l'IL16 par PCR quantitative a révélé qu'elle était surexprimée d'environ 4 fois dans les greffons tolérés comparés aux greffons rejetés. Cependant, ces résultats sont préliminaires et requièrent des expériences de confirmation sur plusieurs animaux différents. La corrélation de l'expression de l'IL16 et du CD4 poserait alors l'hypothèse du rôle potentiel de l'IL16 dans le recrutement et/ou l'inactivation de cellules CD4⁺ dans les greffons tolérés.

3.4 FSTL1

FSTL1 est la troisième molécule issue de la banque soustraite, spécifique des greffons des animaux tolérants, à avoir fait l'objet d'une étude de notre part.

3.4.1 Etat des connaissances sur FSTL1

Les transcrits orthologues de FSTL1 chez le rat, l'homme, la souris, le poussin, le xénope, et le macaque ont été clonés et séquencés (Zwijssen et al. 1994; Patel et al. 1996; Okabayashi et al. 1999; Tochitani et al. 2001). Selon les auteurs et l'espèce étudiée, FSTL1 a aussi été appelé TSC-36 (TGFβ1-stimulated clone-36), FRP (follistatin-related protein), Flik (follistatin like), ou occ1. La figure 19 montre par alignement des séquences protéiques que FSTL1 est très conservée entre l'homme, la souris et le rat.

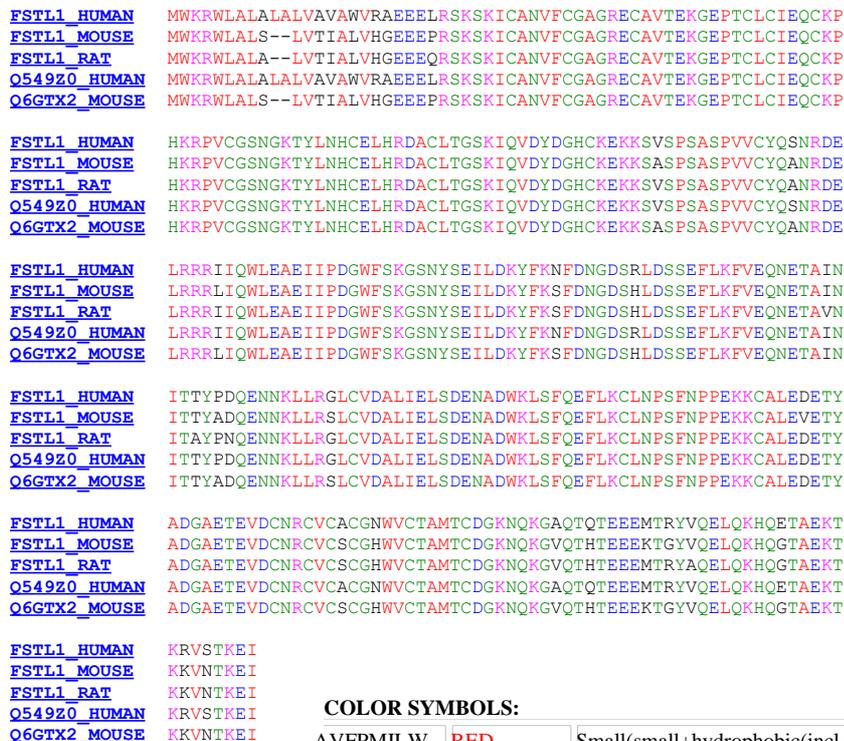


Figure 19 : Alignement des séquences protéiques codantes pour la protéine FSTL1 chez l'homme, la souris et le rat.

FSTL1 est une glycoprotéine (N-glycosylation) sécrétée (Shibanuma et al. 1993 ; Hambrock et al. 2004), dont l'ARNm est présent dans tous les tissus exceptés les leucocytes périphériques du sang (Tanaka et al. 1998). FSTL1 partage un module structural caractéristique (le domaine FS) avec la follistatine. La follistatine par ce domaine FS inhibe l'activine en la fixant, ce qui lui permet ainsi de participer à la régulation de la sécrétion de FSH (Esch et al. 1987). En plus de la follistatine et FSTL1, d'autres protéines contenant un ou plusieurs domaines FS, comme BM-40/SPARC/osteonectin, SC1/hevin, testican, QR1, ou encore FLRG (follistatin-related gene protein), définissent la famille de la follistatine (Brekken et al. 2001). FLRG, qui a été isolée à partir d'une lignée cellulaire B de leucémie (Hayette et al. 1998), a aussi été appelée FSRP (pour « follistatin-related protein ») (Schneyer et al. 2001). Cette multiplicité de noms peut donc amener à confusion. Dans la littérature, il faut distinguer FSTL1/TSC-36/FRP/Flik et FLRG/FSRP/FSTL3, qui sont deux protéines différentes.

Malgré son appartenance à la famille de la follistatine et les similarités de séquence avec les autres membres, FSTL1 possède des propriétés distinctes. Au contraire de la follistatine et de FLRG, il n'a pas été démontré que FSTL1 pouvait interagir avec l'activine, ou avec d'autres protéines de la famille du TGF β (Tsuchida et al. 2000). D'autre part, le domaine de liaison au calcium de FSTL1 n'est pas fonctionnel (Hambrock, Kaufmann et al. 2004). Il a été montré que l'expression de FSTL1 dans des fibroblastes pouvait être supprimée par la transfection des oncogènes v-ras et v-myc (Mashimo et al. 1997). De plus, la sur-expression forcée de FSTL1 dans des cellules pulmonaires cancéreuses provoque l'inhibition de leur prolifération (Sumitomo et al. 2000). Cet effet anti-prolifératif a aussi été reporté dans une autre étude avec des fibroblastes transformés par v-fos (Johnston et al. 2000). D'autre part, l'implication de FSTL1 dans l'embryogenèse du poussin ou du xénope a été décrit, notamment dans la neuralisation dorsale ainsi que dans la compartimentalisation des somites et dans la myogenèse (Amthor et al. 1996; Patel, Connolly et al. 1996; Okabayashi, Shoji et al. 1999; Towers et al. 1999). La fonction physiologique de FSTL1 chez l'animal adulte n'était cependant pas encore établie. Une étude récente a permis d'attribuer à FSTL1 une fonction protectrice de la réponse inflammatoire dirigée contre les articulations chez la souris (Kawabata et al. 2004). Dans ce modèle d'induction de l'arthrite (injections d'anticorps anti-CMH de classe II et de LPS), ressemblant à l'arthrite rhumatoïde (AR), l'injection de FSTL1 recombinant permet d'atténuer significativement la sévérité de la maladie. Ces résultats *in vivo* suggèrent alors l'utilisation de FSTL1 comme molécule thérapeutique chez l'homme. A l'origine de cette étude, les auteurs avaient précédemment observé que des auto-anticorps contre FSTL1 étaient détectés dans 30% de patients atteints d'AR, ainsi que dans d'autres maladies auto-immunes systémiques, et que leur apparition corrélait avec l'activité de la maladie (Tanaka, Ozaki et al. 1998). Par la suite, ils avaient démontré par des

études *in vitro* que FSTL1 supprimait la production des métalloprotéinases MMP-1 (Matrix Metalloproteinase 1) et MMP-2, et de la prostaglandine E2 dans des cellules synoviales obtenues à partir de patients atteints d'AR (Tanaka et al. 2003). L'accumulation de FSTL1 et de son inducteur, le TGF β , au cours du développement de l'arthrite (Thornton et al. 2002; Kawabata, Tanaka et al. 2004), jouerait alors un rôle de régulation inverse de la réponse inflammatoire, notamment par le biais de l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription c-fos et ets-2. Cette hypothèse est en accord avec les études montrant un effet anti-inflammatoire du TGF β dans l'AR (Lafyatis et al. 1989; Chen et al. 1998; Song et al. 1998). Cependant, d'autres études lui attribuent au contraire un rôle pro-inflammatoire (Fava et al. 1991; Wahl et al. 1993; Cheon et al. 2002). Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par des conditions expérimentales et/ou des modèles animaux différents.

3.4.2 FSTL1 chez le rat

FSTL1 est un gène placé sur le chromosome 11. Sa séquence génomique se compose de 9 exons et 8 introns, avec une séquence codante qui est répartie sur 9 exons (Figure 20). Le transcrit de FSTL1 est formé de 2283 pb avec une partie codante de 918 pb qui code pour une protéine de 306 acides aminés de masse estimée à 34.622kDa.

chromosome: 11; Location: 11q21

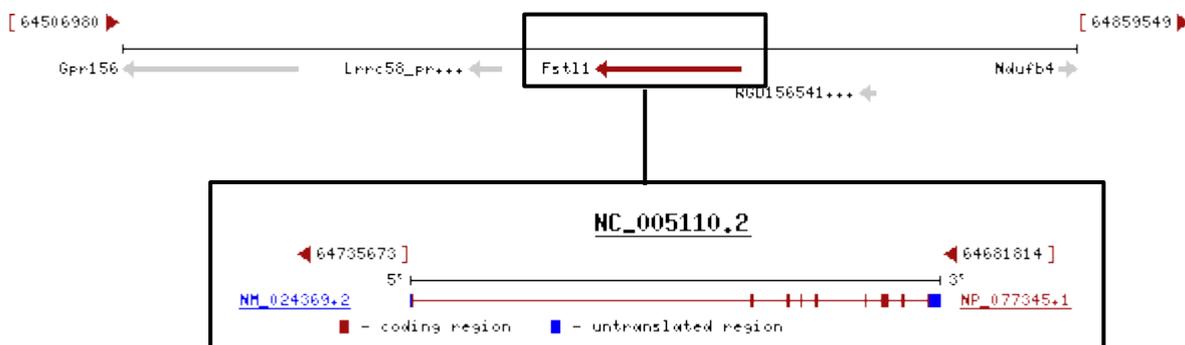


Figure 20 : Localisation chromosomique et structure exonique et intronique de FSTL1 de rat.

En étudiant les domaines fonctionnels par rapport à la séquence primaire (Figure 21), nous retrouvons un peptide d'adressage extracellulaire, qui permet de dire que FSTL1 est une protéine sécrétée. La séquence contient également un domaine « Follistatin-N-terminal-like » qui lui donne l'homologie avec la Follistatine. Une séquence Kazal de type « serine protéase inhibitors », deux domaines « EF-hand, calcium binding motif », mais ces domaines ont été décrits comme non fonctionnels (Hambrock, Kaufmann et al. 2004).

Chez la souris, puis chez l'homme, il a été montré que FSTL1 était une glycoprotéine possédant des N-glycosylations (Shibanuma, Mashimo et al. 1993 ; Hambrock, Kaufmann et

al. 2004). En étudiant les domaines de glycosylation potentiels de la séquence de rat (Figure 21), nous retrouvons 4 sites potentiels de N-glycosylation. Ces sites, qui sont conservés entre les séquences codantes pour les formes humaine, murine et de rat (Figure 19), ont été démontrées comme glycosylées chez l'homme (Hambrock, Kaufmann et al. 2004). Il est donc fort probable pour que cela soit également le cas chez le rat.

```

1  mwkrwlalal vtialvhgee eqrskskica nvfcgagrec avtekgeptc lcieqckphk
61  rpvcgsngkt ylnhcelhrd acitgskiqv dydghckeck svspaspvv cyqanrdelr
121 rriiqwleae iipdgwfskg snyse ldky fksfdngdsh ldsseflkv eqretavnit
181 ayqnqennkl lrglcvdali elsdenadwk lsfqeflkl npsfnppekk caledetyad
241 gaetevdcnr cvcscghwvc tamtdgknq kgvqthtee mtryaqelqk hqgtaektkk
301 vntkei

```

Peptide signal
Domaine Follistatine
Domaine KAZAL
Domaines EF-hand
 Sites potentiels de N-glycosylation

Figure 21 : Séquence primaire de la protéine FSTL1 de rat.

La structure tridimensionnelle de FSTL1 est représentée dans la figure 22. Cette représentation a été réalisée à partir de l'étude par cristallographie de la Follistatine. La structure 3D de FSTL1 a ensuite été modélisée in silico. On peut remarquer ici le domaine FS en hélice α au centre de la molécule.

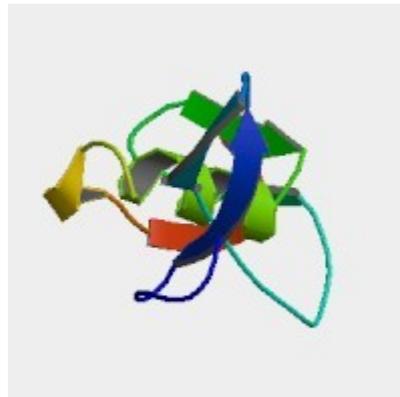


Figure 22 : Séquence tridimensionnelle prédictive de la protéine FSTL1 de rat.

II Etude de la Follistatin-Like 1 (FSTL1)

Article 1 :

**AN IMMUNOMODULATORY ROLE FOR FOLLISTATIN-LIKE IN ALLOGRAFT
TOLERANCE**

Jean Benoît Le Ludec , Cédric Louvet, Elise Chiffolleau, Maria-Cristina Cuturi

Résumé de l'article 1 :

L'étude de modèles animaux permet de mieux comprendre les mécanismes de rejet et de tolérance en transplantation et procure un moyen important pour trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourront être applicables chez l'homme dans un futur proche.

Nous avons précédemment montré qu'une tolérance spécifique du donneur pouvait être induite chez le rat par transfusion sanguine du donneur (TSD) avant transplantation. Cette tolérance est caractérisée par une forte infiltration cellulaire dans le greffon et nous avons précédemment montré que les lymphocytes T CD8⁺ et le TGF- β étaient impliqués dans ce processus de tolérance.

Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la phase d'induction de tolérance, nous avons réalisé une hybridation soustractive suppressive sur des ARNm issus d'allogreffes cardiaques 5 jours après la transplantation. Nous avons identifié FSTL1 surexprimé dans les greffons cardiaques tolérés.

Dans cette étude, nous montrons que FSTL1 est surexprimé, dans notre modèle de tolérance induit par TSD pendant l'induction de tolérance, ainsi que pendant la phase de maintien de la tolérance. Nous montrons également que l'expression de FSTL1 est due aux cellules T CD8⁺ infiltrant la greffe, et que FSTL1 a un effet sur la prolongation de survie de l'allogreffe lorsque l'on traite les animaux avec un adénovirus codant pour FSTL1, ce qui suggère un rôle immunorégulateur de FSTL1.

AN IMMUNOMODULATORY ROLE FOR FOLLISTATIN-LIKE IN ALLOGRAFT TOLERANCE

Jean Benoît Le Luduec *, Cédric Louvet*#, Elise Chiffolleau*, Maria-Cristina Cuturi,*

* Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unit 643 and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France.

#current address: Diabetes Center, Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA 94143-0540, USA.

Keywords: Transplantation-Tolerance-T cells

Abbreviation: Follistatin-like 1 (FSTL1), Graft infiltrating cells (GIC), peripheral blood lymphocytes (PBL), Donor specific transfusion (DST).

Running title: Prolongation of heart allograft survival by over-expression of Follistatin-like 1

Address correspondence to: Dr. Maria-Cristina Cuturi, INSERM U643, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33-240-087-410. Fax: +33-240-087-411. Email: [Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr](mailto: Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr)

ABSTRACT

Donor-specific tolerance to heart allograft in the rat can be achieved by donor-specific blood transfusions (DST) before transplantation. We previously showed that this tolerance is associated with a strong leucocyte infiltration and that host CD8⁺ T-cells and TGFβ are required. In order to identify new molecules involved in the induction phase of tolerance, we looked for differentially expressed genes between tolerated and rejecting allografts using suppressive subtractive hybridization.

We identified Follistatin-like 1 (FSTL1) transcript as being overexpressed in tolerated allografts compared to rejecting allografts or syngenic grafts. We show that FSTL1 is overexpressed during both the induction and maintenance phase of tolerance and appears specific of the model of tolerance induced by DST.

Analysis of graft-infiltrating cells reveals a predominant expression of FSTL1 in CD8⁺ T-cells from tolerated grafts. Finally, when overexpressed by gene transfer *in vivo*, FSTL1 prolongs allograft survival. Taken together, these results suggest that FSTL1 is an active component of the regulatory mechanisms mediating allograft tolerance.

INTRODUCTION

Donor-specific cardiac allograft tolerance can be induced by pregraft presentation of donor antigens via donor-specific blood transfusion (DST) to the host, without the need for further immunosuppression (Souillou et al. 1984). Tolerance induction in this model is an active phenomenon since tolerated allografts are rapidly infiltrated by numerous leukocytes that lack to express either Th1 or Th2-related cytokines but express high levels of the immunosuppressive cytokine TGF β , that is required for tolerance (Josien et al. 1995; Josien et al. 1998). The presence of passenger leucocytes in the graft is necessary to induce tolerance (Josien et al. 1998). Moreover, tolerance induction requires the presence of host CD8⁺ T cells and involves the expansion of a CD8⁺ T cell clone bearing the V β 18-D β 1-J β 2.7 TCR rearrangement (Douillard et al. 1999; Vignes et al. 2000). In order to identify new genes associated with this state of tolerance and further understand the immunological mechanisms underlying tolerance induction, we applied the technique of Suppressive Subtractive Hybridization (SSH) and identified Follistatin-like 1 (FSTL1) as being overexpressed in tolerated allografts at day 5 post transplantation.

FSTL1 also named TSC-36 (TGF- β 1-stimulated clone 36) or FRP (follistatin-related protein) is a secreted glycoprotein sharing the follistatin-like domain with several proteins including Follistatin, Follistatin-related gene protein (FLRG), BM-40/SPARC/osteonectin or SC1/hevin. FSTL1 was initially cloned as a transforming growth factor-beta1-inducible protein (TSC-36) from a mouse osteoblastic cell line (Shibanuma et al. 1993) and a putative role in negative regulation of cell migration and proliferation has been suggested (Sumitomo et al. 2000; Liu et al. 2006). FSTL1 was identified as an autoantigen of synovium in rheumatoid arthritis (Tanaka et al. 1998) and injections of recombinant FSTL1 protein in a mouse model of arthritis showed significant improvement of the arthritis severity (Kawabata et al. 2004).

In this study, we show that FSTL1 is specifically expressed by graft-infiltrating CD8⁺ T cells in a model of allograft tolerance induced by DST. Moreover, we show that FSTL1 overexpression by gene transfer results in prolongation of allograft survival.

MATERIALS AND METHODS

Animals and transplantations.

Six to 10-week-old Lewis and Sprague-Dawley rats were obtained from the Centre d'Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). They were housed in our animal facility under standard conditions in accordance to our institution's regulations on animal care.

LEW.1W (RT1.u) or LEW.1A (RT1.a) rats were used as blood or heart donors, and LEW.1A rats, as allograft recipients. Heterotopic heart transplantations were performed using the Ono and Lindsey technique (Ono et al. 1969). Graft function was monitored daily by palpation through the abdominal wall and rejection was defined as the complete cessation of heart beat and confirmed by histology.

In the DST model, to induce tolerance, allograft recipients were transfused with 1 ml of fresh donor blood 14 and 7 days prior to transplantation, as previously described (Soulillou, Blandin et al. 1984).

In AdCTLA4Ig (Guillot et al. 2000) and AdCD40Ig (Guillot et al. 2002) models, tolerance is induced by adenoviral vector coding for extracellular portion of mouse CTLA4 or CD40 fused to the coding sequences of the constant domains of human IgG1. Gene transfer into the heart have been previously described (Guillot, Mathieu et al. 2000).

In LF15-0195 model, tolerance is induced with a 20 day treatment by injection with LF15-0195, as previously described (Chiffolleau et al. 2002).

Suppressive subtractive hybridization

Subtractive hybridization and differential screening were performed as previously described (Louvet et al. 2004) with mRNAs from tolerated (DST model) and rejected

heart grafts harvested at day 5 post transplantation, using the PCR-Select Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

Real-time quantitative PCR.

Total RNA from tissues or cells was prepared using the TRIzol extraction kit (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed as previously described (Louvet, Heslan et al. 2004) using a GenAmp 7700 Sequence Detection System and SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The following oligonucleotides were used in this study:

rat FSTL1 forward: GAACAACAAACTGCTCAGAGGC;

rat FSTL1 reverse: ACCCAGTGTCCACAGGAACAG;

rat HPRT forward: CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC;

rat HPRT reverse: TTCGCTGATGACACAAACATGA;

rat 18S forward: AGTTCCGACCATAAACGATGC;

rat 18S reverse: CCCTTCCGTCAATTCCTTTAA.

Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) or 18S ribosomal RNA were used as endogenous control genes to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak et al. 2001; Louvet, Heslan et al. 2004), and expressed in arbitrary units.

Antibodies

The following hybridomas anti rat mAbs were obtained from the European Collection of Animal Cell Culture (Salisbury, U.K.) and were used in cell depletion, in cytofluorometric and cell sorting after coupling if necessary to FITC, biotin, PE and APC (Bioatlantic, Nantes, France) or Alexa-647 (Molecular Probes): OX6 (MHC class II RT1B), OX35 (CD4), OX8 (CD8 α), OX42 (CD11b/c), R7/3 (TCR $\alpha\beta$), OX62

(intergrin α E2 chain or CD103), OX33 (anti-CD45 present on B cells), OX39 (CD25, IL-2R α -chain), CD161a (clone 3.2.3). Alternatively His 24 (CD45R) and CD3 (clone KT3) were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), and anti-FSTL1 (Goat anti rat) from Santa Cruz Biotechnology inc. (Santa Cruz, CA, USA). Secondary Abs included biotin-conjugated anti-goat IgG, HRP-conjugated streptavidin, and VIP substrate, purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

Cell separations

Dendritic cells. Total CD103⁺ DCs were selected using OX62-MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France), as previously described (Voisine et al. 2002; Hubert et al. 2004).

B cells. Mononuclear spleen cells were selected on a Ficoll gradient (Amersham, Les Ulis, France). T-cell depletion was achieved by using anti-TCR $\alpha\beta$, anti-TCR $\gamma\delta$ MAbs, and anti-mouse IgG-coated magnetic beads (DynaI, Oslo, Norway). B cells (TCR⁻ CD4⁻ CD45R⁺) were then purified by FACSAria flow cytometer using anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC, anti-CD45R-PE, and anti-CD4-APC MAbs. The resultant purity of sorted cells was >95%.

NK cells. Spleen NK cells (CD8⁺/CD161a^{high}) were sorted by FACSAria flow cytometer using biotinylated anti-CD8-FITC and anti-CD161a MAbs. The resultant purity of sorted cells was >95%.

Monocytes. Mononuclear blood cells were isolated on a Ficoll density gradient. Monocytes were obtained after negative selection through an incubation of cells with an anti-MHC II⁺, an anti-CD103, and an anti-CD2 MAb, followed by incubation with anti-mouse IgG-coated magnetic beads.

T cells. T cells were prepared from spleen using nylon wool columns (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). T cells were obtained after depletion using anti-His24 and anti-OX42 MAbs with anti-mouse IgG-coated magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway). Purity was routinely $\geq 95\%$.

Graft Infiltrating Cells (GIC). Heart allografts were isolated, chopped into small pieces and digested in 2 mg/ml collagenase (Boehringer Mannheim) in RPMI 1640 1% FCS for 30 min at 37°C. EDTA at 10 mM was added for the last 5 min, and the cell suspension was then pipetted up and down several times and gently pressed through a stainless steel mesh, and filtered. Mononuclear cells were then isolated using density gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Sweden).

CD4⁺ CD8⁺ GICS. CD8⁺ T GICs were purified by negative and positive selection. Briefly, GICS were incubated with a cocktail of mouse anti-rat antibodies: Ox6 (anti-class II), ED3 (recognizing macrophages), W3/25 (anti-CD4) or alternatively with Ox8 (anti CD8), and Ox33 (anti-CD45 present on B cells). Cells were then incubated with super paramagnetic beads covalently bound to affinity-purified Goat-anti-mouse IgG (Dynal, Oslo, Norway), and antibody-bound cells removed with a magnet.

In vivo CD8⁺ cell depletion

DST-treated recipients were further treated with intraperitoneal injections of 1.5 mL of Ox8 supernatant (anti-CD8) 16, 9, 3, and 1 day before transplantation as previously described (Douillard, Vignes et al. 1999).

Recombinant adenovirus

An adenovirus coding for FSTL1 was constructed using the pAdEasy and pAdTrack-CMV system in 293 cells (He et al. 1998). The cDNA sequence for rat FSTL1 was

placed under control of the human CMV promoter. Empty adenovirus (AdControl) was used as control. Recombinant adenoviruses were purified and tittered as previously described (Guillot, Guillonneau et al. 2002).

Western blot analysis

Serums were resolved by SDS-PAGE gradient (7.5-15 %) and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (ECL Hybond; Amersham, Les Ulis, France) using a Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were then subjected to western immunoblot analysis using anti-FSTL1 and anti-goat peroxidase-conjugated secondary antibodies. Antibody-bound proteins were detected using an enhanced chemiluminescence ECL Western blotting analysis system (Amersham, Les Ulis, France) and the membranes were exposed to Kodak X-Omat LS x-ray film. Blot quantification was performed with Kodak Digital Science Image Station 440 CF and Kodak Digital Science Image Analysis 1D software.

Statistical analysis

Real time quantitative PCR data were analysed using the non-parametric Mann-Whitney test. *p* values < 0.05 were considered significant. Allografts survivals were analyses with Logrank test.

RESULTS

FSTL1 is over-expressed in tolerated allografts induced by DST.

By Suppressive Subtractive Hybridization, we identified FSTL1 clearly over-expressed in heart allografts from DST recipient compared to untreated rejecting allografts, five days after transplantation. In order to confirm these results, we applied RT-PCR analysis on whole allografts. As we can see in Figure 1, five days after transplantation, large amounts of FSTL1 mRNA were accumulated in tolerated (n=4) allografts when compared to rejected allografts (n=4, p=0.028) or syngeneic grafts (n=3). The level of FSTL1 mRNA is similar in rejected allografts than in the syngeneic ones demonstrating that FSTL1 is not a molecule induced by activation/inflammation. Moreover, we show that FSTL1 mRNA expression is still elevated at 100 days after transplantation in allografts from DST-treated recipients compared to syngeneic ones (n=6, p=0.041) and is not found to be upregulated in other models where acute rejection is prevented by different treatments (LF15-0195, CD40Ig or CTLA-4 Ig) (Guillot, Mathieu et al. 2000; Chiffolleau, Beriou et al. 2002; Guillot, Guillonneau et al. 2002). These results demonstrate that FSTL1 is specially induced in the DST model and that is not related to inflammation/activation mechanisms.

FSTL1 mRNA is specifically expressed by graft infiltrating T leukocyte.

In order to characterize FSTL1 expression in rats, mRNA expression of FSTL1 was analysed in various tissues from naive rats by RT PCR (Figure 2). Aorta, heart, and lung exhibited the highest FSTL1 mRNA expression. FSTL1 is expressed at a lower extent, in testis, kidney, brain, skeletal muscle, colon, spleen, and lymph nodes. Very low expressions were detected in liver, intestine, bone marrow, thymus and peripheral blood leucocytes. The low expression of FSTL1 in lymphoid organs and the very low expression in blood leukocytes suggest that FSTL1 is not constitutively

expressed in leukocytes at a quiescent state. Indeed, very low level of FSTL1 mRNA was detected in freshly isolated spleen DCs, monocytes, NK, B or CD4⁺ and CD8⁺ T cells from naïve rats. However, high level of FSTL1 mRNA were assessed in graft infiltrating leucocytes from tolerated allografts (n=4) compared to the ones from rejected allografts (n=5) (6 fold) (Figure 3, p=0.0159). Interestingly, when the GICs from tolerated grafts were depleted from their T-cells, the FSTL1 overexpression is lost and the levels were comparable to those of untreated rejecting recipients (Figure 3A) (n=4, P<0.0286). Our results suggest that FSTL1 is specifically expressed by T-cells infiltrating allograft from tolerated recipients during the induction phase of tolerance.

FSTL1 is specifically expressed in CD8⁺ T cells infiltrating the allografts.

The analysis of T-cells sub-populations of the GICs showed the restricted overexpression within the T CD8⁺ cells from tolerated allografts while nor CD4⁺ cells from tolerated nor CD4⁺ or CD8⁺ cells from rejected recipient expressed FSTL1 (Figure 3B). The expression of FSTL1 seems to be specific of T CD8⁺ cells from GICs and would be induced only by DST treatment. We have previously showed (Douillard, Vignes et al. 1999) that a population of CD8⁺ T cells induced by DST was required for the induction of tolerance. We then analyse FSTL1 mRNA expressions in allogeneic graft from in vivo T CD8⁺ cells depleted DST treated recipients (in this condition the allograft is rejected) (Figure 4). Our results show that CD8⁺ depletion decrease FSTL1 mRNA expression, reaching the levels of syngeneic or rejected recipients (n=3 p=0.0107). This data demonstrate that FSTL1 is produced by the CD8⁺ T cells that infiltrate the allografts. However, we have not been able with a polyclonal antibody to have a clear staining on tolerated allograft (data not shown).

FSTL1 overexpression prolongs allograft survival

To test in vivo the hypothesis of a immunomodulatory role of FSTL1, we analysed the effect of intravenous administration the day of the transplantation of rat FSTL1-coding adenovirus on allograft survival (Figure 5A). Rejection in untreated recipients or control (empty) adenovirus-treated recipients occurred within 6.8 ± 1.6 days (n=5) and 7.2 ± 0.5 days (n=4), respectively. Allograft survival was significantly prolonged to 13 ± 3.2 days, (n=4, $p < 0.05$) in rats receiving an adenovirus coding for rat recombinant FSTL1 (rFSTL1).

In order to estimate the efficacy and kinetic of rFSTL1 protein expression mediated by adenovirus, we assessed FSTL1 accumulation in the serum of injected rats by western blot at different days after transplantation. As shown in Figure 5B, FSTL1 protein expression was high at day 5 post-transplantation but markedly decreased at day 12 and was no longer detectable at day 16. Thus, FSTL1 appears to be only transiently highly expressed suggesting a deleterious immune response against adenovirus-infected cells producing FSTL1.

These results demonstrate an active immunomodulatory role of FSTL1 and reinforce the idea of its role in allograft tolerance induced by DST.

DISCUSSION

To better understand the mechanisms involved in the tolerance induced by DST, we have applied the Suppressive Subtractive Hybridization technique and identified FSTL1 as overexpressed in tolerated allografts

By quantitative RT-PCR, we showed that FSTL1 expression is induced during the first week after transplantation in tolerated allograft and is still high up to 100 days after transplantation. Moreover, FSTL1 expression is specific to the DST model, suggesting an active role of FSTL1 in the induction and the maintenance of the tolerance state induced by DST treatment.

Interestingly, weak expression of FSTL1 mRNA was observed in lymphoid organ or in different subpopulations of freshly isolated leukocytes from naïve rats but a high mRNA expression was observed specifically in graft infiltrating CD8⁺ T leucocytes from tolerated allografts demonstrating that FSTL1 expression can be induced in leucocytes under specific conditions.

Importantly, a single administration of adenovirus encoding FSTL1 is able to prolong significantly allograft survival up to 13 days demonstrating an immuno-modulatory role of FSTL1.

We previously showed that CD8 depletion before the DST and transplantation abrogated allograft tolerance (Douillard, Vignes et al. 1999) demonstrating that CD8⁺ T cells are essential for the induction of tolerance in DST model. As we show in this study that FSTL1 expression is specifically expressed by CD8⁺ T cells in allografts from DST treated animals, FSTL1 could play a role in the induction of tolerance.

The rearrangement and the fast infiltration in graft after transplantation of Vb18-Db1-Jb2.7 clone, suggest a regulatory functions of this clone (Douillard, Vignes et al. 1999). The apparition of this clone being in the same time to the expression of

FSTL1, we can suggest that this clone can be responsible for the expression of FSTL1.

FSTL1 was initially identified like a TGF β induced gene in a murine osteoblastic cell line (Shibanuma, Mashimo et al. 1993). Because of this positive regulation by TGF β , the expression of FSTL1 in GICs of the tolerant animals is particularly interesting. Indeed, in this model of tolerance induced by DST, the role of TGF β was clearly shown (Josien, Douillard et al. 1998). The tolerated allografts express strong quantities of TGF β mRNA, like its active protein form and injection of a neutralizing anti-TGF β antibody abrogate the tolerance in the rats treated by DST (Josien, Douillard et al. 1998). Therefore, the expression of FSTL1 could be induced by TGF β and play a subsequent role in the induction of tolerance in this model. We assessed FSTL1 expression in T cells stimulated by anti CD3 and anti CD28 in the presence of TGF β but we did not observed any induction of FSTL1 in these experimental conditions (data not shown). In vitro stimulation of T cell in the presence TGF β is not sufficient to induce FSTL1 expression and may require additional factors. These suggest that particular mechanisms induced by the DST treatment are necessary to induce the expression of FSL1 in CD8⁺ T cells infiltrating the allografts.

FSTL1 was identified as an autoantigen of synovium in rheumatoid arthritis (Tanaka, Ozaki et al. 1998) and accumulation of FSTL1 and its inductor (TGF β), have been observed during the development of arthritis (Thornton et al. 2002; Kawabata, Tanaka et al. 2004). In this model, injections of recombinant FSTL1 protein have a significant effect on the arthritis severity and notably decrease the inflammatory symptoms of this disease (Kawabata, Tanaka et al. 2004). Although some studies described a pro-inflammatory role of FSTL1 (Takako et al. 2006), FSTL1 could also play an immunomodulatory role of the inflammatory response (Kawabata, Tanaka et al. 2004). An immunoregulator effect of FSTL1 is also consolidated by the putative

role in negative regulation of migration and proliferation of cells (Sumitomo, Kurisaki et al. 2000; Liu, Wang et al. 2006). Like FSTL1, TGF β has been showed to have an opposing role in inflammation. In some studies autors have shown a pro-inflammatory role of TGF β (Fava et al. 1991; Wahl et al. 1993; Cheon et al. 2002) and other studies have been shown to have an anti-inflammatory effect of TGF β (Lafyatis et al. 1989; Chen et al. 1998; Song et al. 1998). In DST, we think that FSTL1, like TGF β could have an important role in the immunoregulatory alloresponse.

Therefore, in our DST model, the specific expression of FSTL1 by T CD8⁺ GICs, could be implicated in an active process of tolerance induction, and could be dependant of the TGF β expression.

The prolongation of allograft survival with a single injection of adenovirus coding for FSTL1 recombinant protein is encouraging. We showed that the level of FSTL1 secretion decrease rapidly after infection probably due to the anti-Adeno response, as has been shown in other models (Thomas et al. 2003; Anegon et al. 2004; Zaiss et al. 2005).

In conclusion, we have shown in this study a strong expression of FSTL1 by graft infiltrating CD8⁺ T cells in a model of induction of allograft tolerance in which TGF β play an important role. This study reinforce the idea that expression of FSTL1 is closely associated with the presence of TGF β and the prolongation of allograft survival by FSTL1 protein suggest that as TGF β , FSTL1 may play an immunomodulatory role in the immune response and in inflammation.

REFERENCES

- Anegon, I., C. Guillonneau, M. Hill and C. Chauveau (2004). "Application of gene transfer technologies to transplantation." *Ther Drug Monit* **26**(3): 248-50.
- Chen, S., K. B. Bacon, L. Li, G. E. Garcia, Y. Xia, D. Lo, D. A. Thompson, M. A. Siani, T. Yamamoto, J. K. Harrison and L. Feng (1998). "In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II." *J Exp Med* **188**(1): 193-8.
- Cheon, H., S. J. Yu, D. H. Yoo, I. J. Chae, G. G. Song and J. Sohn (2002). "Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals." *Clin Exp Immunol* **127**(3): 547-52.
- Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soullillou 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**(8): 745-57.
- Douillard, P., C. Vignes, R. Josien, E. Chiffolleau, J. M. Heslan, V. Proust, J. P. Soullillou and M. C. Cuturi (1999). "Reassessment of the role of CD8+ T cells in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion." *Eur J Immunol* **29**(6): 1919-24.
- Fava, R. A., N. J. Olsen, A. E. Postlethwaite, K. N. Broadley, J. M. Davidson, L. B. Nanney, C. Lucas and A. S. Townes (1991). "Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia." *J Exp Med* **173**(5): 1121-32.
- Guillot, C., C. Guillonneau, P. Mathieu, C. A. Gerdes, S. Menoret, C. Braudeau, L. Tesson, K. Renaudin, M. G. Castro, P. R. Lowenstein and I. Anegon (2002). "Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40lg results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection." *J Immunol* **168**(4): 1600-9.
- Guillot, C., P. Mathieu, H. Coathalem, B. Le Mauff, M. G. Castro, L. Tesson, C. Usal, T. Laumonier, S. Brouard, J. P. Soullillou, P. R. Lowenstein, M. C. Cuturi and I. Anegon (2000). "Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4lg expression." *J Immunol* **164**(10): 5258-68.
- He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "A simplified system for generating recombinant adenoviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2509-14.
- Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, M. Heslan and R. Josien (2004). "Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+

- CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG." J Immunol **172**(12): 7485-94.
- Josien, R., P. Douillard, C. Guillot, M. Muschen, I. Anegon, J. Chetritt, S. Menoret, C. Vignes, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1998). "A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance." J Clin Invest **102**(11): 1920-6.
- 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**(12): 4539-44.
- Josien, R., C. Pannetier, P. Douillard, D. Cantarovich, S. Menoret, L. Bugeon, P. Kourilsky, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1995). "Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats." Transplantation **60**(10): 1131-9.
- Kawabata, D., M. Tanaka, T. Fujii, H. Umehara, Y. Fujita, H. Yoshifuji, T. Mimori and S. Ozaki (2004). "Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis." Arthritis Rheum **50**(2): 660-8.
- Lafyatis, R., E. F. Remmers, A. B. Roberts, D. E. Yocum, M. B. Sporn and R. L. Wilder (1989). "Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids." J Clin Invest **83**(4): 1267-76.
- Liu, S., L. Wang, W. Wang, J. Lin, J. Han, H. Sun, H. Guo, R. Sun and Q. Wu (2006). "TSC-36/FRP inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration." Exp Mol Pathol **80**(2): 132-40.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Louvet, C., J. M. Heslan, E. Merieau, J. P. Souillou, M. C. Cuturi and E. Chiffolleau (2004). "Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion." Transplantation **78**(9): 1259-66.
- Ono, K. and E. S. Lindsey (1969). "Improved technique of heart transplantation in rats." J Thorac Cardiovasc Surg **57**(2): 225-9.
- Shibanuma, M., J. Mashimo, A. Mita, T. Kuroki and K. Nose (1993). "Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide." Eur J Biochem **217**(1): 13-9.

- Song, X. Y., M. Gu, W. W. Jin, D. M. Klinman and S. M. Wahl (1998). "Plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 suppresses chronic disease in a streptococcal cell wall-induced arthritis model." J Clin Invest **101**(12): 2615-21.
- Soulillou, J. P., F. Blandin, E. Gunther and V. Lemoine (1984). "Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats." Transplantation **38**(1): 63-7.
- Sumitomo, K., A. Kurisaki, N. Yamakawa, K. Tsuchida, E. Shimizu, S. Sone and H. Sugino (2000). "Expression of a TGF-beta1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines." Cancer Lett **155**(1): 37-46.
- Tanaka, M., S. Ozaki, F. Osakada, K. Mori, M. Okubo and K. Nakao (1998). "Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases." Int Immunol **10**(9): 1305-14.
- Thomas, C. E., A. Ehrhardt and M. A. Kay (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." Nat Rev Genet **4**(5): 346-58.
- Thornton, S., D. Sowders, B. Aronow, D. P. Witte, H. I. Brunner, E. H. Giannini and R. Hirsch (2002). "DNA microarray analysis reveals novel gene expression profiles in collagen-induced arthritis." Clin Immunol **105**(2): 155-68.
- Vignes, C., E. Chiffolleau, P. Douillard, R. Josien, H. Peche, J. M. Heslan, C. Usal, J. P. Soulillou and M. C. Cuturi (2000). "Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8+ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion." J Immunol **165**(1): 96-101.
- 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**(5): 2284-91.
- Wahl, S. M., J. B. Allen, G. L. Costa, H. L. Wong and J. R. Dasch (1993). "Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta." J Exp Med **177**(1): 225-30.
- Zaiss, A. K. and D. A. Muruve (2005). "Immune responses to adeno-associated virus vectors." Curr Gene Ther **5**(3): 323-31.

FOOTNOTES

¹ This work was supported by a grant from the Juvenile Diabetic Foundation. J.B.L.L. was supported by a fellowship from the Juvenile Diabetic Foundation, “La société francophone de transplantation” and “La fondation Progreffe”.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Maria Cristina Cuturi, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 643, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. E-mail address: **Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr**

³ Abbreviations used in this paper: Follistatin-like 1 (FSTL1), Graft infiltrating cells (GIC), peripheral blood lymphocytes (PBL), Donor specific transfusion (DST).

LEGENDS to FIGURES

Figure 1. FSTL1 mRNA expression in heart allografts.

Syngeneic and allogeneic, rejecting and tolerated grafts were harvested at different time-points after transplantation. Allogeneic grafts from untreated recipients were rejected within 6.8 ± 1.6 days. Tolerance was induced by donor-specific blood transfusion (DST), LF15-0195, Adenovirus CD40Ig (Ad.CD40Ig) or Adenovirus CTLA4Ig (Ad.CTLA4Ig) (see materials and methods). FSTL1 mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR and normalized to 18S rRNA expression. Results are expressed in arbitrary units (AU) where 1 is the expression in normal hearts. Results represent the mean \pm SD of 3 to 5 animals in each group. Significant differences are indicated ($*p < 0.05$).

Figure 2. Expression of FSTL1 mRNA in rat tissues and organs.

Expression of FSTL1 mRNA in various rat tissues was assessed by real-time quantitative PCR. FSTL1 mRNA levels were normalized to 18S rRNA and expressed in arbitrary units (AU). PBL: peripheral blood lymphocytes.

Figure 3. FSTL1 mRNA expression in naive cells and in graft-infiltrating cells (GICs).

FSTL1 mRNA expression in purified leukocytes was assessed by real time PCR, normalized by HPRT mRNA and expressed in arbitrary units (AU). Results are expressed as the mean \pm SD of AU in each group. Significant differences are indicated ($*p < 0.05$). **(A)** FSTL1 mRNA expression in purified naive cells, GICs from rejecting (n=5) and tolerated (n=4) heart allografts, and in T-depleted GICs from tolerated allografts (n=4) on day 5 after transplantation. **(B)** FSTL1 mRNA expression

in purified T cells from rejecting and tolerated heart allografts, on day 5 after transplantation.

Figure 4. FSTL1 mRNA expression in heart allografts from OX8-depleted rats.

Allogeneic grafts were harvested 5 days after transplantation from untreated (rejecting), DST-treated (tolerated) and OX8+DST (CD8⁺-cell depletion, rejecting) recipients. FSTL1 mRNA expression in purified leucocytes was assessed by real time PCR, normalized by HPRT mRNA and expressed in arbitrary units (AU). Results represent the mean \pm SD of 3 animals in each group. Significant differences are indicated (* p <0.05).

Figure 5. Survival of allografts in AdFSTL1 treated animals and FSTL1 protein expression in serum of peripheral blood

LEW.1A rats received allogeneic LEW.1W hearts and were treated intravenously the same day with either control (n=5) or FSTL1 (n=4) adenovirus (2.5×10^{10} infectious particles). **(A)** Graft survival was monitored daily through abdominal palpation. Rejection was defined when beating of the transplanted heart could no longer be detected. (* p <0.05 AdFSTL1 vs. AdControl). **(B)** FSTL1 protein expression in serum of transplanted rats was assessed by Western Blot, 0, 5, 12 and 16 days after injection with AdFSTL1 (1) or AdControl (2). These data are representative of three different experiments.

Figure 1

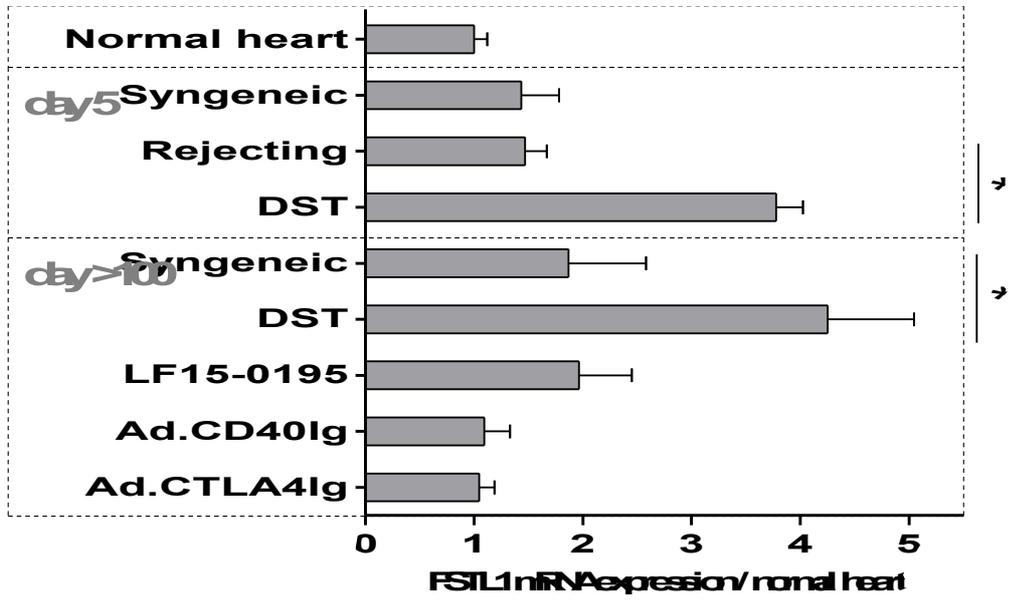


Figure 2

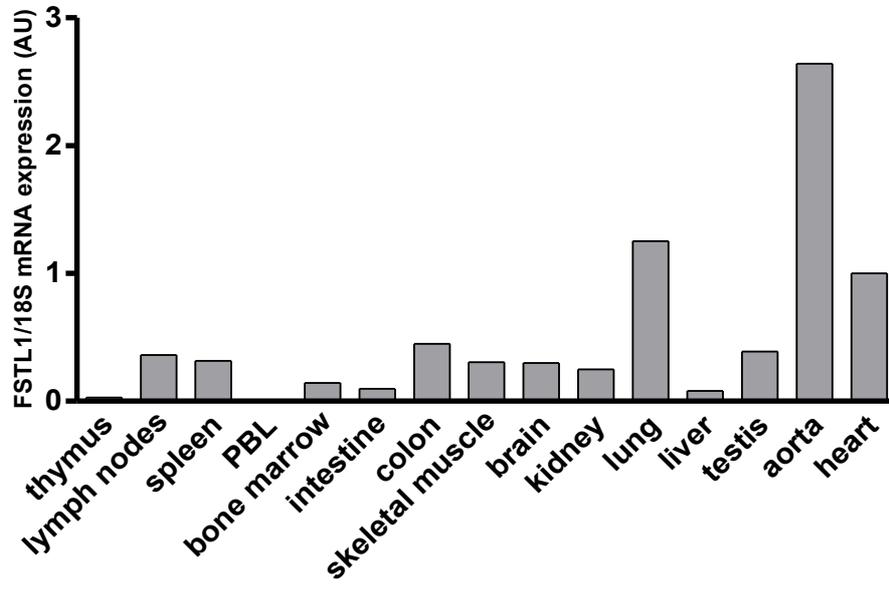


Figure 3

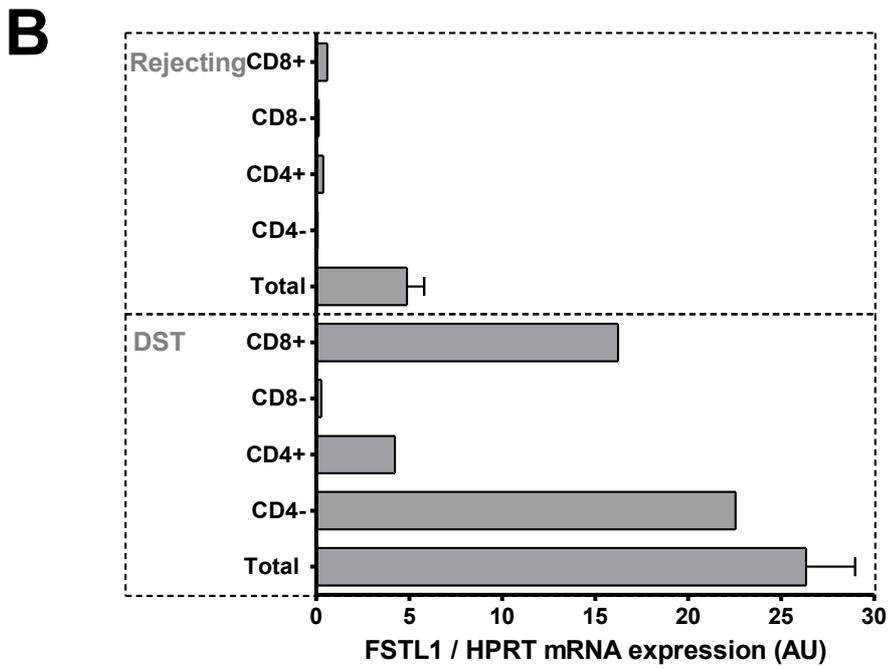
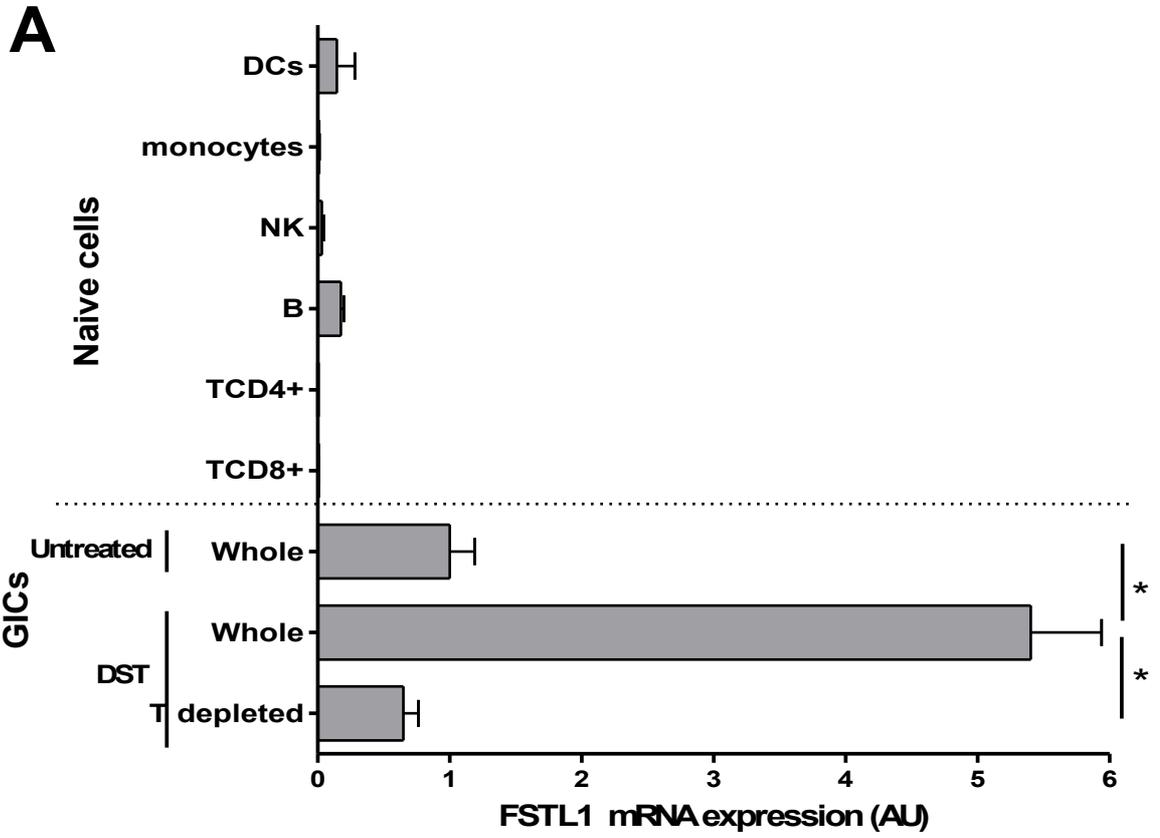


Figure 4

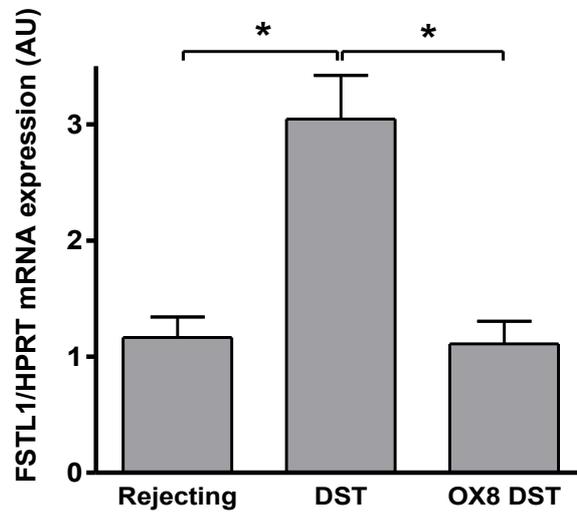
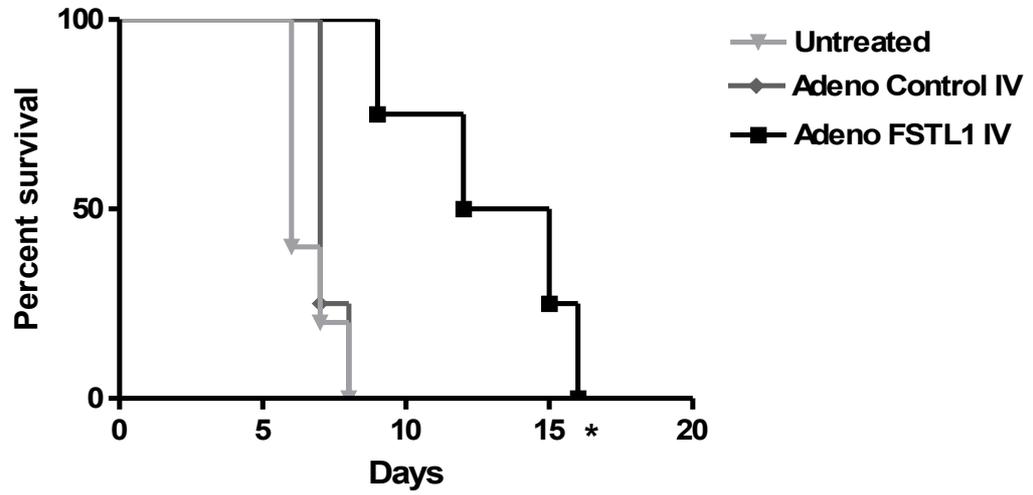
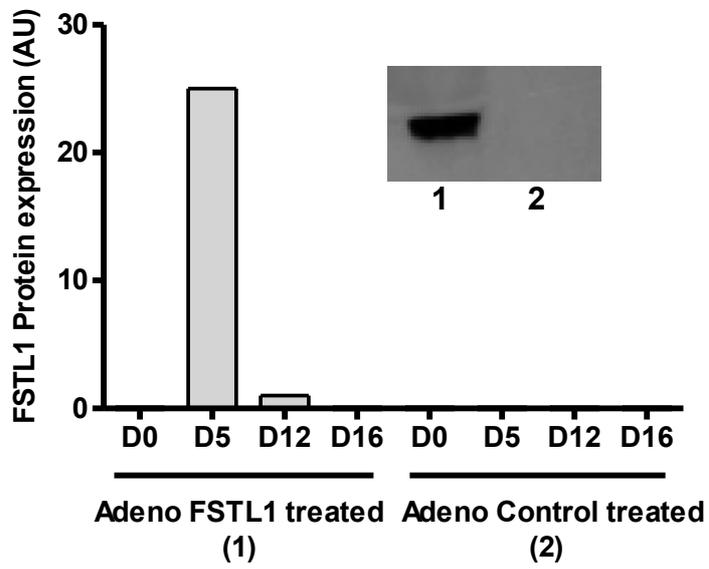


Figure 5

A



B



III Discussion et perspectives

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la tolérance induite par TSD nous avons appliqué la technique d'Hybridation Soustractive Suppressive et identifié FSTL1 surexprimé dans les allogreffes des animaux tolérants.

Nous avons montré par PCR quantitative que FSTL1 est induit durant la première semaine après la transplantation dans la greffe tolérée et qu'il reste fortement exprimé 100 jours après la transplantation. Nous montrons également que l'expression de FSTL1 paraît spécifique du modèle de TSD, ce qui suggère un rôle actif de cette molécule dans l'induction et la maintenance de la tolérance induite par TSD.

De manière surprenante, nous avons observé une faible expression de FSTL1 dans les organes lymphoïdes ainsi que dans les différentes sous-populations leucocytaires d'animaux naïfs. Tandis que nous avons trouvé une expression spécifique de FSTL1 dans les lymphocytes T CD8⁺ infiltrant le greffon des animaux tolérants, montrant ainsi que l'expression de FSTL1 peut être induite dans les lymphocytes sous certaines conditions particulières.

Nous avons également montré qu'une injection unique d'adénovirus codant pour FSTL1 prolonge significativement la survie de l'allogreffe au delà de 13 jours, démontrant un rôle immuno-modulateur de FSTL1

Nous avons précédemment montré que la déplétion des cellules CD8 avant le traitement par TSD et la transplantation empêche la tolérance à l'allogreffe (Douillard, Vignes et al. 1999), démontrant ainsi que les LT CD8⁺ sont indispensables pour l'induction de tolérance dans notre modèle de TSD. Nous montrons maintenant que l'expression de FSTL1 est spécifique aux LT CD8⁺ issus de la greffe des animaux tolérants traités par TSD, ce qui suggère que FSTL1 pourrait jouer un rôle dans l'induction de tolérance.

Le réarrangement, puis l'infiltration rapide dans la greffe après la transplantation d'un clone Vb18-Db1-Jb2.7 suggère une fonction régulatrice de ce clone (Douillard, Vignes et al. 1999). Le fait de l'apparition de ce clone de manière synchrone avec l'expression de FSTL1 dans la greffe, nous amène à suggérer que ce clone pourrait être responsable de l'expression de FSTL1.

FSTL1 a initialement été identifié comme une molécule induite par le TGF- β dans une lignée d'ostéoblastes murins (Shibanuma et al. 1993). Du fait de cette régulation, l'expression de FSTL1 par les cellules infiltrant la greffe des animaux tolérants dans notre modèle de TSD paraît particulièrement intéressante, puisque dans ce modèle notre équipe a montré que le TGF- β joue un rôle essentiel dans la tolérance (Josien, Douillard et al. 1998). L'allogreffe tolérée exprime une forte quantité d'ARNm codant pour le TGF- β , ainsi que sa forme

protéique active. De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-TGF- β chez les rats tolérants induit par TSD rompt la tolérance (Josien, Douillard et al. 1998). Par conséquent, l'expression de FSTL1 pourrait être induite par le TGF- β et jouer un rôle durant l'induction de tolérance dans notre modèle. Nous avons essayé d'induire l'expression de FSTL1 dans des LT en les stimulant avec anti CD3 anti CD28 en présence de TGF- β , mais nous n'avons pas obtenu d'induction de FSTL1 comparable à celles obtenues dans les greffons des animaux tolérés. In vitro, la stimulation des LT en présence de TGF- β n'est donc pas suffisante pour induire l'expression de FSTL1 et pourrait nécessiter des facteurs additionnels. Ceci suggère que des mécanismes particuliers sont induits lors de la TSD, qui sont nécessaires pour induire l'expression de FSTL1 dans les LT CD8+ infiltrant les allogreffes. Il serait intéressant d'essayer d'induire FSTL1 avec le TGF- β , par des stimulations en MLR avec ou sans traitement préalable des animaux par TSD. La présentation préalable des alloantigènes étant peut-être nécessaire pour mettre en place les mécanismes d'induction de l'expression de FSTL1.

FSTL1 a été identifié en tant qu'auto-antigène dans la synovie chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Tanaka et al. 1998), et l'accumulation de FSTL1 et de son inducteur (TGF- β) a été observée pendant le développement de la maladie dans un modèle d'arthrite chez la souris (Thornton et al. 2002; Kawabata et al. 2004). Dans ce modèle, l'injection de protéine recombinante FSTL1 a un effet bénéfique sur la sévérité de la maladie et notamment au niveau des symptômes inflammatoires de celle-ci (Kawabata, Tanaka et al. 2004). Bien que certaines études ont décrit un rôle pro-inflammatoire de FSTL1 (Takako et al. 2006), FSTL1 pourrait aussi jouer un rôle immunorégulateur de la réponse inflammatoire (Kawabata, Tanaka et al. 2004). Un effet immunorégulateur de FSTL1 est aussi renforcé par l'observation de son effet inhibiteur sur la migration et la prolifération de certains types cellulaires (Sumitomo et al. 2000; Liu et al. 2006).

Comme FSTL1, le TGF- β a été montré comme ayant un rôle dans l'inflammation. Dans certaines études, il a été montré un rôle pro-inflammatoire du TGF- β (Fava et al. 1991; Wahl et al. 1993; Cheon et al. 2002), alors que d'autres études décrivent un effet anti-inflammatoire de celui-ci (Lafyatis et al. 1989; Chen et al. 1998; Song et al. 1998). Dans notre modèle de TSD, nous pensons que FSTL1, comme le TGF- β , pourrait avoir un rôle important dans la régulation de la réponse allogénique. Par conséquent, l'expression spécifique de FSTL1 par les GICs T CD8+, pourrait être impliquée dans un processus actif d'induction de tolérance et pourrait être dépendante de l'expression du TGF- β .

La prolongation de survie de l'allogreffe après une injection unique d'adénovirus codant pour la protéine FSTL1 recombinante est intéressante. Nous avons montré que le niveau de FSTL1 secrété, décroît rapidement après l'infection, ce qui est probablement dû à une

réponse anti-adénovirus comme il l'a été montré dans d'autres modèles (Thomas et al. 2003; Anegon et al. 2004; Zaiss et al. 2005). Afin de résoudre ce problème, nous sommes en train de produire une protéine recombinante codant pour FSTL1 et nous allons tester si un traitement journalier avec cette protéine pourrait retarder la réponse immune contre l'allogreffe et prévenir le rejet. Nous allons également produire un AAV (Adeno-Associated Virus) codant pour FSTL1, qui est moins immunogène que l'adénovirus. Enfin, nous allons produire un anticorps monoclonal bloquant contre FSTL1 pour confirmer le rôle actif de cette molécule dans les mécanismes de tolérance.

Afin de produire et purifier la protéine recombinante, nous avons fait une construction en fusionnant un peptide Flag à la protéine native de rat sur le même modèle que la construction employée par Tanaka et al. pour tester l'effet de FSTL1 dans un modèle d'arthrite rhumatoïde chez la souris (Tanaka et al. 2003). Ils ont montré que avec cette construction avec le Flag en N Terminal de la séquence protéique, ils avaient un effet actif de la protéine *in vivo* (Kawabata, Tanaka et al. 2004). La figure 23A montre une schématisation de la construction réalisée, que nous avons effectuée à partir d'un système d'amorces nucléotidiques chevauchantes codant pour un peptide signal d'adressage extracellulaire de la protéine (prepropepsinogène), puis le Flag et le début de la séquence de FSTL1 de rat (Figure 23B). Une fois amplifié par PCR, nous avons cloné le cDNA codant obtenu dans un vecteur d'expression eucaryote (pcDNA3.1).

A

PS-FLAG-rFSTL1 = 313 aa >>> FLAG-rFSTL1 = 298 aa (33,7 Kd)

PS: 15 aa
 FLAG: 8 aa
 linker: 2 aa
 rFSTL1: 288 aa



B

CONSTRUCTION par PCR:
 3 primers chevauchants pour HindIII-PS-FLAG-rFSTL1... et primer reverse pour fin rFSTL1
 ...*TAAG-XhoI
 PFFa:45 mers : AAGCTTCACCATGTCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTGGAGC
 PFFb:50 mers : TCCTAGCTCTTGTGGAGCTGCAGTTGCTGACTACAAAGACGATGACGAC
 PFFc:51 mers : GACTACAAAGACGATGACGACAAAGGATCCGAGGAGGAACAAAGAAGCAAA
 PFFa/b:19 mers et Td=59,4°C - PFFb/c:21 mers et Td=58,7°C
 Spé de FSTL1 (sur PFFc) : 21 mers et Td=63,2°C
 rFSTL1-Xh-Lo: CTCGAGCTTAGATCTCTTTGGTGTTCACCT, Partie spé/rFSTL1 : 24 mers et Td=63,3°C
 Amplicon de 959 pb encadré par HindIII et XhoI.

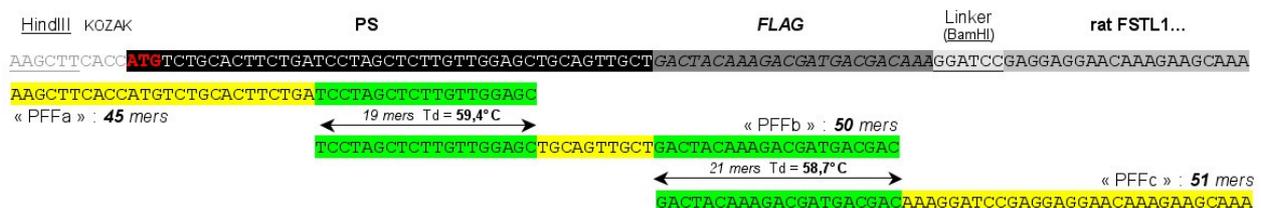


Figure 23 : Construction de la protéine de fusion. **A.** Cartographie de la protéine PS-Flag-FSTL1 **B.** Stratégie de construction de la protéine recombinante par des amorces chevauchantes.

Nous avons ensuite produit la protéine recombinante en transfectant une lignée adhérente de cellules embryonnaire de rein humain (lignée 2.93). La figure 24 expose les résultats obtenus par Western Blot et montre l'efficacité de la transfection cellulaire, qui permet la production de la protéine recombinante au niveau des cellules, mais aussi et surtout dans le surnageant cellulaire. Nous avons finalement purifié la protéine sur colonne anti-flag M2 (ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel ; Sigma).



Figure 24 : Mesure de l'expression protéique de FSTL1-flag par Western Blot dans les cellules et le surnageant des cellules 2.93 transfectées avec le plasmide codant pour FSTL1-flag. La présence de la protéine est marquée par un anti-Flag M2 Biotinylé, lui même révélé par la Streptavidine peroxydase.

Nous avons également commencé à utiliser cette protéine recombinante pour étudier l'effet de FSTL1 sur les mécanismes de la réponse immune et caractériser les cellules cibles de cette molécule. Pour cela nous avons commencé par mesurer l'effet de la protéine recombinante sur une stimulation par anti-CD3 (1µg/mL) de cellules ganglionnaires, en mesurant l'effet de différentes doses de FSTL1. Les résultats obtenus sont exposé dans la figure 25.

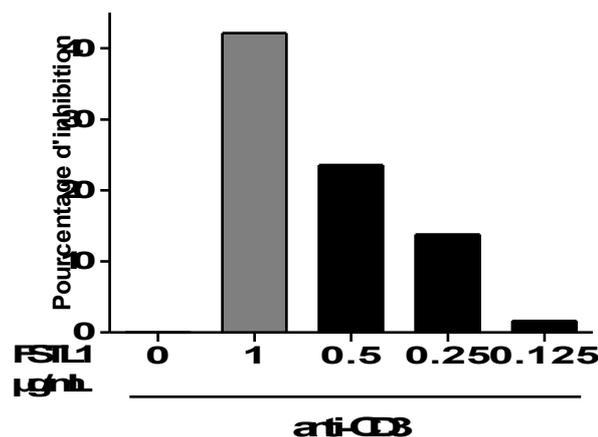


Figure 25 : Mesure de l'effet la protéine FSTL1 recombinante sur la prolifération cellulaire de ganglions totaux stimulés avec anti-CD3 (1µg/mL). Les concentrations de FSTL1 sont exprimées en µg/mL. La prolifération est contrôlée par incorporation de thymidine pendant les dernières 8h d'une culture de 48h. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition.

Les premiers résultats obtenus nous montrent que FSTL1 a un rôle inhibiteur dose dépendante sur la prolifération des cellules T activées. Ces résultats vont dans le même sens que les résultats précédemment obtenus, et qui montraient l'effet antiprolifératif de FSTL1 sur de cellules pulmonaire cancéreuse (NSCLC PC-14) (Sumitomo, Kurisaki et al. 2000). Cependant, il faut que nous regardions si il y a des changements au niveau du phénotype des cellules, ainsi qu'un effet de FSTL1 sur la production de cytokines. Il faut également que nous caractérisions les cellules cibles de FSTL1, et que nous identifions le récepteur pour cette molécule. Ceci nous permettrait de trouver dans quelle voie de signal cellulaire intervient FSTL1, et de comprendre comment cette molécule, à l'image du TGF- β pourrait dans certaines situations avoir un rôle anti-inflammatoire (Kawabata, Tanaka et al. 2004) et dans d'autres, intervenir dans des mécanismes pro-inflammatoires (Takako et al. 2006).

La prolongation de la survie de l'allogreffe avec la protéine FSTL1, ainsi que les résultats préliminaires obtenus sur les cellules ganglionnaires activées, suggèrent que dans notre modèle, FSTL1 pourrait avoir un rôle immunorégulateur en inhibant les cellules T effectrices. La TSD induirait donc des cellules T CD8⁺ régulatrices qui une fois dans le greffon le protégerait en inhibant l'action des cellules T alloréactives activées, par la sécrétion de FSTL1 (Figure 26).

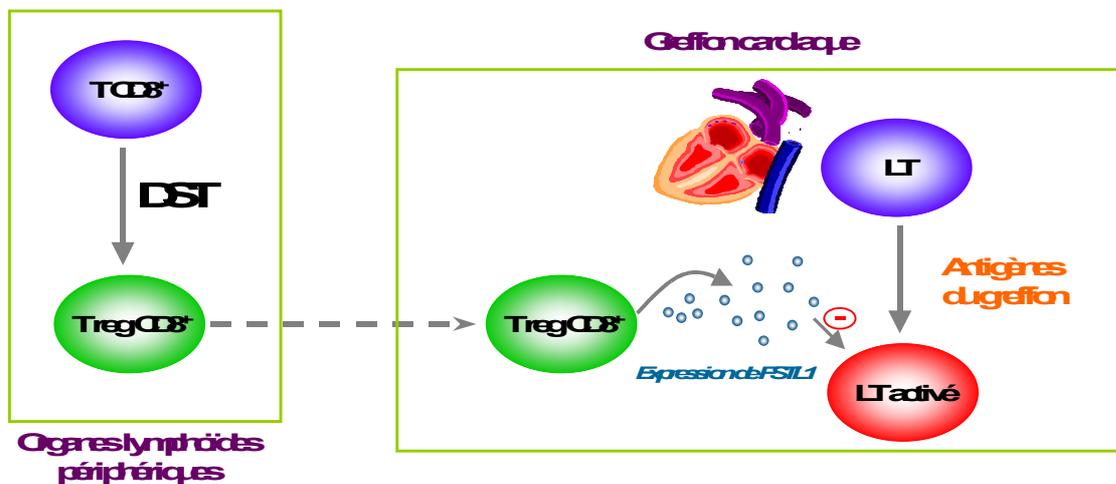


Figure 26 : Hypothèse du mécanisme d'action de FSTL1 dans la TSD

Pour conclure, nous avons montré dans cette étude, une forte expression de FSTL1 dans les LT CD8⁺ infiltrant la greffe dans notre modèle d'induction de tolérance à l'allogreffe par TSD, dans lequel le TGF- β joue un rôle important. Cette étude renforce l'idée que l'expression de FSTL1 est associée à la présence du TGF- β . La prolongation de la survie de l'allogreffe avec la protéine FSTL1 suggère que à l'image du TGF- β , FSTL1 peut jouer un rôle immunorégulateur dans la réponse immune et dans l'inflammation.

IV Intégration des nouvelles molécules dans le modèle de tolérance

Dans l'étude consacrée à la Fractalkine et son récepteur, CX3CR1 (Louvet et al. 2004), notre équipe a montré qu'ils sont fortement induits dans les greffons tolérés. De plus, cette expression est dépendante de la présence des cellules CD8⁺ du receveur traité par TSD, ces dernières étant requises pour la tolérance.

La Fractalkine et son récepteur peuvent être impliqués à la fois dans des mécanismes inflammatoires (notamment par le recrutement de cellules NK) et dans des phénomènes de protection (notamment dans le système nerveux central) ou plus généralement dans l'homéostasie tissulaire. Dans notre modèle de tolérance, les cellules CX3CR1⁺ semblent être au moins en grande partie des cellules non T. Bien que notre équipe n'ai pu caractériser précisément le phénotype de ces cellules, elles pourraient correspondre à une population de monocytes CD16⁺ CX3CR1^{fort} décrite chez la souris et chez l'homme (Ancuta et al. 2003; Geissmann et al. 2003).

Dans l'induction de tolérance par TSD, les cellules monocytaires CX3CR1^{high} du sang seraient recrutées dans le greffon grâce à l'expression précoce de Fractalkine au niveau des cellules endothéliales, elle-même déclenchée par la reconnaissance des allo-Ags par les cellules T CD8 du receveur (correspondant probablement au clone Vβ18 (Douillard et al. 1996)). Ces cellules pourraient alors se différencier en macrophages ou en DCs et exercer une fonction de capture et de présentation des allo-Ags aux lymphocytes T dans un but tolérogénique. Dans cette hypothèse, il s'agirait d'une transposition des mécanismes constitutifs de tolérance au soi dans un contexte d'induction de tolérance aux allo-Ags exprimés par le greffon. Ce phénomène impliquerait donc une reconnaissance active des allo-Ags, ce qui corrèle avec l'observation que les cellules leucocytaires passagères du greffon sont requises pour l'induction de tolérance dans ce modèle (Josien et al. 1998). La Fractalkine constituerait alors un des signaux précoces permettant la mise en place des mécanismes de tolérance dans ce modèle.

Dans l'étude consacrée à TORID (Louvet et al. 2005) notre équipe a montré que cette protéine fait partie de la famille du CD20 (famille MS4A) principalement exprimé dans les macrophages et les DC immatures, au niveau de la membrane nucléaire. Sa distribution dans la rate d'un rat naïf montre clairement que TORID est associé aux cellules myéloïdes et pas aux cellules lymphoïdes.

Ces résultats mettent à nouveau en lumière les cellules myéloïdes. Il est tentant de faire un lien entre les cellules CX3CR1⁺ et les cellules TORID⁺. Ces molécules pourraient être exprimées par les mêmes cellules infiltrant les greffons tolérés. Les cinétiques d'expression

dans les greffons lors de la première semaine suivant la transplantation sont en ce sens très comparables. Il est cependant possible que leur expression ne soit pas toujours simultanée dans ces cellules. En effet, notre équipe a trouvé que TORID était très peu exprimé (chez un animal naïf) dans les PBMCs ainsi que dans les monocytes du sang comparés aux cellules myéloïdes différenciées telles que les macrophages et certaines DCs. L'expression de TORID pourrait alors être induite lors de la différenciation des monocytes CX3CR1⁺ en macrophages et/ou en DCs au sein du greffon. Ces cellules pourraient également effectuer une migration vers la rate qui est l'organe lymphoïde privilégié en cas de greffe vascularisée.

Les expériences de transduction adénovirale de TORID dans des BMDCs suggèrent qu'il soit impliqué dans le contrôle de la maturation des DCs. Les cellules exprimant TORID dans le greffon correspondraient donc à des CPA non engagées dans le processus de maturation nécessaire à l'activation des lymphocytes T allogéniques. Si on attribue à ces cellules un rôle actif dans le processus de tolérance, il est possible que les cellules TORID⁺ CX3CR1⁺ infiltrant les greffons tolérés soient des DCs dites tolérogéniques. En effet, plusieurs études ont montré que les DCs immatures (Jonuleit et al. 2000; Lutz et al. 2000; Dhodapkar et al. 2001), ou semi matures (Lutz et al. 2002) étaient capable d'induire la tolérance. Elles auraient alors la capacité de capturer des allo-Ags puis de les présenter aux lymphocytes T allogéniques de façon tolérogène pour les induire en anergie ou générer des cellules régulatrices et permettre leur expansion. Chez le rat, Huang et al. ont montré que la population de DC CD4⁻ semblait responsable du transport des auto-Ags vers les organes lymphoïdes pour induire et maintenir la tolérance au soi (Huang et al. 2000). Etant donné que les cellules leucocytaires passagères du greffon (principalement des DCs interstitielles) sont essentielles à l'induction de tolérance (Josien, Heslan et al. 1998), il est possible que les CPA TORID⁺ acquièrent les antigènes du donneur (CMH de classes I et II) à partir de ces cellules.

TORID peut aussi être exprimé par les macrophages. L'hypothèse la plus simple serait que l'expression de TORID est une conséquence de l'état d'activation des macrophages des greffons tolérés ; l'augmentation de l'ARNm de TORID dans ces greffons comparés aux greffons rejetés serait alors expliquée par la régulation négative de TORID dans les macrophages activés des receveurs non traités. Au contraire, l'hypothèse d'un rôle actif de TORID dans ces cellules consisterait à leur attribuer la capacité de régulation des cellules T allogéniques situées dans leur voisinage. Dans les conditions normales, de nombreuses études ont reporté cette fonction suppressive des macrophages comme une conséquence de la phagocytose constitutive des cellules apoptotiques de l'organisme (Meagher et al. 1992; Voll et al. 1997; Fadok et al. 1998; McDonald et al. 1999). De façon intéressante, ces cellules médient leur effet au moins en partie en produisant du TGFβ, une cytokine requise pour l'induction de tolérance dans notre modèle (Josien et al. 1998). Ainsi, des macrophages

« activés » de façon appropriée peuvent supprimer une réponse T dans une culture mixte lymphocytaire (CML) (Tsaknaridis et al. 2003). Chez un individu normal, ce type de macrophages a été retrouvé préférentiellement dans le placenta et dans les poumons, où ils évitent des réactions immunitaires indésirables (Holt et al. 1988; Mues et al. 1989; Chang et al. 1993).

L'identification de FSTL1 comme un gène sur-exprimé dans les greffons tolérés est à double titre très intéressant. Tout d'abord, l'expression de FSTL1 peut-être directement induite par le TGF β (Shibanuma, Mashimo et al. 1993). Ensuite, des études récentes ont permis de lui attribuer un rôle anti-prolifératif et anti-inflammatoire (Sumitomo, Kurisaki et al. 2000; McDermott et al. 2003; Kawabata, Tanaka et al. 2004). Nous avons montré une forte expression de FSTL1 dans les LT CD8⁺ infiltrant la greffe dans notre modèle, des cellules qui semblent avoir des propriétés régulatrices indispensables à l'induction de la tolérance par la TSD (Josien, Heslan et al. 1998; Douillard et al. 1999). La prolongation de la survie de l'allogreffe avec la protéine FSTL1, ainsi que les résultats préliminaires obtenus sur les cellules ganglionnaires activées, suggèrent que dans notre modèle, FSTL1 pourrait avoir un rôle immunorégulateur en inhibant les cellules T effectrices et pourquoi pas les CPA. La TSD induirait donc des cellules T CD8⁺ régulatrices qui une fois dans les greffons le protégerait en inhibant l'action des cellules T alloréactives activées, notamment par la sécrétion de FSTL1.

La Figure 27 tente de synthétiser les différentes données précédemment acquises avec les nouveaux éléments apportés par l'étude des différentes molécules que notre équipe a étudié dans le modèle d'induction de tolérance par TSD.

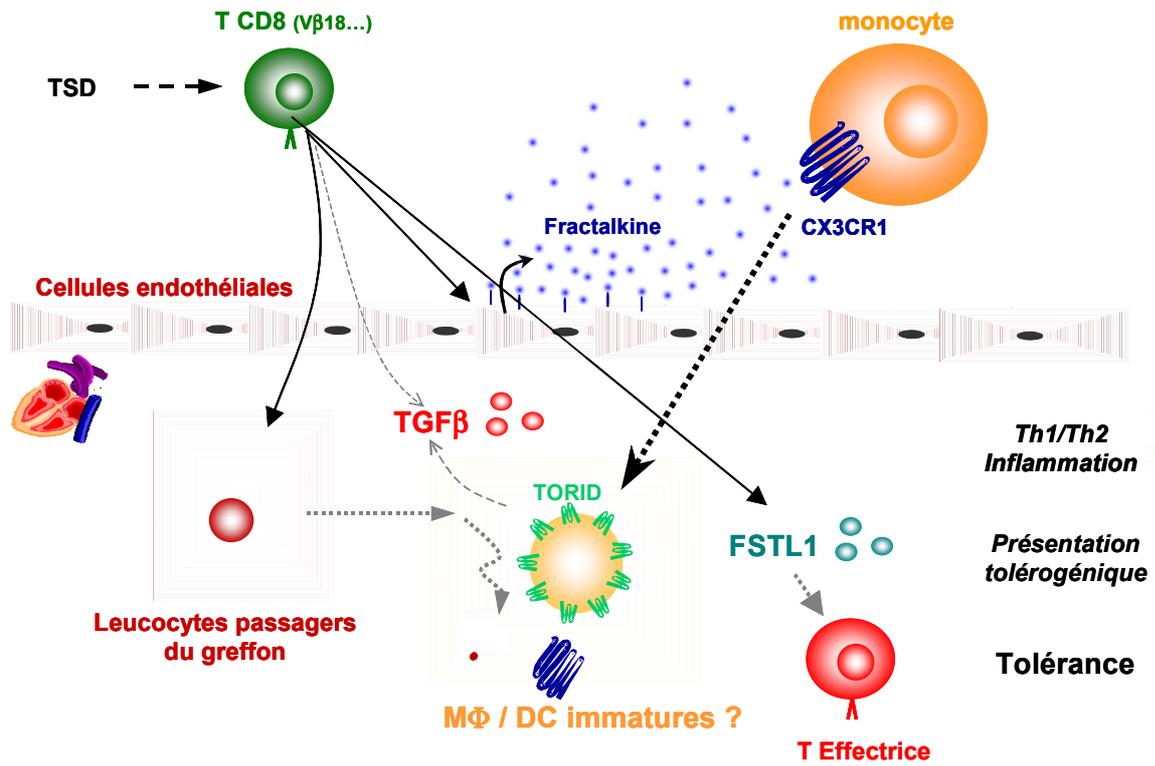


Figure 27 : Modèle hypothétique des mécanismes d'induction de tolérance à l'allogreffe par TSD. D'après la thèse de Cédric Louvet.

Partie II

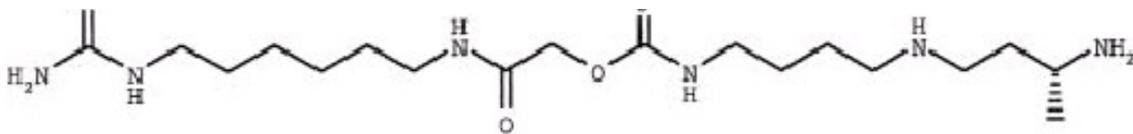
Recherche de gènes dans le modèle de tolérance induite par traitement avec le LF15-0195 un analogue de Deoxyspergualine : Etude de Schlafen-3 (SLFN-3)

I Recherche de gènes dans le modèle de tolérance induite par traitement avec le LF15-0195

A. Le LF15-0195 un analogue de la Deoxyspergualine

En 1981, le groupe du professeur Umezawa a isolé à partir de culture de *Bacillus laterosporus* un nouvel antibiotique anti-tumoral (Takeuchi, Lowry et al. 1992). Ce composé fut appelé Spergualine en raison de ses groupements spermidine et guanidine terminaux. Il fut ensuite modifié chimiquement (retrait du groupement hydroxyl situé à la position 15) pour donner la 15-déoxyspergualine (DSG) (Figure 28) (Iwasawa et al. 1982).

Figure 28 : La structure chimique du LF15-0195. D'après Lebreton et al. (Lebreton et al., 1999).



La DSG a été initialement développée en tant qu'agent anti-tumoral en raison de ses effets inhibiteurs sur la mitose, puis rapidement son activité immunosuppressive a été mise en évidence (Umezawa et al. 1985). En dépit de son effet thérapeutique, le développement de la DSG a été limité en raison de son instabilité chimique et de sa toxicité potentielle. C'est pour cette raison, qu'en 1991, les Laboratoires Fournier (Daix, France) ont débuté un programme de recherche sur des analogues de la DSG, afin d'obtenir des composés plus stables, moins toxiques, et plus actifs que la DSG. En 1993, ils ont développé un nouvel immunosuppresseur : le LF15-0195. Le LF15-0195 est plus stable en solution aqueuse et plus résistant au métabolisme oxydatif *in vivo* (Lebreton et al. 1999). De plus, grâce à une dose active plus faible, il est utilisable en injection sous-cutanée.

1. Modèles d'étude du LF15-0195

Les propriétés immunosuppressives du LF15-0195 ont été caractérisées dans la prévention de la GVHD chez la souris (Lebreton, Annat et al. 1999). Il a ensuite montré une efficacité dans de nombreux modèles expérimentaux chez le rongeur : l'allotransplantation (Chiffolleau et al. 2002; Chiffolleau, Beriou et al. 2002; Min et al. 2003; Min et al. 2003; Zhou et al. 2003; Heslan, Beriou et al. 2005), la xénotransplantation (Wang et al. 2003; Wang et al. 2003), l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Duplan et al. 2002; Duplan et al. 2003), la myasthénie (Duplan et al. 2002; Duplan et al. 2002), l'arthrite (Ducoroy et al. 2001; Ducoroy et al. 2001; Ducoroy et al. 2003), la glomérulonéphrite (Tesch et al. 2001), le syndrome

néphrotique idiopathique (Le Berre et al., soumis), et également dans un modèle de transgénèse (Puppi et al. 2004). Le LF15-0195 a également été testé dans un modèle pré-clinique chez le primate, dans lequel il a permis d'induire une prolongation significative de la survie d'allogreffe rénale (Yang et al. 2003).

2. Mécanismes moléculaires d'action du LF15-0195

2.1 Interaction avec les protéines de choc thermique

Tout comme la DSG (Nadler et al. 1992), le LF15-0195 interagit avec la Heat shock protein 70 (Hsc70), un membre de la famille des protéines de choc thermique (Komesli et al. 1999). Cette interaction pourrait être la première étape du mécanisme d'action du LF15-0195. Les protéines de choc thermique possèdent de nombreuses fonctions dont celle de modifier la conformation de protéines, et faciliter leur translocation aux travers des organelles cellulaires (Rothman 1989; Gething et al. 1992). Plusieurs études suggèrent que les protéines de choc thermique pourraient jouer un rôle dans la présentation antigénique par les molécules du CMH (Vanbuskirk et al. 1989; Srivastava et al. 1994).

2.2 Induction de la voie des caspases

Il a été montré que le LF15-0195 pouvait jouer un rôle dans la mort cellulaire des cellules T, en les sensibilisant à la mort cellulaire induite par l'activation (AICD) (Ducoroy et al. 2003), qui survient après des stimulations antigéniques répétées (Krammer 2000). Cette sensibilisation est dépendante de Fas, et a été démontrée sur des lignées T humaines (Jurkat), mais également sur des cellules T périphériques humaines (Ducoroy, Micheau et al. 2003). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans le modèle de GVHD (Ducoroy, Micheau et al. 2003). L'action du LF15-0195 sur l'AICD a été caractérisée au niveau moléculaire. Il facilite l'assemblage des trimères de Fas et le recrutement de plusieurs molécules (FADD, pro-caspases 8 et 10) au niveau du complexe de signalisation inducteur de mort. Ceci a pour effet d'augmenter l'activation des caspases 8 et 10, et le relargage de cytochrome c et de DIABLO/Smac de la mitochondrie vers le cytosol (Ducoroy, Micheau et al. 2003).

2.3 Inhibition de la voie NF- κ B

Le LF15-0195, tout comme la DSG (Tepper et al. 1995), inhibe la signalisation du facteur de transcription NF- κ B, en bloquant l'activation et la translocation nucléaire de NF- κ B (Tepper, Nadler et al. 1995).

B. Modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat par traitement au LF15-0195

Basé sur le même modèle de transplantation cardiaque et la même combinaison de souches de rats que pour le modèle de Transfusion sanguine de donneur (TSD), lorsque les animaux receveurs ne sont pas traités ce système constitue un modèle de rejet d'allogreffe. Dans cette combinaison, l'allogreffe cardiaque est normalement rejetée en 6 ± 0.6 jours (Souillou, Blandin et al. 1984) (Figure 29). Un court traitement quotidien avec le LF15-0195 pendant 21 jours à partir du jour de la greffe, en injection intrapéritonéale, à une dose de 3mg/kg, permet d'induire une survie définitive de l'allogreffe (Figure 29).

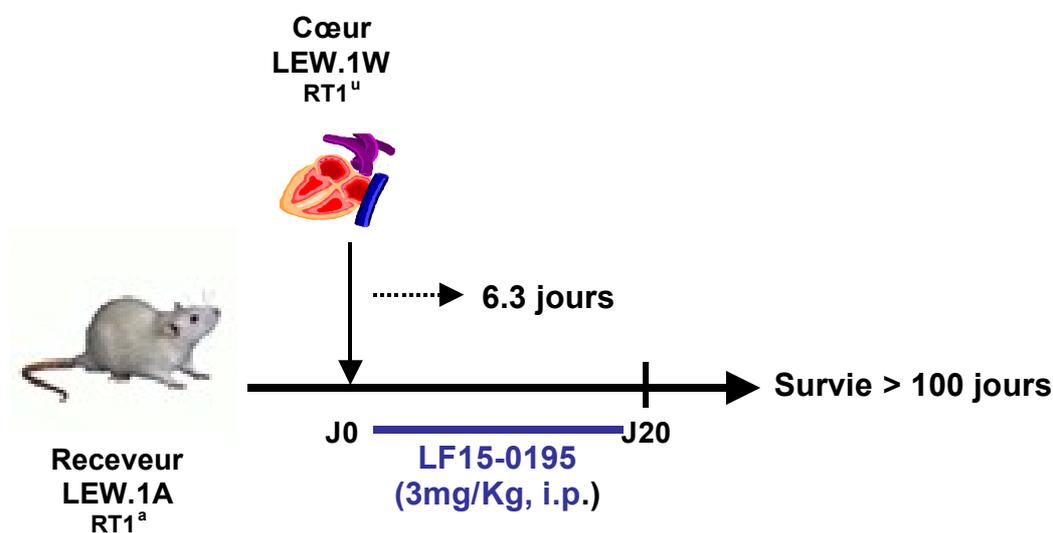


Figure 29 : Modèle d'induction de tolérance à l'allogreffe cardiaque par traitement avec le LF15-0195.

C. Résultats obtenus dans notre modèle de transplantation

1. Le LF15-0195 induit une tolérance durable et spécifique

La tolérance induite par le LF15-0195 est durable et spécifique. En effet la greffe est tolérée chez plus de 90% des receveurs qui ne développent aucun signe de rejet chronique, même plus de 100 jours après la transplantation (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). Lors d'une seconde greffe, les receveurs tolérants acceptent un greffon cardiaque de même haplotype que le premier, mais rejettent une greffe de tierce partie, ce qui démontre que la tolérance induite par le LF15-0195 est spécifique du donneur (Chiffolleau, Beriou et al. 2002).

2. Inhibition des macrophages

L'infiltrat leucocytaire est fortement diminué dans les allogreffes cardiaques tolérées. Cette diminution concerne les macrophages, cellules T, cellules B et cellules NK. Les expressions d'iNOS et de TNF- α , deux molécules exprimées par les macrophages activés, sont inhibées dans les allogreffes 5 jours après la transplantation (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). De plus, une forte inhibition de l'expression de l'IL-10 est observée dans les allogreffes tolérées (Chiffolleau, Beriou et al. 2002), ce qui pourrait être la conséquence de l'inhibition des macrophages.

3. Inhibition de la production des anticorps anti-donneur

La réponse anticorps anti-donneur est totalement inhibée sous traitement (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). Elle est partiellement restaurée 100 jours après la greffe, avec une production préférentielle de la sous-classe IgG1 associée au profil Th2, au dépend de la sous-classe IgG2 associée au profil Th1 (Chiffolleau, Beriou et al. 2002).

4. Inhibition de la différenciation Th1

Les cellules T allospécifiques prolifèrent fortement contre les antigènes du donneur cinq jours après la transplantation, mais produisent moins d'IFN- γ (Chiffolleau, Beriou et al. 2002), ce qui démontre que la phase d'induction de tolérance est caractérisée par une inhibition de la différenciation Th1.

Cet effet semble résulter d'une action directe sur les cellules T activées, en stimulant leur prolifération, mais en inhibant leur production de cytokines de type Th1 (Chiffolleau, Beriou et al. 2002).

5. Induction de cellules T régulatrices

5.1 Transfert de tolérance

La présence de cellules régulatrices a été mise en évidence par des expériences de transfert de tolérance à des receveurs irradiés. Ces cellules sont retrouvées parmi les cellules T CD4⁺ de la rate et du thymus (Chiffolleau, Beriou et al. 2002) et les cellules infiltrant la greffe tolérée (Heslan, Beriou et al. 2005).

5.2 Augmentation de la population CD4⁺CD25⁺

Une augmentation du pourcentage de cellules T CD4⁺CD25⁺ a été mise en évidence dans la rate et le thymus des receveurs tolérants par comparaison à des receveurs non traités (Chiffolleau, Beriou et al. 2002), et une proportion importante de cellules T CD4⁺CD25⁺ a été retrouvée dans les cœurs tolérés (Heslan, Beriou et al. 2005).

Dans le thymus les propriétés régulatrices sont restreintes à la population CD25+, mais dans la rate, les cellules CD25- peuvent également transférer la tolérance dans 50% des cas (Chiffolleau, Beriou et al. 2002).

5.3 Expression de Foxp3

Afin de mieux caractériser les cellules Treg induites par le LF15-0195, nous avons analysé leur expression du facteur de transcription FoxP3.

Nous avons montré que, comme chez la souris (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003), chez le rat, FoxP3 est spécifiquement exprimé par les cellules T CD4+CD25+, et n'est pas induit dans les cellules CD4+CD25- après stimulation (Heslan, Beriou et al. 2005). Tandis que chez l'homme, l'expression de Foxp3 peut être induite dans les cellules CD4+CD25- après stimulation (Walker et al. 2003). Foxp3 peut donc être considéré chez le rat comme un marqueur spécifique des cellules Treg naturelles CD4+CD25+.

Nous avons ensuite analysé l'expression de FoxP3 dans les cellules Treg induites par le LF15-0195. Nous avons montré que FoxP3 est très fortement exprimé par les cellules Treg CD4+CD25+ de la rate des receveurs tolérants, à des niveaux comparables à ceux retrouvés dans les cellules Treg naturelles CD4+CD25+ de rats naïfs (Heslan, Beriou et al. 2005). Le niveau d'expression de FoxP3 est également plus élevé dans les greffes tolérées que dans les greffes en cours de rejet (Heslan, Beriou et al. 2005).

L'ensemble de ces résultats démontre que l'expression de FoxP3 est une caractéristique importante des cellules Treg induites par le LF15-0195.

5.4 Prolifération et production de cytokines

Les cellules Treg CD4+CD25+ de la rate et du thymus des receveurs tolérants prolifèrent peu contre les antigènes du donneur, et produisent peu de cytokines, comme l'IFN- γ et l'IL-10, et pas du tout d'IL-2. L'expression transcriptionnelle pour le TGF- β , le CTLA-4 et l'IL-10 est similaire à celle des cellules T CD4+CD25+ de la rate et du thymus d'un rat naïf.

5.5 Spécificité des cellules régulatrices

Les cellules régulatrices induites par le LF15-0195 sont spécifiques d'antigène. En effet, le transfert de 200×10^6 splénocytes de receveurs tolérants prévient le rejet d'une greffe de même haplotype que le rejet, mais n'empêche pas le rejet d'une greffe de tierce partie (Chiffolleau, Beriou et al. 2002).

Les cellules T CD4+CD25+ de la rate et du thymus sont plus puissantes que les cellules Treg naturelles, car le transfert de quantités équivalentes de cellules T CD4+CD25+ d'un rat naïf (5×10^6) ne permet pas de prévenir le rejet de greffe (Chiffolleau, Beriou et al. 2002).

La tolérance est transférable avec 5×10^6 cellules T CD4+CD25+ de la rate des receveurs tolérants, et avec seulement 0.75×10^6 cellules infiltrant la greffe, ce qui montre que ces dernières sont plus efficaces. Ce résultat peut être interprété de deux façons : ou les cellules Treg présentes dans la greffe possèdent une activité suppressive plus puissante, ou bien elles contiennent plus de cellules Treg allospécifiques que les cellules spléniques.

D. Recherche de gènes différentiellement exprimés dans le modèle de tolérance induit par le LF15-0195

1. Situation étudiée

Notre équipe a précédemment montré que dans ce modèle nous pouvions transférer la tolérance en injectant les LT issus de la rate d'un animal tolérant à un autre animal greffé dans la même combinaison de souches (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). Afin d'isoler des gènes impliqués dans le processus de régulation de la réponse immune existant chez les animaux traités au LF15-0195. Nous avons analysé l'expression différentielle des gènes dans des Cultures Lymphocytaires Mixtes (MLR) de LT totaux provenant d'animaux greffés, rendus tolérants par traitement au LF15-0195 et d'animaux naïfs non greffés, stimulés avec des CPA irradiées (du type du donneur). Nous n'avons pas utilisé les greffons entiers dans cette étude, puisque l'infiltrat étant inhibé par le traitement au LF (Chiffolleau, Beriou et al. 2002), il n'est donc pas équivalent entre les greffons des animaux tolérants et rejeté. Nous voulions également partir d'une situation plus simple pour avoir moins de clones « Faux positifs ». Quand aux cellules infiltrant le greffon, leur utilisation était difficile à cause de la quantité de matériel qu'elles nous auraient fourni. Dans chaque MLR les rates de trois animaux ont été groupées. Les cellules sont laissées en culture pendant 48 heures pour permettre le démarrage de la réponse secondaire régulatrice chez les animaux tolérants. Dans le même temps, nous avons un début de réponse primaire chez les animaux naïfs. Le contrôle de prolifération (Figure 30) montre comme notre équipe l'avait décrit précédemment (Chiffolleau, Beriou et al. 2002), une inhibition (60%) de la prolifération des cellules des animaux tolérants par rapport aux cellules des animaux naïfs.

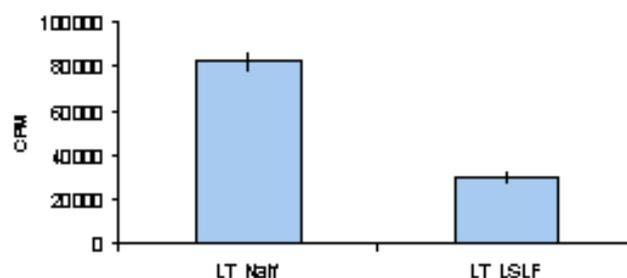


Figure 30 : Contrôle de la prolifération de la MLR : la prolifération des LT purifiés de la rate d'animaux naïfs non greffés ou tolérant (par traitement au LF15-0195), mis en culture avec les CPA 1W, est contrôlée par incorporation de thymidine pendant les dernières 8h d'une culture de 48h. Ce contrôle est réalisé pour la MLR avec les cellules des animaux naïfs (LT Naif) ainsi que celle des animaux tolérants (LT LSLF). Les résultats de l'incorporation de thymidine tritiée sont exprimés en coups par minutes.

2. Stratégie utilisée

Nous avons mis en place une stratégie de recherche de gènes combinant l'Hybridation soustractive suppressive avec un criblage des banques à l'aide de la technique des puces à ADN. Cette stratégie est résumée dans la figure 31. Suite à l'HSS nous avons ajouté une étape « MOS » qui est une amélioration de l'HSS, et permet d'enrichir la banque soustraite en clones différentiels. Suite au criblage des banques, nous avons également ajouté une étape d'étude de la redondance des clones dans la banque. Les clones mis en évidence comme ayant une expression différentielle sont ensuite séquencés et leur expression est mesurée en PCR quantitative. Chaque étape sera détaillée par la suite. Les aspects techniques sont présentés en annexe dans une partie « matériel et méthode ».

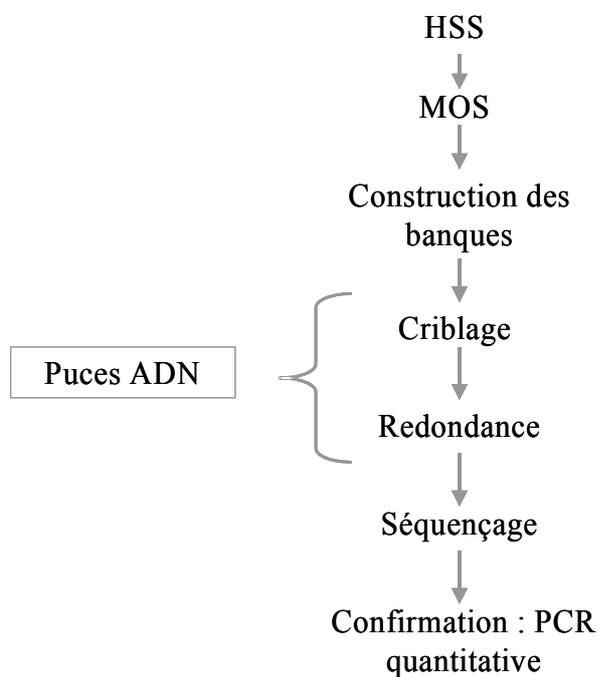


Figure 31 : Stratégie de recherche de gènes rassemblant la construction d'une banque soustraite et l'utilisation de la technologie des puces à ADN comme outil de criblage.

2.1 L'Hybridation soustractive suppressive

Les cellules ont été récoltées et leur ARN extrait pour l'HSS. Celle-ci est réalisée dans les deux sens : MLR d'animaux tolérants contre MLR d'animaux naïfs et MLR d'animaux naïfs contre MLR d'animaux tolérants pour générer les deux banques. La figure 32 récapitule les différents contrôles réalisés à chaque étape.

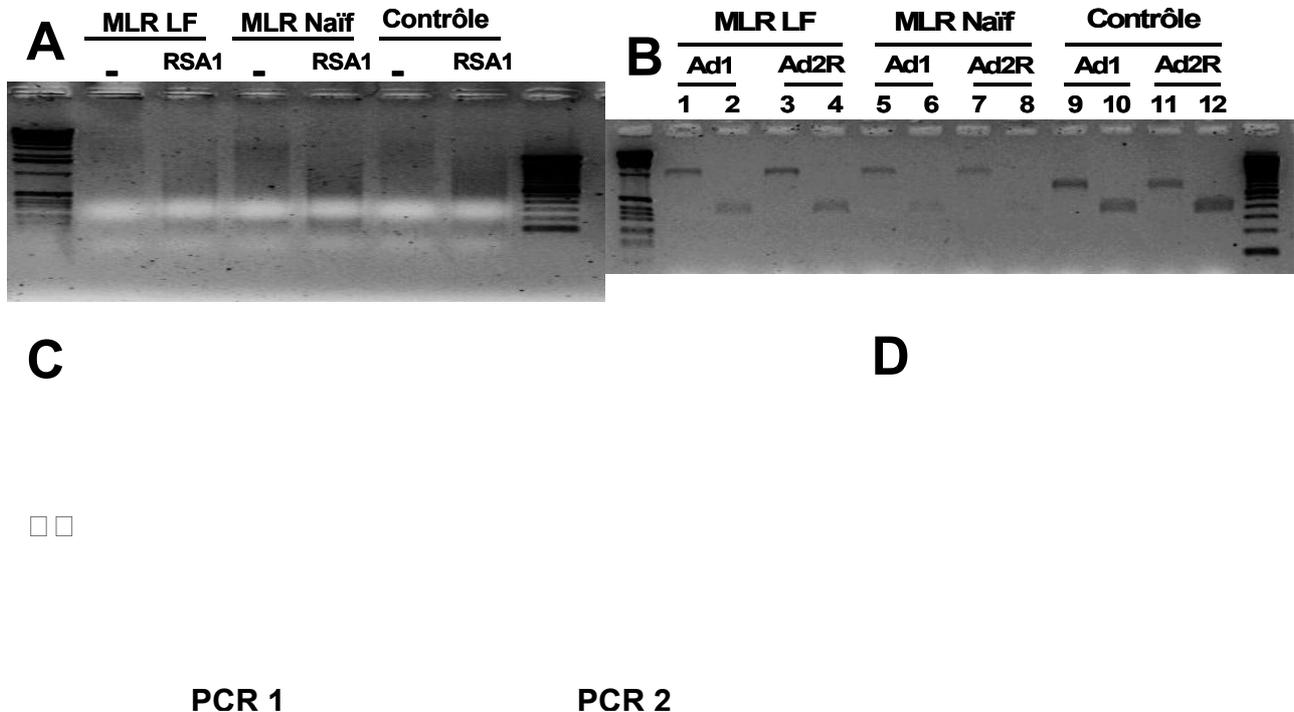


Figure 32 : Contrôles des étapes de l'Hybridation Soustractive Suppressive (*PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit*, Clontech). **(A)** Les profils d'électrophorèse des ADNc sont comparables pour chaque préparation. Une diminution de la taille des molécules est bien observée pour les échantillons digérés par l'enzyme Rsa1. **(B)** La réaction de ligation avec les adaptateurs 1 (Ad1) et 2R (Ad2R) est vérifiée par PCR grâce à une amorce spécifique aux deux adaptateurs et l'amorce 3' du gène de la G₃PDH (1, 3, 5, 7, 9, 11) La taille du produit de PCR est inférieure pour le contrôle (9 et 11) car il existe un site de restriction pour Rsa1 chez l'homme qui n'existe pas chez le rat et qui réduit donc le fragment d'ADNc. Un contrôle interne est réalisé en utilisant les amorces 5' et 3' de la G₃PDH (2, 4, 6, 8, 10, 12). **(C)** Les profils d'électrophorèse des produits de PCR1 et de PCR2 sont diffus pour les contrôles « non soustraits » (2, 4, 6, 9, 11, 13). Au contraire, les échantillons « soustraits » montrent des bandes de forte intensité à l'issue de la seconde PCR, représentant théoriquement des molécules spécifiques de la MLR LF (8) ou de la MLR naïf (10). L'observation de bandes (correspondant aux fragments de phage qui ont été ajoutés) pour le contrôle « soustrait » (5 et 12) identiques à celles du contrôle fourni avec le kit (7 et 14) atteste que l'Hybridation Soustractive s'est bien déroulée. **(D)** L'efficacité de la « soustraction » est confirmée par une importante diminution de l'amplification de la G₃PDH (« gène de ménage ») à partir des échantillons « soustraits » de MLR à partir de cellules d'animaux traités au LF15-0195 (LF) ou de MLR à partir de cellules d'animaux naïfs (NAIF) comparée à celle des échantillons « non soustraits ».

Afin d'éliminer les nombreux faux positifs présents à l'issue de la soustraction, nous avons appliqué une technique décrite par Rebrikov et al.: la méthode MOS (Mirror Orientation Selection) sur les banques d'ADNc soustraites (Rebrikov, Britanova et al. 2000). Cette technique consiste à réaliser une étape supplémentaire après la soustraction, qui permet de considérablement augmenter le taux de clones différentiellement exprimés, en éliminant ceux échappant à la soustraction. La figure 33 montre le profil d'ADNc obtenu avant et après l'application du MOS.

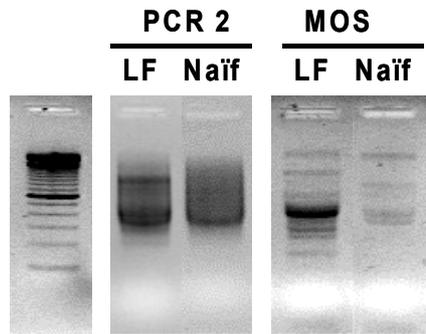


Figure 33 : Comparaison des profils d'électrophorèse des produits de PCR suivant l'hybridation soustractive (PCR2) et le MOS (Mirror Orientation Selection, PCR3). Cette étape additionnelle consiste en l'élimination d'un des deux adaptateurs par digestion, la dénaturation/hybridation des clones, et une nouvelle PCR d'amplification (PCR3) avec un seul type d'amorce. Ainsi, une grande proportion des clones non différemment exprimés ayant échappé à la soustraction n'est pas amplifiée. En ce sens, on peut observer que les produits des banques soustraites de MLR à partir de cellules d'animaux traités au LF15-0195 (LF) ou de MLR à partir de cellules d'animaux naïfs (Naïf), ainsi que du contrôle de soustraction apparaissent de manière plus nette.

Les produits de soustraction obtenus après le traitement MOS ont été clonés dans un vecteur plasmidique et transformés dans des bactéries compétentes. 576 colonies ont ensuite été prélevées pour chaque situation afin de réaliser deux banques. Ces banques ont alors été conservées sous forme bactérienne et congelées dans du glycérol.

2.2. Utilisation des puces à ADN comme méthode de criblage

Afin de cribler les banques obtenues, nous avons utilisé la technologie des puces à ADN en l'adaptant à notre problématique. Les inserts de chaque clone ont été amplifiés par PCR à partir des lysats bactériens et vérifiés sur gel d'agarose (Figure 34). Après une étape de purification, les banques amplifiées ont été « spottées » (micro-dépôts sur lame de verre) sur les puces. Chaque spot (sonde) est spécifique d'un clone. Le principe de la technologie des puces à ADN a été exposé dans l'introduction. Une partie consacrée aux détails techniques se trouve en annexe. Au final les puces réalisées comptaient 1152 clones (576 de la banque des animaux tolérants, 576 de la banque des animaux naïfs) spottés en duplicats.

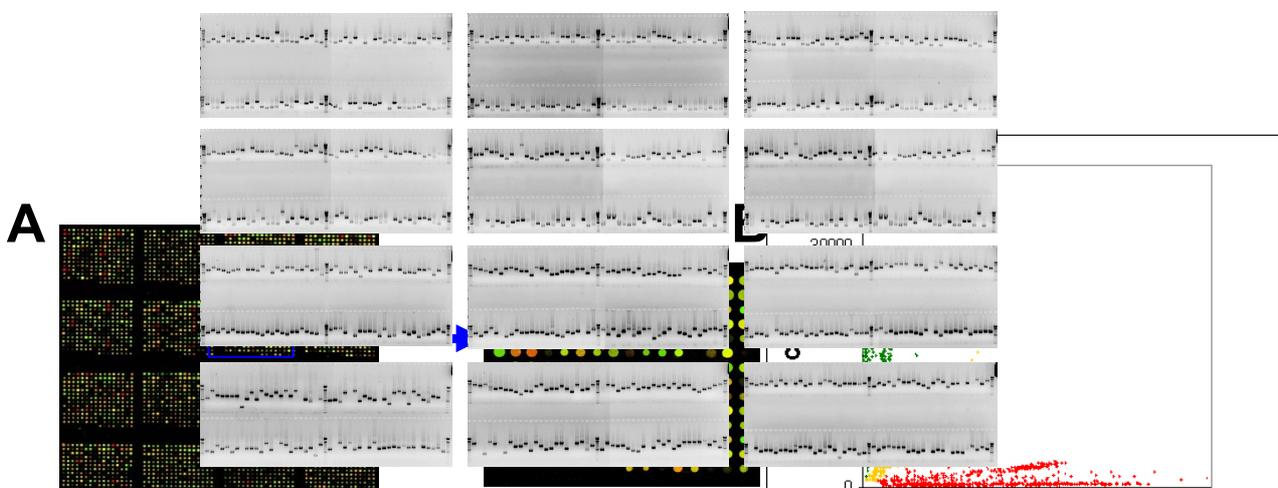


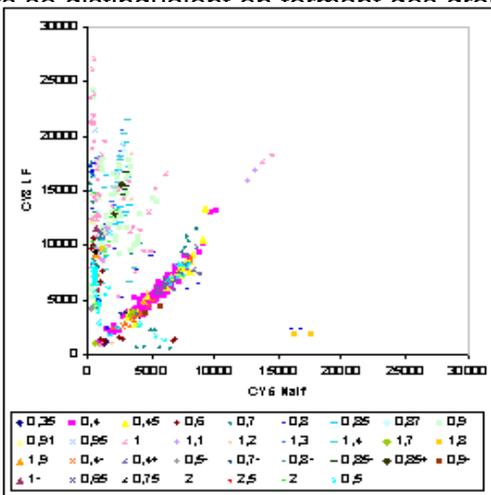
Figure 34 : Gel de contrôle des produits de PCR correspondant aux sondes des banques soustraites. Ce contrôle sur gel d'agarose permet de vérifier si les sondes sont en quantité et de qualité suffisante. Les sondes correspondant à des produits d'amplification non spécifiques, à une absence d'amplification, ou à une bande de trop faible intensité, auront l'attribution de « mauvais spot » dans le fichier informatique correspondant à l'identification des clones et de leurs coordonnées.

Figure 35 : Criblage différentiel des clones des banques de la MLR traités au LF15-0195 et de la MLR des animaux naïfs. Les spots sont des produits de PCR correspondant à 1152 clones (colonies), hybridés avec les sondes Non soustraites marquées. **A** Image composite des deux scans à 532nm (Cy3 vert) et 633 (Cy5 rouge) **B** Représentation graphique de l'expression différentielle des clones en fonction de l'intensité de fluorescence dans chaque fluorochrome après hybridation.

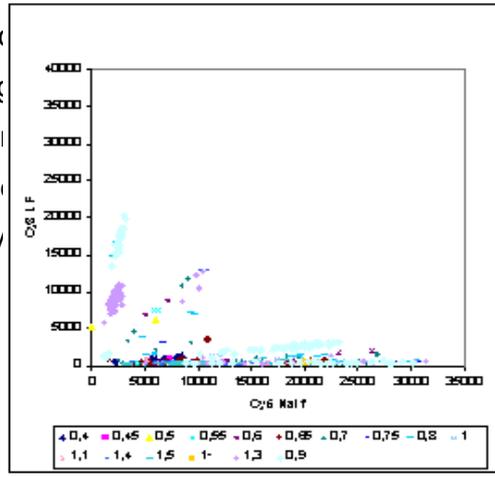
lavage, les puces ont été scannées dans chacune des deux longueurs d'onde correspondant aux deux fluorochromes et les images ont été analysées par le logiciel GenePix (Molecular Devices). Ce logiciel permet d'extraire les données à partir des scans, et génère des feuilles de données sous forme de tableau. La figure 35A montre l'image composite des deux scans correspondant à l'hybridation des échantillons non soustraits. Après une étape de normalisation, les données ont été analysées. La figure 35B montre une représentation graphique en « Dot Blot » des résultats obtenus. Nous avons fixé un seuil minimum d'expression différentielle de 2X. Ainsi, les clones surexprimés dans les cellules des animaux traités au LF15-0195 sont représentés en vert, ceux surexprimés dans les animaux naïfs sont en rouge, tandis que ceux en jaune représentent les clones non différentiellement exprimés.

En observant la représentation en dot blot nous nous sommes aperçus que des groupes de spots se distinguaient en formant des groupes ayant le même ratio d'intensité. En ajoutant le

A
 Para
 clon
 (Fig
 de c
 par
 été



les gènes
 que ces g
 de chacun
 cette hyp
 qué et hy



les
 ille
 ou
 ine
 ont

Figure 36 : Représentation graphique de l'expression différentielle des clones en fonction de l'intensité de fluorescence dans chaque fluorochrome après hybridation, et en fonction de la taille des inserts. **A.** Représentation de la banque de banque soustraite de la MLR LF contre les animaux naïfs. **B.** Représentation de la banque de banque soustraite de la MLR naïf contre les animaux LF.

La figure 37A montre l'image composite de l'hybridation des clones étudiés pour leur redondance. Comme nous pouvons le voir ici, l'hybridation des séquences de quelques clones (5 clones marqués en Cy3, 4 en Cy5), montre que ceux-ci sont fortement redondants dans les banques.

Cette étape nous permet donc de diminuer considérablement le séquençage des clones. Après avoir identifié par séquençage les gènes correspondant à ces clones, nous avons choisi des amorces nucléotidiques, pour chacune de ces molécules et nous avons mesuré leur expression

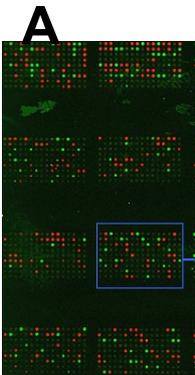
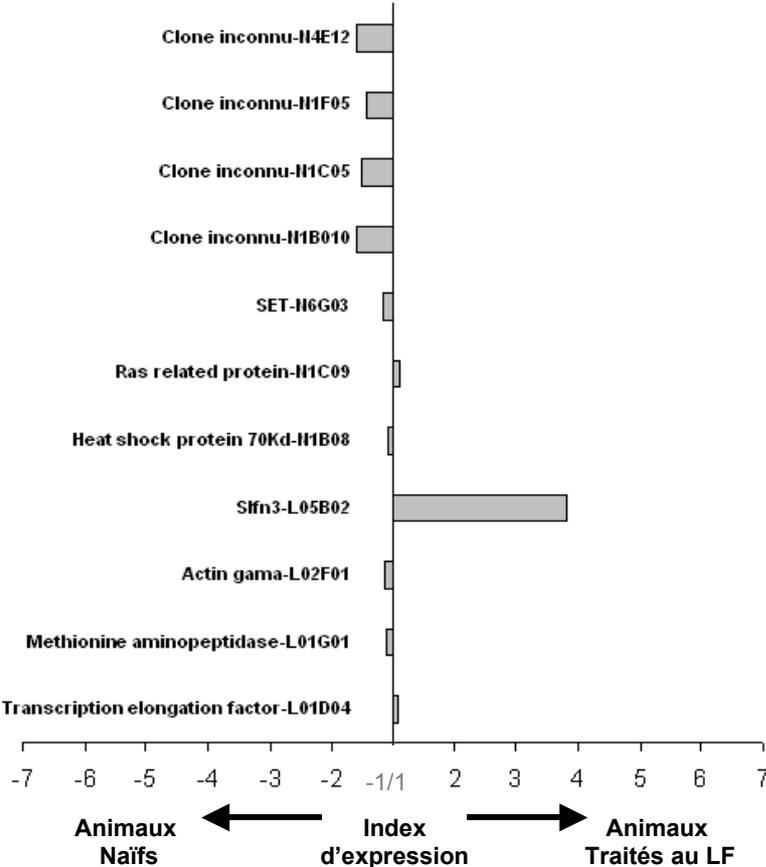


Figure 37 : Etude de l'expression des clones sur une puce après hybridation. L'intensité de fluorescence est mesurée pour chaque spot. Au total, 20 clones ont été étudiés sur 10 échantillons.



les résultats obtenus. Seul Schlafen-3 (Slfn3) montre une expression différentielle assez importante (3,81 fois) dans la MLR des animaux tolérants comparé à la MLR des animaux naïfs. Cette molécule faisant partie d'une famille comptant 10 membres à ce jour, à fait l'objet d'une étude, dont les résultats sont exposés dans le manuscrit proposé à la suite, ainsi que dans une partie réservée aux perspectives de travaux.

Figure 38 : Vérification de l'expression différentielle des clones sélectionnés après criblage avec les puces à ADN en PCR quantitative sur les échantillons ayant servi à réaliser l'HSS. Les résultats sont exprimés comme l'index d'expression entre la MLR des animaux tolérants traités au LF15-0195 et la MLR des animaux naïfs.

3. Etat des connaissances de la famille Schlafen

3.1 Les différents membres de la famille Schlafen

La famille des protéines Schlafen, découverte chez la souris (Schwarz et al. 1998) comprend à ce jour 10 membres (Geserick et al. 2004), et semble jouer un rôle important dans l'ontogenèse des cellules lymphoïdes et myéloïdes du système immunitaire ainsi que dans le contrôle du cycle cellulaire.

Dans un premier temps, six membres ont été identifiés (Schwarz, Katayama et al. 1998). Ceux-ci pouvaient être classés en deux groupes distincts.

Le premier groupe contient Slfn1 et Slfn2 qui ont des séquences protéiques très homologues. Les membres du deuxième groupe qui sont Slfn3, Slfn4, et les protéines

prédites Slfn6 et Slfn7 possèdent en comparaison avec le premier groupe, un domaine protéique carboxy-terminale supplémentaire.

Plus récemment 4 nouveaux membres ont été identifiés (Geserick, Kaiser et al. 2004): Slfn5, Slfn8, Slfn9 et Slfn10 qui forment un troisième groupe au sein de cette famille. Ces derniers membres comportent des motifs de liaison à l'ATP « RNA helicase like activity ».

La figure 39 montre la représentation schématique de l'alignement des différents membres de la famille Schlafen formant trois groupes protéiques en fonction de leurs homologies. Les triangles montrent le découpage exonique.

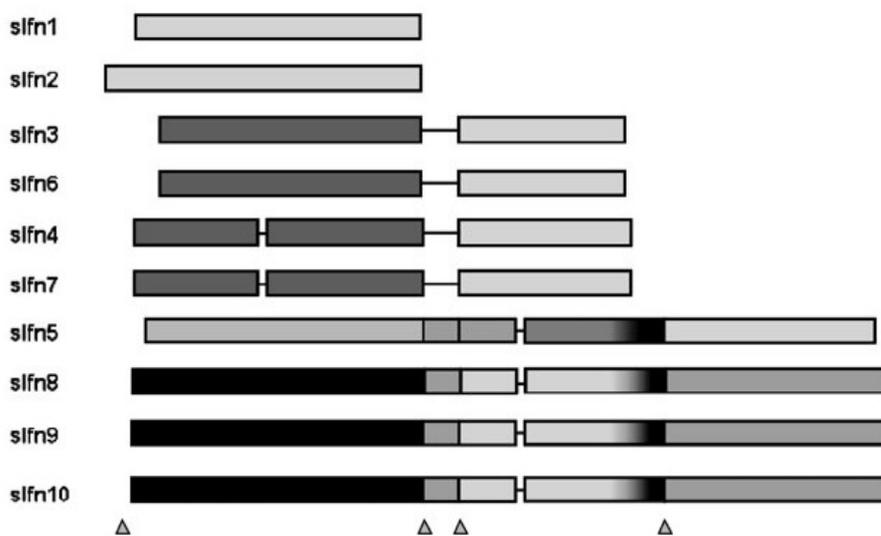


Figure 39 : Représentation des trois groupes protéiques de la famille Schlafen (Geserick et al., 2004)

La séquence protéique dérivée de chacun des membres de la famille Schlafen n'a pas de similitude caractéristique à d'autres protéines. L'homologie avec les séquences répétées terminales inversées (ITR : inverted terminal repeats) des virus comme, les Vaccinia, les Variola et des Kuhpocken, (Schwarz, Katayama et al. 1998) est toutefois surprenante comme pour les virus camelpox (Gubser et al., 2002).

L'indication sur une participation régulatrice du contrôle du cycle cellulaire est ressortie de l'expression ectopique de Slfn1 dans une lignée fibroblastique. Slfn1 inhibe la croissance cellulaire, par un verrouillage dans le Phase G1 du cycle cellulaire en inhibant l'induction de cycline D1 (Brady et al., 2005). Il a également été rapporté un effet anti-prolifératif Slfn2 et Slfn3 lorsqu'ils sont exprimé de façon ectopique dans les fibroblastes (Schwarz, Katayama et al. 1998). Par contre, l'expression ectopique de Slfn5, Slfn8, Slfn9 et Slfn10 n'a pas d'effet sur la prolifération des fibroblastes (Geserick, Kaiser et al. 2004).

Aux vues de son profil d'expression, la famille Schlafen semble jouer un rôle dans le processus de régulation de l'ontogénie des cellules T. Ses membres sont exprimés de manière importante dans les organes lymphoïdes, comme le Thymus, les ganglions lymphatiques et la rate (Schwarz, Katayama et al. 1998). Une expression différentielle de Slfn1 a été mesurée entre les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs) TCR $\alpha\beta$ ⁺ versus les TCR $\gamma\delta$ ⁺, mais l'interprétation de cette expression différentielle reste inexpliquée (Shires et al., 2001).

Une régulation transcriptionnelle de différents membres de la famille a été trouvée lors du développement des cellules T. Schwarz et al ont observé une surexpression de 100 fois pour Slfn1 et de 5 à 10 fois pour Slfn2 dans les cellules T CD4⁺ et TCD8⁺ matures naïves par rapport aux immatures. Cette famille semble également jouer un rôle dans l'homéostasie et l'activation des cellules T périphériques. Les cellules T matures naïves expriment Slfn1 et Slfn2 et leur expression est fortement sous régulée après l'activation des cellules T négatives. De manière inverse, Slfn3, Slfn4, Slfn6 et Slfn7 ont leur expression fortement sur-régulée après l'activation des cellules T. La forte expression de Slfn1 et de Slfn2 corrèle avec le retour à un état de repos cellulaire, ce qui suggère donc une participation active de ces protéines lors de processus homéostatiques (Schwarz, Katayama et al. 1998).

Dans les souris transgéniques pour Slfn1, l'effet de la surexpression de ce gène dans la phase précoce du développement des cellules T montre clairement son importance potentielle pour le développement de ces cellules. En effet, le thymus des souris transgénique montre une diminution significative des cellules T matures, ce qui est due à un blocage du développement des cellules T dans le stade DN3 (CD3-CD4-CD8-CD44-CD25⁺). En outre, il a été observé dans le thymus des souris transgéniques, un nombre significativement accru de thymocytes apoptotiques (Schwarz, Katayama et al. 1998).

Chez les souris transgéniques pour Slfn8, il a été observé spécifiquement au niveau des cellules T, un développement profondément altéré, et les cellules T périphériques ont montré une capacité proliférative réduite lors de leur stimulation par le TCR (Geserick, Kaiser et al. 2004).

3.2 Schlafen 3 chez le rat

Schlafen 3 est un gène placé sur le chromosome 10. Sa séquence génomique se compose de 6 exons et 5 introns, avec une séquence codante qui est répartie sur les trois derniers exons (Figure 40). Le transcrit de Slfn3 est formé de 4860 pb avec une partie codante de 1761 pb qui code pour une protéine de 587 acides aminés de masse estimée à 66kDa. Il

ressort de l'étude du profil d'hydrophobicité de cette protéine, une région hydrophobe dans la partie C terminale qui permet de prédire une zone transmembranaire (Figure 41).

chromosome: 10; Location: 10q26

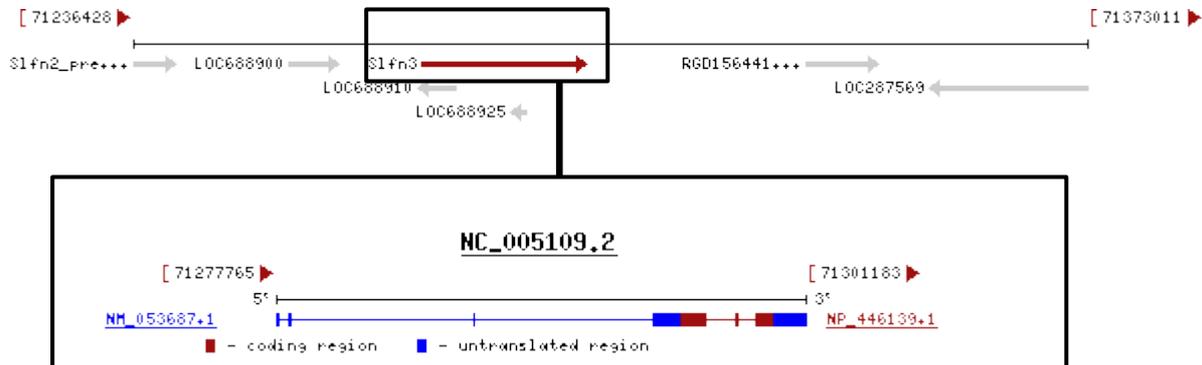


Figure 40 : Localisation chromosomique et structure exonique et intronique de Slfn3 de rat.

En étudiant les domaines fonctionnels dans la séquence primaire, nous retrouvons un « domaine divergent AAA » qui pourrait donner à Slfn3 une activité ATPase qui intervient souvent dans les fonctions de protéines chaperonnes qui agissent lors d'assemblages ou de désassemblage de complexes protéiques (Figure 41).

```

1 msitvdqtdt yaelvlsige itlgektrks mkdsqrrkre aktfqqavct llnsgggvak
61 ariknqnydf srdvggdle nflphildfp heyldfkqv dyflmfvkaw klkqkpggit
121 tlktnlyirs issielkav navkflksrk cskgrsdsrl sspgtivcne vlneclnfn
181 rdcftckekf cftkathaev kltpkenile ilpqtvsffa nadggylfig ldgktqeiig
241 feaeksdlvh leseiekir qlpvthfce rekikytckf mevhpkaac sfvcalrver
301 fccavfaaep eswhvedscv krftaedwvk rqmdgpacfs kqdkgplqss rlpshprsc
361 pdnpdalqqs aglpvisgkv isspealcgk lfstqeaheq llwaqlslp kgtlvtkrw
421 aldplqdkh gvildtlhip qdsltllhgf vlgedledd stillrelgae lgyykqtav
481 tlkqlanhg sytekigiai kitylghnka vslydssski hypkyylt etaknlekal
541 aeilsresf yslprqncsd hfifafflsf sflvlfws wglpnp

```

Divergent AAA domain

Domaine transmembranaire

Figure 41 : Séquence primaire de la protéine Slfn3 de rat.

II Etude de Schlafen-3 (Slfn3)

Article 2 :

Characterization of Schlafen-3 mRNA expression in effector and regulatory T cells

Jean-Benoît Le Ludec, Gaëlle Bériou, Cédric Louvet, Michele Heslan, Elise Chiffolleau, Régis Josien and Maria-Cristina Cuturi

Résumé de l'article 2 :

Des membres de la famille protéique Schlafen (Slfn) ont été montrés comme étant impliqués dans la régulation de la prolifération ainsi que le développement des LT. Schlafen-1 (Slfn1), le premier membre de la famille à avoir été étudié, a été décrit comme ayant un rôle inhibiteur sur la croissance des lymphocytes T, et provoque un verrouillage des fibroblastes de la lignée NIH3T3 dans la phase de transition G1/S du cycle cellulaire. Nous avons identifié Schlafen-3 (Slfn3) surexprimé dans les LT CD4+CD25+ du thymus, ainsi que dans ceux de la périphérie. De manière intéressante, nous montrons que dans des conditions d'activation induisant leur prolifération, l'expression transcriptionnelle de Slfn3 est inhibée dans les cellules T régulatrices, et induite dans les T effectrices. De plus nous montrons que le TGF- β inhibe l'expression de Slfn3 lors de l'activation des LT par anti-CD3 et anti-CD28, alors que dans le même temps, l'expression de FoxP3 est augmentée. Nos résultats suggèrent que Slfn3 pourrait avoir un rôle dans l'activation et la différenciation des LT.

Characterization of Schlafen-3 mRNA expression in effector and regulatory T cells

Jean-Benoît Le Ludec *, Gaëlle Bériou*^α, Cédric Louvet*[#], Michele Heslan*, Elise Chiffolleau*, Régis Josien and Maria-Cristina Cuturi,*

* Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unit 643 and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France

[#] Current address: Diabetes Center, Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA 94143-0540, USA.

^α Current address: Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

Keywords: Rodent – Allograft tolerance – Schlafen family – TCD4⁺ CD25⁺ - TGFβ

Running title: Regulation of Schlafen-3 in T CD4⁺ cells

Address correspondence to: Dr. Maria-Cristina Cuturi, INSERM U643, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33-240-087-410. Fax: +33-240-087-411. Email: [Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr](mailto: Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr)

ABSTRACT

Members of the Schlafen (Slfn) protein family have been implicated in the regulation of cell growth and T cell development. Schlafen-1 (Slfn1), the prototypic member of the Schlafen family, was described as an inducer of growth arrest in T-lymphocytes and causes a cell cycle arrest in NIH3T3 fibroblasts prior to the G1/S transition. We have identified Schlafen-3 (Slfn3) as being over expressed in CD4+CD25+ T cells in the thymus and the periphery. Interestingly we show that upon activation and proliferation, Slfn3 mRNA is down-regulated in regulatory T cells and up-regulated in effector T cells. Moreover TGF β inhibits the expression of Slfn3 in anti-CD3/CD28 activated T cells whereas at the same time FoxP3 mRNA is increased. Our results suggest that Slfn3 could have a role in T cell differentiation and activation.

INTRODUCTION

So far only a few molecules have been shown to be specific markers of tolerance or to be directly implicated in the tolerance mechanisms induced by regulatory T cells. We previously applied a gene searching method to a model of allograft tolerance induced by LF15-0195 treatment (Chiffolleau, Beriou et al. 2002) to identify new molecules implicated in the mechanisms of tolerance. In this model, donor-specific tolerance can be transferred by CD4⁺ T splenocytes from long-term tolerant recipients (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). By Suppressive Subtractive Hybridization we identified Slfn3 as being highly expressed in donor-stimulated T cells from long-term LF treated tolerant animals compared to naive ones.

The Schlafen (Slfn) family proteins was first discovered in mice (Schwarz, Katayama et al. 1998), and currently comprises 10 members (Geserick, Kaiser et al. 2004). These molecules seem to play an important role in the ontogenesis of thymocytes (Schwarz, Katayama et al. 1998; Geserick, Kaiser et al. 2004) and one of them (Slfn1) is involved in the control of the cellular cycle (Brady, Boggan et al. 2005). Slfn3 has been shown to have an anti-proliferative effect when ectopically expressed by fibroblasts (Schwarz, Katayama et al. 1998).

In this study we show that Slfn3 is overexpressed in natural regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells compared to CD4⁺CD25⁻ T cells. However, we show that Slfn3, like CD25, CTLA4 and GITR (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995; Read, Malmstrom et al. 2000; Takahashi, Tagami et al. 2000; Shimizu, Yamazaki et al. 2002), is not specifically expressed by natural regulatory T cells. Moreover we show that Slfn3 mRNA expression is highly induced during CD4⁺CD25⁻ and total T cells activation and is surprisingly downregulated in CD4⁺CD25⁺ T cells. We thus show herein that Slfn3 is not a specific marker of naturally regulatory T cells and suggest Slfn3 to be a new marker of T cell activation .

MATERIALS AND METHODS

Animals and transplantations.

Six to 10-week-old Lewis rats were obtained from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Rats were housed in our animal facility under standard conditions in accordance with our institution's regulations on animal care.

LEW.1W (RT1.u) rats were used as heart donors, and LEW.1A as allograft recipients. Heterotopic heart transplantations were performed using the Ono and Lindsey method (Ono and Lindsey 1969). Graft function was monitored daily by palpation through the abdominal wall and rejection was defined as the complete cessation of heart-beat and confirmed by histology. In order to induce donor-specific allograft tolerance, recipients were treated with LF 15-0195 (Laboratoires Fournié Dijon France) at 3mg/kg for 20 days, as previously described (Chiffolleau, Beriou et al. 2002).

Antibodies:

The following hybridomas of anti-rat mAbs were obtained from the European Collection of Animal Cell Culture (Salisbury, U.K.) and were used for cell depletion, cytofluorometry and cell sorting after coupling if necessary to FITC, biotin, PE, APC (Bioatlantic, Nantes, France) or Alexa-647 (Molecular Probes): OX6 (MHC class II RT1B), OX35 (CD4), OX8 (CD8 α), OX42 (CD11b/c), R7/3 (TCR $\alpha\beta$), OX62 (intergrin α E2 chain or CD103), OX33 (anti-CD45 present on B cells), OX39 (CD25, IL-2R α -chain) and CD161a (clone 3.2.3). Alternatively, His 24 (CD45R) and CD3 (clone KT3) were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) and the hybridoma J319 (anti-rat CD28) was kindly provided by Dr T. Hünig (University of Wurzburg, Germany). A naturalizing murine anti-human TGF β mAb-producing hybridoma (clone 2G7) (Lucas, Bald et al. 1990) was kindly provided by Dr. K. Melief (Academish

Ziekenhuis Leiden, The Netherlands). The human CD16 mAb (clone 3G8) was used as an isotype-matched control. Secondary Abs included biotin-conjugated anti-rabbit IgG, HRP-conjugated streptavidin, and VIP substrate, purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

Cell separations

T cells. Depending on the experiments, enriched T cells preparations were obtained from the lymph-node or spleen using nylon wool columns (60 to 70% of T cells) (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). These preparations were further enriched in T cells by depletion using anti-His24 and anti-OX42 MAbs with anti-mouse IgG-coated magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway). Purity was routinely $\geq 95\%$.

CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were purified by positive selection using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA), as previously described (Voisine, Hubert et al. 2002; Hubert, Voisine et al. 2004). Briefly, splenocytes were stained with R7-3-FITC (anti-TCR), Ox8-PE (anti-CD8), Ox35-Cy7 (anti-CD4) and Ox39-APC Alexa-647 (anti-CD25). Purity was $> 99\%$.

Thymocytes. TCR⁺/CD25⁻ and TCR⁺/CD25^{high} cells were sorted with the FACSAria flow cytometer using anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC and anti-CD25-Alexa-647 MAbs. The resultant purity of sorted cells was $>98\%$.

Mix Lymphocyte Reaction (MLR) and Anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation

Cells were cultured in RPMI 1640 (RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 1 % non-essential amino acids (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillin (GIBCO, Carlsbad, CA, USA); 0.1 mg/ml streptomycin (GIBCO) and 10 % heat-inactivated fetal calf serum (GIBCO, Carlsbad,

CA, USA)). The cultures were incubated at 37°C, in 5% CO₂. Cells were stimulated for the indicated times.

Low-density cells corresponding to DC-enriched cell populations from donor-type LEW.1W (RT1.u) rats were irradiated and served as stimulator cells, while purified T cells served as responder cells. Responder (2×10^5 cells/well) and stimulator cells (5×10^4 cells/well) were plated in 96-well round-bottomed plates in triplicate in a final volume of 200 μ L.

Total T cells, CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁻ T cells from naive rats (5×10^4 cells/well) were stimulated in 96-well flat bottom plates (NUNCTM, Merck, Eurolab, France) coated with anti-CD3 (1 μ g/ml) and with addition of soluble anti-CD28 (1ng/ml) in a final volume of 200 μ l. When indicated, recombinant TGF β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (2ng/mL) of TGF β Ab (2G7 at 1 μ g/mL) or antibody control (3G8 at 1 μ g/mL) were added.

Real-time quantitative RT-PCR.

Total RNA from tissues or cells was prepared using the TRIzol extraction kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Genomic DNA was removed by DNase treatment and mRNA were reverse transcribed into first strand cDNA using random primers, poly-dT oligonucleotides, and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time quantitative PCR was performed as previously described (Louvet, Heslan et al. 2004). Sequence Detection System and SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Applera, Courtabaeuf, France). The following oligonucleotides were used in this study:

rat Slfn3 forward: AGCATGTTTCTCCAAGCAAGAT;

rat Slfn3 reverse: TTTAGGAAGCGAGTCCAAGTGT;

rat HPRT forward: CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC;

rat HPRT reverse: TTCGCTGATGACACAAACATGA;

rat 18S forward: AGTTCCGACCATAAACGATGC;

rat 18S reverse: CCCTTCCGTCAATTCCTTTAA;

rat FoxP3 forward: CCCAGGAAAGACAGCAACCTT;

rat FoxP3 reverse: CTGCTTGGCAGTGCTTGAGAA.

Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) or 18S ribosomal RNA were used as endogenous control genes to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, and expressed in arbitrary units.

Suppressive subtractive hybridization.

Total RNA from donor-stimulated purified T cells (after 48 hs MLR) from long-term tolerated and naïve rats were prepared using the TRIzol extraction kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Subtractive hybridization was performed using the PCR-Select Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. PCR-amplified clones from the tolerated graft library were subcloned into a pT-Adv vector (AdvanTAge PCR Cloning Kit, Clontech, Palo Alto, CA, USA), transformed into TOP10 *Escherichia coli* competent cells and plated onto LB-agar containing X-Gal/IPTG/ampicillin. Single white colonies were randomly selected and cultured in LB-ampicillin medium in 96-well plates for 12 hours.

The cDNA clones that differentially hybridized with the long-term probe, but not with the naïve probe, were selected and sequenced. Real-time quantitative PCR was carried out to eliminate false-positive clones. The cDNA transcripts thus identified were those that were significantly overexpressed in donor stimulated T cells from long term tolerant LF treated recipients.

Statistical analysis

Real time quantitative PCR data were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test, or parametric t test. p values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Slfn3 is preferentially expressed in donor stimulated T cells from long-term LF treated tolerant animals.

After screening of the subtraction library, we identified, Slfn3 as being overexpressed in donor-activated T cells from long-term tolerant LF-treated recipients compared to naive donor-activated T cells. We confirmed this differential expression on mRNA samples by quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 1A, mRNA samples (a pool of three animals for each situation) that were used for the SSH were tested for Slfn3 mRNA expression. Donor-stimulated T cells from long-term tolerant animals expressed four times more mRNA for Slfn3 than donor-stimulated T cell from naive animals. We have previously shown in this tolerance model an expansion of the CD4+CD25+ T cell subpopulation in spleens from long-term tolerant recipients (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). In order to determine whether the increased expression of Slfn3 was related to the CD4+CD25+ T cell subpopulation we then studied the expression of Slfn3 mRNA in purified CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- T cells from long-term LF-treated tolerant animals as well as naïve animals. Our results demonstrate (Fig. 1B) that Slfn3 is expressed three times more in CD4+CD25+ T cells compared to CD4+CD25- T cells ($p=0.13$), from LF treated or from naïve animals (Fig.1B). We also analyzed FoxP3 mRNA expression in the same experiments, a gene recently identified as a marker of regulatory T cells (Sakaguchi 2003). As shown in Fig. 1C FoxP3 is highly expressed in CD4+CD25+ compared to CD25- T cells. No difference was found between CD4+CD25+ T cells from naive versus tolerant recipients. These results suggest that the increased expression of Slfn3 in T cell splenocytes from long-term tolerant recipients (Fig. 1A) could be a reflection of the expanded CD4+CD25+ T cell subpopulation described in the spleens

of tolerant recipients (Chiffolleau, Beriou et al. 2002) and not a specific effect of LF treatment on Slfn3 or FoxP3 expression in the cell population itself.

Slfn3 mRNA distribution in rat tissues.

In order to analyze the tissue distribution of Slfn3, mRNA expression was studied in rat tissues by real-time quantitative PCR (Fig. 1D) and compared to the expression of FoxP3 mRNA (Fig. 1E). Our results show that Slfn3 and FoxP3 mRNA have similar tissue distribution. In fact, both mRNA were highly detected in lymph nodes, PBL, bone marrow, spleen, and to a less extent in the aorta and thymus. Differential tissue-specific distribution was observed for the lung and the testis in that only Slfn3 was expressed in the former whereas only FoxP3 was expressed in the latter. Relatively low expression levels were observed in other tissues. Therefore Slfn3 and FoxP3 mRNA appear to be preferentially expressed in lymphoid organs and tissues.

Slfn3 is differentially expressed in thymocytes.

As the schlafen family molecules have been described as having a role in thymocyte differentiation, we analyzed the expression of Slfn3 mRNA in total thymocytes and in TCR+CD4+CD25+ and - subpopulations. As we show in Fig. 2, the mRNA expression of Slfn3 was higher in CD4+CD25+ cells compared to CD4+CD25- cells (15 fold)(n=3, p=0.04). The level of Slfn3 mRNA expression in thymocytes (the entire thymus population) was lower than in the CD4+CD25+ subpopulation, suggesting an enrichment of Slfn3 in this subpopulation.

Slfn3 is an activation marker.

We have recently demonstrated that long-term tolerated allografts from LF-treated recipients contain potent regulatory T cells that express high levels of FoxP3

transcripts and are very powerful at transferring tolerance to a subsequent allograft recipient (Heslan, Beriou et al. 2005). In order to analyze the possible role of Slfn3 in maintaining allograft tolerance, we studied the expression of Slfn3 mRNA in allografts. As shown in Fig. 3, at day 5 post transplantation, Slfn3 was strongly induced in both untreated rejected (n=6, p=0.0009) and treated surviving grafts (n=6, p<0.0001) compared to syngeneic grafts (n=7). However, Slfn3 mRNA expression was higher (close to statistical significance (p=0.051)) in rejected than in tolerated allografts. At day 100 Slfn3 mRNA expression in tolerated allografts (n=7) decreased and became comparable to that in syngeneic grafts (n=4)(Fig. 3). These results show that Slfn3 mRNA expression is highly induced in allografts during rejection and during the induction phase of tolerance. Slfn3 mRNA expression decreases in long-term tolerant allografts, to the levels of syngeneic control allografts, suggesting that Slfn3 does not play a role in the maintenance of tolerance in our model. Moreover these results suggest that Slfn3 could play a role in the initiation of the alloresponse (acute rejection) and in the activation of T cells.

Slfn3 mRNA is highly induced by T cell activation.

A low-level induction of Slfn3/7 expression during activation of peripheral T cell by anti CD3 and anti CD28 MoAb has previously been shown in mice (Schwarz, Katayama et al. 1998). Our results showing an increase in Slfn3 mRNA during rejection suggest a regulation of Slfn3 mRNA expression during T cell activation. In order to determine whether Slfn3 mRNA is modulated upon T cell activation in rats, purified T cells were optimally activated by anti-CD3 and anti-CD28 MoAb and analyzed for Slfn3 mRNA expression (unstimulated and after 24, 48 and 72 hrs of stimulation). As shown in Fig. 4A, we observed a strong induction of Slfn3 mRNA during T cell stimulation with a peak at 72hs (40 times more than in resting cells). We

also measured proliferation in these same samples and found the kinetics of proliferation to follow those of Slfn3 mRNA expression (Fig. 4B). We thus show here that Slfn3 mRNA is strongly induced by T cell activation and proliferation.

T CD4+CD25+/- cells show different Slfn3 mRNA regulation upon stimulation.

We next investigated whether Slfn3 mRNA expression is regulated in CD4+CD25+/- T cells as it is in the total T cell population. CD4+CD25+/- T cells were purified and stimulated by anti-CD3 and anti-CD28 MoAb. We analyzed Slfn3 mRNA expression in unstimulated and in cells stimulated for 48 hrs. As shown in Fig. 4C, Slfn3 mRNA was strongly decreased after 48 hrs of stimulation for CD4+CD25+ T cells. On the contrary, Slfn3 mRNA was highly increased in the same conditions for CD4+CD25- T cells. Very interestingly, whereas we observed a contrasting regulation of Slfn3 expression in CD4+CD25+/- T cells, the stimulation induces comparable proliferation of CD4+CD25+/- T cells (Fig. 4D). These results show that Slfn3 is differentially regulated during activation of CD4+CD25+/- T cells and suggest that Slfn3 mRNA expression does not depend on proliferation mechanisms, as has been previously reported.

TGF β regulates Slfn3 mRNA expression during T cell stimulation.

TGF β has been shown to play an important role in/have an effect on the regulation of T cell activation/differentiation (Ranges, Figari et al. 1987; Gorelik and Flavell 2002; Chen, Jin et al. 2003) and to have a regulatory effect on certain T cell functions (proliferation, apoptosis) (Kehrl, Wakefield et al. 1986; Green, Droin et al. 2003; Marrack and Kappler 2004). We thus tested the effect of TGF β during T cell activation by CD3 and CD28 MoAb after 48 hrs. We analyzed the effect of TGF β on total T cells as well as CD4+ and CD8+ T cells. The results presented in Fig. 5A show

a negative regulation of Slfn3 expression by TGF β . This effect is specific to TGF β because the addition of a neutralising anti TGF β monoclonal antibody reversed the effect. We thus show here a down-regulating effect of TGF β on the expression of Slfn3 in activated T cells and that this regulation is the same on total T cells, CD4+ or CD8+ T cells. We also analyzed FoxP3 mRNA expression in the same experiments. The results shown in Fig. 5B show that FoxP3 mRNA expression is increased by TGF β in CD3 and CD28 MoAb-activated T cells (four times), in CD3/CD28-activated CD4+ T cells (30 times) and in CD3/CD28-activated CD8+ T cells (15 times). These results show that TGF β differentially regulates Slfn3 and FoxP3 mRNA expression in activated T cells

DISCUSSION

To better understand the mechanisms of action of regulatory T cells and their role in tolerance, we have applied the Subtractive Suppressive Hybridisation technique on donor-stimulated T cells from long-term tolerant (LTT) animals induced by treatment with LF15-0195 versus naïve donor stimulated T cells, and identified Slfn3 as being overexpressed in the former.

By quantitative RT-PCR, we showed that Slfn3, as FoxP3, is highly and preferentially expressed in lymphoid organs, suggesting a role for this molecule in lymphoid function and differentiation.

FoxP3 expression has recently been shown to be a specific regulatory T cell marker and its role has been largely studied in the thymus and peripheral organs (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003), with no data concerning the testis. We have shown a high expression of FoxP3 transcript in this organ. Since the testis is an immunologically privileged site (Nicholas and Scothorne 1969; Whitmore and Gittes 1978), it will be interesting to study the significance of FoxP3 expression in this organ.

We have previously shown that splenocytes from long-term LF-treated tolerant recipients have the capacity to transfer donor-specific tolerance to a naïve recipient. We identified in the spleen and thymus from LTT recipients, the CD4+CD25+ population as being the population with the strongest regulatory effect. Moreover, CD4+CD25+ T cells are highly expanded (in both percentage and absolute numbers) in splenocytes from tolerant recipients. We hypothesized that the increased expression of Slfn3 observed in donor-stimulated T cells from LTT recipients could be related to the increase in the CD4+CD25+ T cell population. We therefore analysed Slfn3 mRNA expression in naïve CD4+CD25+ and - T cells compared to CD4+CD25+ and - T cells from LTT recipients. Ours results show that Slfn3 mRNA

expression is higher in CD4+CD25+ T cells than in CD4+CD25- T cells, but is expressed similarly in these cells from naïve animals and LTT recipients. These results show that Slfn3 mRNA is expressed to a greater extent in CD4+CD25+ T cells than in CD25- cells. These results also suggesting that LF treatment does not increase the expression of Slfn3, but rather that it's increased expression in tolerant splenocytes could be due to the expansion of the CD4+CD25+T cell population in these animals.

Interestingly, whereas Slfn3 is highly expressed in peripheral lymphoid organs, in the thymus Slfn3 expression is relatively low. We observed a differential Slfn3 mRNA expression in thymocyte CD4+CD25+/- sorted cells, with a stronger expression in CD4+CD25+ cells. The study of other thymocyte subpopulations showed differential Slfn3 mRNA expression in different stages of thymocyte development (data not shown), suggesting an implication of Slfn3 in T cell development in the thymus as for Slfn1 and Slfn8 (Schwarz, Katayama et al. 1998; Geserick, Kaiser et al. 2004).

The Slfn family has been recently described as having a role in T cell activation (Schwarz, Katayama et al. 1998; Geserick, Kaiser et al. 2004). Slfn3 has been shown to have a low mRNA expression in total activated T cells and ectopic expression of Slfn3 in fibroblasts showed an anti-proliferate effect (Schwarz, Katayama et al. 1998). In this study, we observed a strong time-dependent induction of Slfn3 mRNA expression upon T cell stimulation. Furthermore, we observed a differential effect of stimulation on Slfn3 mRNA expression, depending on the CD4+ T cell subpopulation. Whereas stimulation by CD3 and CD28 MoAb induces Slfn3 mRNA overexpression in total, CD4+ and CD8+ T cells, we observed the opposite regulation of Slfn3 expression in CD4+CD25+ T cells. In fact Slfn3 mRNA expression was strongly decreased in CD4+CD25+ T cells after 48 hs of stimulation (in CD4+CD25- T cells Slfn3 expression was highly increased in the same conditions). Interestingly, with the

stimulation used, we induced comparable levels of proliferation of both CD4⁺CD25⁺ and - T cells. These results suggest that Slfn3 could have a role in T cell activation/differentiation but does not have a direct role on proliferation mechanisms, as has been suggested by Schwarz for others members of the family (Schwarz, Katayama et al. 1998).

In this study we have shown that Slfn3 mRNA expression is strongly induced (5 days after transplantation) in allografts from untreated and treated recipients compared to syngeneic allografts. We have additionally shown that Slfn3 mRNA expression is induced during T cell activation but also that Slfn3 is constitutively expressed by regulatory T cells. By measuring the transcriptional expression of Slfn3, we could not identify the cellular populations expressing Slfn3 within the graft. We thus endeavored to identify the cells expressing Slfn3 in the graft using a polyclonal antibody produced against specific rat Slfn3 peptides. Analysis of allografts using this Ab led to a very strong background staining that precluded the possibility of characterizing the population expressing Slfn3. In a previous study we analyzed cytokine mRNA expression in allografts in this model and described equivalent amounts of IL2 mRNA expression (Chiffolleau, Beriou et al. 2002). Moreover the percentage of T cells infiltrating the allografts is decreased in tolerant recipients.

As we have shown, Slfn3 is not a specific marker of regulatory T cells. These results suggest that the increased expression of Slfn3 in allografts from rejecting recipients could be due of an infiltration by activated T cells, and in allografts from tolerant recipients, to the infiltration by regulatory T cells.

At day 100 we have shown that Slfn3 mRNA expression in tolerated allografts decreases and become comparable to that in syngeneic grafts. We have previously shown in these animals the presence in the graft of a very powerful T cell population (FoxP3 positive) able to transfer tolerance (Heslan, Beriou et al. 2005). The low

expression of Slfn3 in long-term tolerated grafts could be explained by the presence of activated regulatory T cells as we have shown decreased Slfn3 mRNA expression in these cells.

In conclusion, we have identified Slfn3 in a model of tolerance but were unable to show an active role of Slfn3 in the induction or maintenance process of tolerance.

We demonstrate in this study a negative regulation of TGF β on Slfn3 mRNA expression during T cell activation (total, CD4⁺ or CD8⁺ T cells). TGF β have been shown to have an antiproliferative activity on T cells in vitro (Kehrl, Wakefield et al. 1986). In our experiments TGF β also decreased T cell proliferation (results not shown). TGF β has been shown to have important implications in the regulation of T cell activation/differentiation (Ranges, Figari et al. 1987; Gorelik and Flavell 2002; Chen, Jin et al. 2003) and to have a regulatory effect on some T cell functions such as proliferation and apoptosis (Kehrl, Wakefield et al. 1986; Green, Droin et al. 2003; Murrack and Kappler 2004). Our results show that Slfn3 is increased during activation and proliferation of T cells. However, this increase does not depend only on T cell proliferation, suggesting that the antiproliferative effect of TGF β and the decrease of Slfn3 mRNA expression could reflect two independent mechanisms. TGF β also has an inhibitory effect on T cell activation and differentiation into Helper T cells (Gorelik and Flavell 2002) and Cytotoxic T cells (Ranges, Figari et al. 1987; Smyth, Strobl et al. 1991). In the same experiments we have shown that TGF β increased FoxP3 mRNA expression, suggesting a role for TGF β in regulatory T cell differentiation as has been demonstrated previously (Chen, Jin et al. 2003). Given that we have shown Slfn3 to be over expressed during activation of naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells and that this increase is inhibited by TGF β . It will be relevant to determine if Slfn3 could be implicated in T differentiation.

In conclusion, we have shown in this study that Slfn3 is preferentially expressed by resting CD4+CD25+ T cells in the thymus and in the periphery and that its expression is decreased upon stimulation. We have also shown that Slfn3 is up regulated upon T cell activation and during allograft rejection. Moreover the expression of Slfn3 on CD3 and CD28 MoAb-activated T cells is highly inhibited by TGF β whereas at the same time Foxp3 mRNA is increased, suggesting that Slfn3 could have a role in T cell differentiation and could be a new marker of T cell activation.

REFERENCES

- Brady, G., L. Boggan, et al. (2005). "Schlafen-1 causes a cell cycle arrest by inhibiting induction of cyclin D1." J Biol Chem **280**(35): 30723-34.
- 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.
- Chiffoleau, E., G. Beriou, et al. (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**(8): 745-57.
- Chiffoleau, 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.
- 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.
- Geserick, P., F. Kaiser, et al. (2004). "Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif." Int Immunol **16**(10): 1535-48.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2002). "Transforming growth factor-beta in T-cell biology." Nat Rev Immunol **2**(1): 46-53.
- Green, D. R., N. Droin, et al. (2003). "Activation-induced cell death in T cells." Immunol Rev **193**: 70-81.
- Heslan, J. M., G. Beriou, et al. (2005). "Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vbeta7-TCR rearrangements in tolerated allografts." Transplantation **80**(10): 1476-84.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.
- Hubert, F. X., C. Voisine, et al. (2004). "Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG." J Immunol **172**(12): 7485-94.
- Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, et al. (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." J Exp Med **163**(5): 1037-50.
- Louvet, C., J. M. Heslan, et al. (2004). "Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion." Transplantation **78**(9): 1259-66.
- Lucas, C., L. N. Bald, et al. (1990). "The autocrine production of transforming growth factor-beta 1 during lymphocyte activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA." J Immunol **145**(5): 1415-22.

- Marrack, P. and J. Kappler (2004). "Control of T cell viability." Annu Rev Immunol **22**: 765-87.
- Nicholas, R. J. and R. J. Scothorne (1969). "Studies on the testis as an 'immunologically privileged' site." J Anat **104**(Pt 1): 194.
- Ono, K. and E. S. Lindsey (1969). "Improved technique of heart transplantation in rats." J Thorac Cardiovasc Surg **57**(2): 225-9.
- Ranges, G. E., I. S. Figari, et al. (1987). "Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **166**(4): 991-8.
- Read, S., V. Malmstrom, et al. (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." J Exp Med **192**(2): 295-302.
- Sakaguchi, S. (2003). "The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery." J Clin Invest **112**(9): 1310-2.
- 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.
- Schwarz, D. A., C. D. Katayama, et al. (1998). "Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development." Immunity **9**(5): 657-68.
- 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.
- Smyth, M. J., S. L. Strobl, et al. (1991). "Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta." J Immunol **146**(10): 3289-97.
- 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.
- Voisine, C., F. X. Hubert, et al. (2002). "Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity." J Immunol **169**(5): 2284-91.
- Whitmore, W. F. and R. F. Gittes (1978). "Intratesticular grafts: the testis as an exceptional immunologically privileged site." Trans Am Assoc Genitourin Surg **70**: 76-80.

FOOTNOTES

¹ This work was supported by a grant from the Juvenile Diabetic Foundation. J.B.L.L. was supported by a fellowship from the Juvenile Diabetic Foundation, “La société francophone de transplantation” and “La fondation Progreffe”.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Maria Cristina Cuturi, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 643, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. E-mail address: [Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr](mailto: Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr)

³ Abbreviations used in this paper: Slfn3 (Schlafen-3), from long-term tolerant (LTT), peripheral blood lymphocytes (PBL)

LEGENDS to FIGURES

Figure 1. Slfn3 and FoxP3 mRNA expression

Slfn3 mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR. Significant differences are indicated ($*p<0.05$). **(A)** Slfn3 mRNA expression in MLR samples of long-term survival LF 15-0195 treated animals and naïve animals. mRNA levels were normalized by HPRT and expressed in arbitrary units (AU). Each MLR was realized with a pool of cells from three animals. **(B)** Expression of Slfn3 mRNA in CD25⁺/⁻ CD4⁺ T cells. Slfn3 mRNA levels were normalized with HPRT mRNA. Each group was expressed as the mean \pm SD of 3 animals per group, in arbitrary units (AU). **(C)** Expression of FoxP3 mRNA in CD25⁺/⁻ CD4⁺ T cells. FoxP3 mRNA levels were normalized with HPRT mRNA. Each group was expressed as the mean \pm SD of 3 animals per group, in arbitrary units (AU). **(D)** Expression of Slfn3 mRNA in extracts from various rat tissues and organs. Slfn3 mRNA levels were normalized with 18S rRNA and expressed in arbitrary units (AU). PBMC is an abbreviation of peripheral blood mononuclear cells. **(E)** Expression of FoxP3 mRNA in extracts from various rat tissues and organs. FoxP3 mRNA levels were normalized with 18S rRNA and expressed in arbitrary units (AU).

Figure 2. Slfn3 mRNA expression in thymocytes.

Expression of Slfn3 mRNA in CD4⁺CD25⁺/⁻ thymocytes was assessed by real-time quantitative PCR. Results are expressed as Slfn3 to HPRT mRNA expression ratios. Each group was expressed as the mean \pm SD of 3 animals per group, in arbitrary units (AU). Significant differences are indicated ($*p<0.05$).

Figure 3. Slfn3 mRNA expression in heart allografts.

Slfn3 mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR in syngeneic (n=3), allogeneic rejecting (n=3) and tolerated heart grafts (n=3) at 5 and 100 days after transplantation. Allogeneic grafts were rejected within 6.8 ± 1.6 days. Tolerance was induced by LF15-0195 treatment. mRNA levels were normalized by HPRT. Each time point was expressed as the mean \pm SD in arbitrary units (AU). Significant differences are indicated ($*p < 0.05$).

Figure 4. Slfn3 mRNA expression and proliferation in activated total T cells and CD4+CD25+ or CD4+CD25- T cells.

Expression of Slfn3 mRNA in cells activated with anti-CD3 (1 μ g/ML) and anti-CD28 (1 μ g/ML) was assessed by real-time quantitative PCR. Results are expressed as Slfn3 to HPRT mRNA expression ratios and given in arbitrary units (AU). Values represent the cpm \pm SD of thymidine incorporation. **(A)** Kinetics of expression of Slfn3 mRNA and proliferation following T cell activation. Results are representative of three independent experiments. **(B)** Expression of Slfn3 mRNA and proliferation of CD25+/- CD4+ activated T cells at 48 hours. Results represent the mean \pm SD of two independent experiments.

Figure 5. Effect of TGF β on Slfn3 and FoxP3 mRNA expression in activated T cells.

mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR. Total, CD8+ and CD4+ T cells were activated with anti-CD3 (1 μ g/ML) and anti-CD28 (1 μ g/ML), 2 ng/mL of TGF β , 1ng/mL of anti-TGF β or 1ng/mL of control antibody. Cells were collected at 72h. Results are expressed as Slfn3 or FoxP3 to HPRT mRNA and

expressed in arbitrary units (AU). **(A)** Expression of Slfn3 mRNA. Results are representative of three independent experiments. **(B)** Expression of FoxP3 mRNA. Results are representative of two independent experiments.

Figure 1

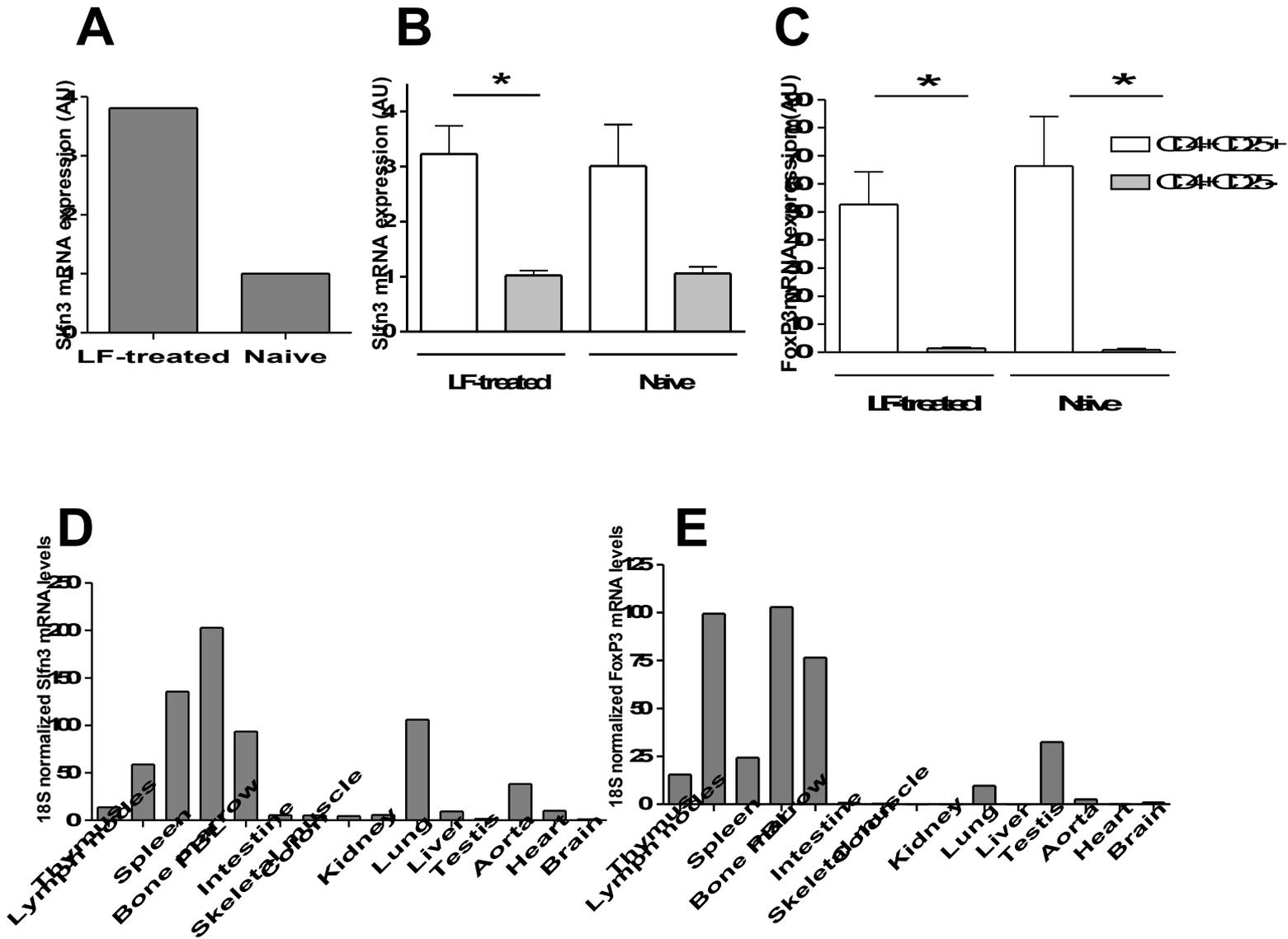


Figure 2



Figure 3

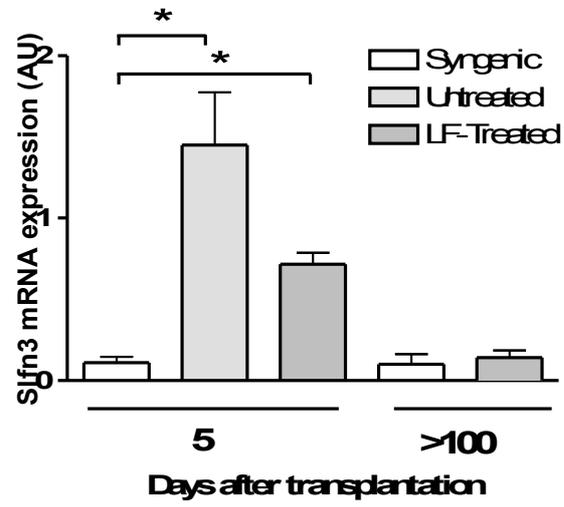


Figure 4

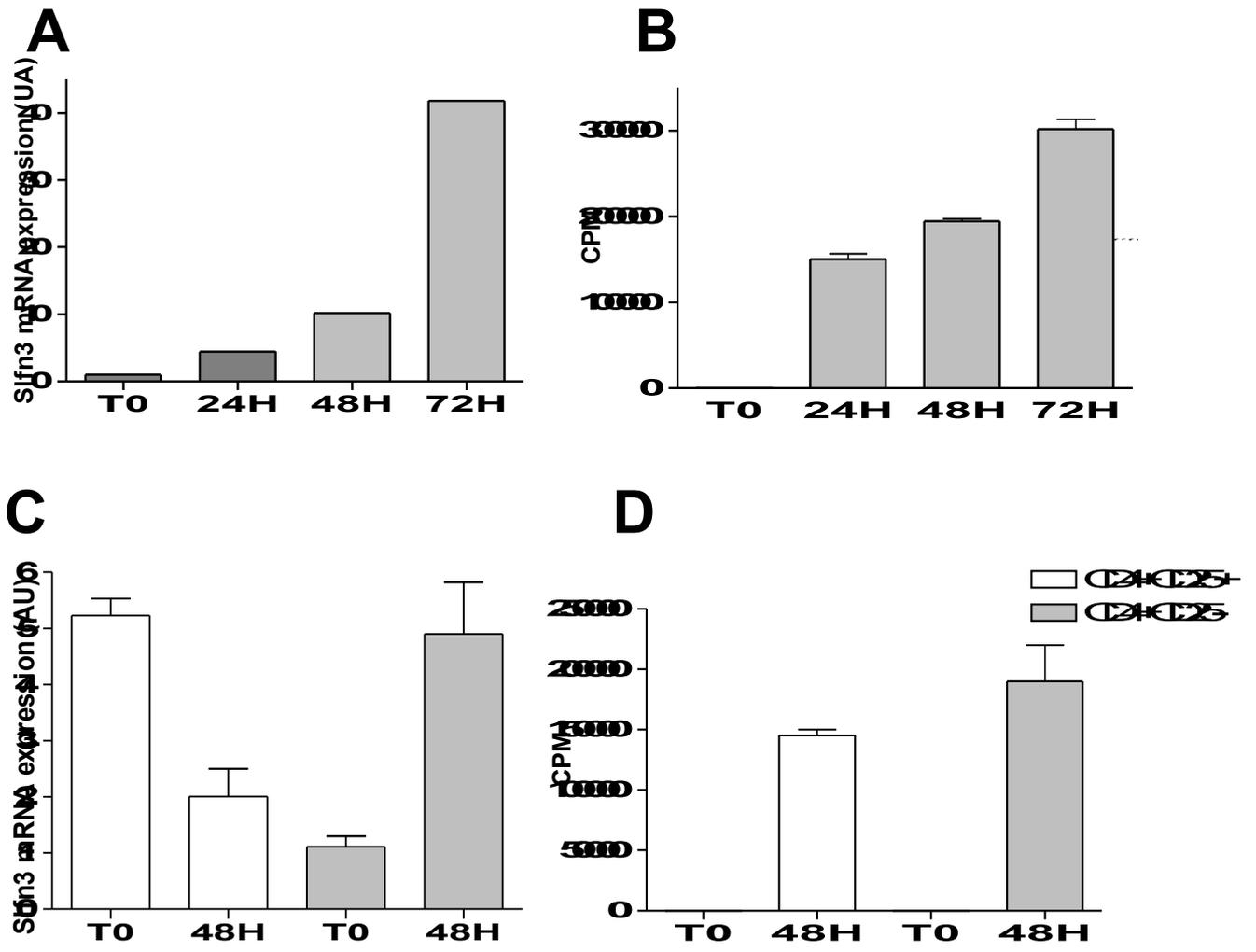
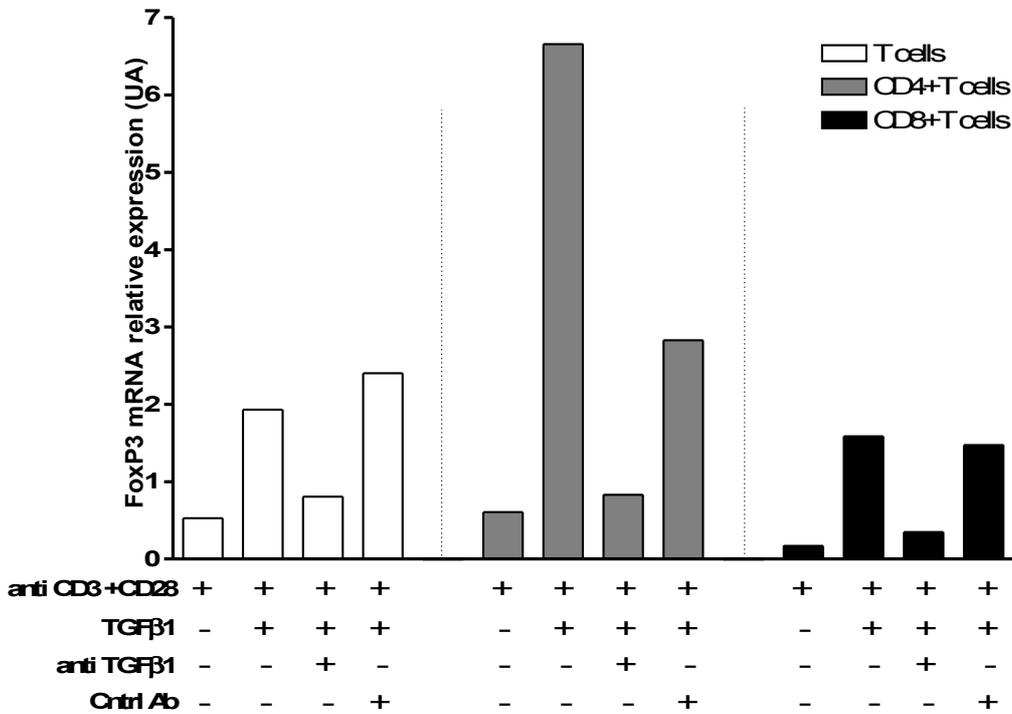
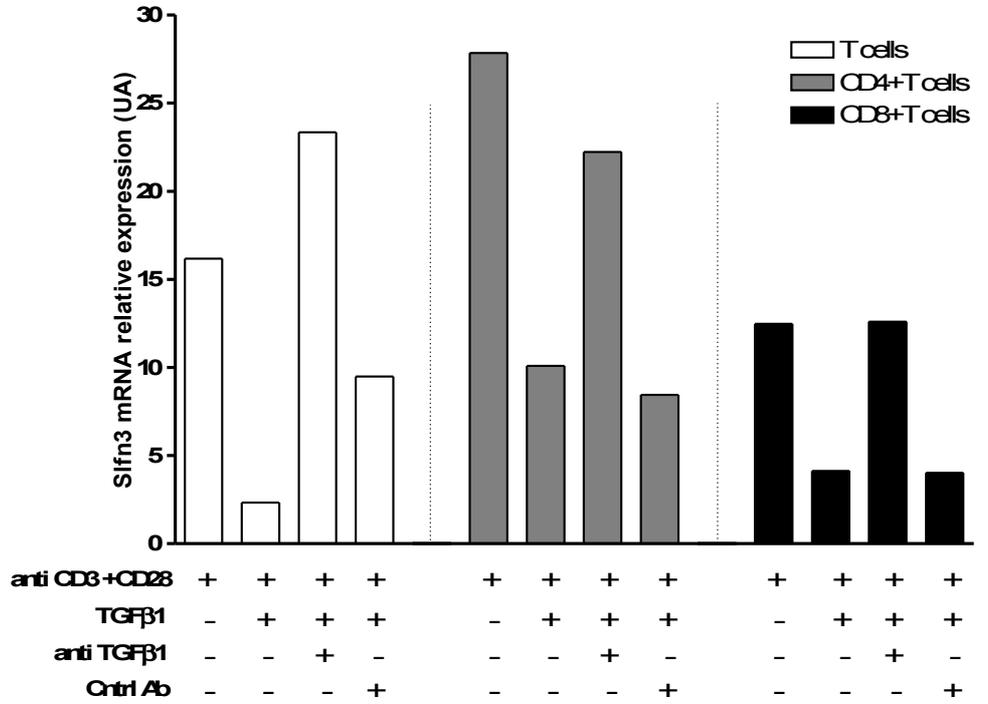


Figure 5



III Discussion et perspectives

A. Discussion des résultats

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des cellules T régulatrices, ainsi que leur rôle dans la tolérance, nous avons réalisé une hybridation soustractive suppressive sur les LT de la rate stimulés d'animaux tolérants à long terme (TLT) traités au LF15-0195. Nous avons identifié *Slfn3* surexprimé dans ces cellules comparé aux LT stimulées d'animaux naïfs.

Par PCR quantitative, nous avons montré que *Shlafen-3* (*Slfn3*), comme *FoxP3*, est fortement et préférentiellement exprimé dans les organes lymphoïdes, suggérant ainsi un rôle de cette molécule dans les fonctions ou la différenciation des cellules immunes.

L'expression de *FoxP3* récemment été montrée comme étant un marqueur spécifique des LT régulatrices, et son rôle à déjà été largement étudié dans le thymus et les organes lymphoïdes périphériques (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003), mais aucun résultat n'a été montré dans les testicules. Nous avons montré une forte expression transcriptionnelle de *FoxP3* dans cet organe. C'est un site immun privilégié (Nicholas et al. 1969; Whitmore et al. 1978) et il serait intéressant d'étudier l'importance de *FoxP3* dans cet organe.

Nous avons précédemment montré que les splénocytes des animaux TLT induits par traitement au LF15-0195, ont la capacité de transférer une tolérance spécifique du donneur à un receveur naïf. Nous avons identifié dans la rate et le thymus, des receveurs TLT, une population de cellules T régulatrices $CD4+CD25+$ capable de transférer la tolérance (Chiffolleau, Beriou et al. 2002), et fortement représentée (pourcentage et nombre absolu) dans les splénocytes des receveurs tolérants. Nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de *Slfn3* observée dans les LT des animaux tolérants stimulés par les CPA du donneur, pourrait être relative à l'augmentation de la population des LT $CD4+CD25+$ dans ces animaux. Nous avons analysé l'expression transcriptionnelle de *Slfn3* dans les LT $CD4+CD25+$ et $CD4+CD25-$ des animaux naïfs et des animaux TLT. Et en effet, nos résultats montrent que l'expression de *Slfn3* est plus importante dans les LT $CD4+CD25+$ comparée aux LT $CD4+CD25-$. Cependant, nous n'avons observé aucune différence d'expression entre les cellules des animaux naïfs et cellules des animaux tolérants. Ces résultats suggèrent que le traitement au LF15-0195 n'accroît pas l'expression de *Slfn3* retrouvé surexprimé dans la MLR des animaux tolérants, et que l'accroissement d'expression de cette molécule est due au plus grand nombre de LT $CD4+CD25+$ parmi les LT des animaux tolérants.

De manière étonnante, alors que Sln3 est fortement exprimé dans les organes lymphoïdes périphériques, son expression dans le thymus est relativement faible. Nous avons montré une expression différentielle dans les thymocytes triés CD4+CD25+/-, avec une forte expression transcriptionnelle dans les cellules CD4+CD25+. Des résultats préliminaires concernant l'étude de l'expression de Sln3 dans d'autres populations de thymocytes montrent une expression différentielle de cette molécule à différents stades de développement des thymocytes, suggérant ainsi une implication de Sln3 dans le développement des cellules thymiques, comme il l'a précédemment été décrit pour Sln1 et Sln8 (Schwarz et al. 1998; Geserick et al. 2004). La figure 42 montre les résultats préliminaires que nous avons obtenus dans différentes sous populations thymiques. Ces résultats vont à l'encontre des résultats précédemment publiés qui ne montraient pas d'expression différentielle de Sln3 chez la souris pendant la maturation des thymocytes (Schwarz, Katayama et al. 1998; Geserick, Kaiser et al. 2004).

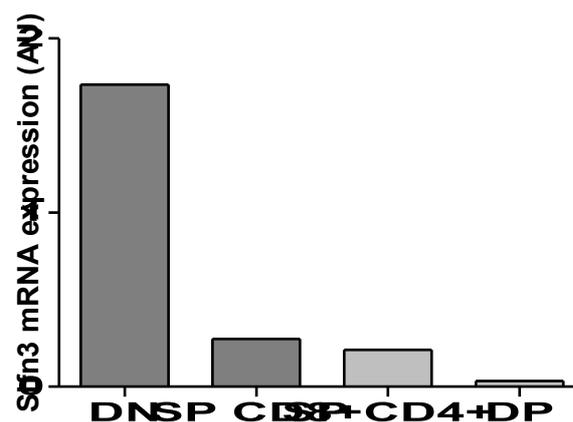


Figure 42 : Expression transcriptionnelle de Sln3 dans différentes populations de thymocytes, double négatif CD4-CD8- (DN), simple positif CD4-CD8+ (SP CD8+), simple positif CD4+CD8- (SP CD4+) et double positif CD4+CD8+ (DP). Les résultats sont normalisés en fonction de l'expression de L'HPRT et sont exprimés en unité arbitraire (UA).

La famille Sln a récemment été décrite comme ayant un rôle dans l'activation des cellules T (Schwarz, Katayama et al. 1998; Geserick, Kaiser et al. 2004). Sln3 a été montré comme ayant une faible expression dans les LT totaux activés, et son expression ectopique dans des fibroblastes a montré un effet anti-prolifératif de cette molécule (Schwarz, Katayama et al. 1998). Dans cette étude, nous montrons une forte induction de l'expression de Sln3 dans les LT activés, avec un niveau d'expression dépendant du temps de stimulation. Nous avons également montré une différence d'expression transcriptionnelle de Sln3 selon la sous-population CD4+ stimulée. Alors que la stimulation avec anti-CD3 et anti-CD28 induit une

surexpression de Slnf3 dans les LT totaux, CD4⁺ et CD8⁺, nous avons observé une régulation opposée dans les LT CD4⁺CD25⁺. En effet l'expression de Slnf3 est fortement diminuée dans les LT CD4⁺CD25⁺ après 48h de stimulation alors que dans les LT CD4⁺CD25⁻, son expression est fortement augmentée dans les mêmes conditions. Pourtant, dans ces mêmes stimulations, nous avons mesuré des niveaux de prolifération équivalents entre les LT CD4⁺CD25⁺ et CD4⁺CD25⁻. Ces résultats suggèrent que Slnf3 ne jouerait pas un rôle direct dans les mécanismes de prolifération comme il l'avait été suggéré par d'autres auteurs (Schwarz, Katayama et al. 1998).

Dans cette étude nous avons montré que l'expression transcriptionnelle de Slnf3 est fortement induite (5 jours après la transplantation) dans les allogreffes des animaux greffés non traités et traités au LF, comparés aux animaux ayant reçu une greffe syngénique. Nous avons également montré que l'expression de Slnf3 est induite pendant l'activation des LT totaux mais aussi qu'il est constitutivement exprimé dans les cellules naturelles régulatrices CD4⁺CD25⁺. Nous avons essayé d'identifier les cellules exprimant Slnf3 dans la greffe avec un anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre un peptide de sa séquence protéique chez le rat. Une fois les marquages mis au point sur des cellules transfectées, nous avons réalisé les marquages sur les allogreffes, mais nous avons eu un très fort bruit de fond qui ne nous a pas permis de caractériser les populations exprimant la protéine. Dans une étude précédente dans ce modèle, nous avons décrit un taux d'expression équivalent du transcrite codant pour l'IL2 entre les animaux non traités et les animaux traités au LF15-0195 (Chiffolleau, Beriou et al. 2002), bien que le pourcentage de LT infiltrant l'allogreffe soit diminué dans les animaux traités. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de Slnf3 dans les allogreffes (des animaux rejetant la greffe et des animaux tolérants), pourrait être dû à une infiltration de cellules T alloréactives activées.

A 100 jours après la greffe, nous avons observé que l'expression transcriptionnelle de Slnf3 dans les allogreffes tolérées diminue par rapport à 5 jours, pour devenir comparable à son niveau d'expression dans les greffes syngéniques. Nous avons montré précédemment chez ces animaux, la présence d'une population de LT dans les allogreffes tolérées, ayant une très forte capacité à transférer la tolérance (Heslan, Beriou et al. 2005). La faible expression de Slnf3 dans les greffes des animaux tolérants peut être expliquée par la forte présence de LT régulatrices activées ainsi qu'une très faible présence de cellules T alloréactives au niveau de la greffe. Nous avons en effet montré que dans les cellules régulatrices l'expression de Slnf3 est diminuée lors de leur activation.

Nous avons démontré dans cette étude une régulation négative de Slnf3 par le TGF- β pendant l'activation des LT (totaux, CD4⁺ ou CD8⁺). Le TGF- β a été montré comme ayant une implication importante dans la régulation de l'activation et la différenciation des LT

(Ranges et al. 1987; Gorelik et al. 2002; Chen et al. 2003). Il a également un effet régulateur dans certaines fonctions des LT (prolifération, apoptose) (Kehrl et al. 1986; Green et al. 2003; Murrack et al. 2004). L'effet anti-prolifératif du TGF- β a notamment été démontré *in vitro* sur les LT (Kehrl, Wakefield et al. 1986). Nos résultats montrent que l'augmentation de l'expression de Slfn3 pendant l'activation des LT ne semble pas liée à la prolifération de ces cellules, suggérant que l'effet anti-prolifératif du TGF- β et l'inhibition de l'expression de Slfn3 pourraient répondre à deux mécanismes indépendants. Le TGF- β a aussi été montré comme ayant un effet inhibiteur sur l'activation et la différenciation des LT helper (Gorelik and Flavell 2002) et des LT cytotoxiques (Ranges, Figari et al. 1987; Smyth et al. 1991). Nous avons montré que Slfn3 est surexprimé pendant l'activation des LT CD4+ et CD8+ issus d'animaux naïfs, ce qui suggère qu'il serait intéressant d'étudier l'implication de Slfn3 dans la différenciation des LT.

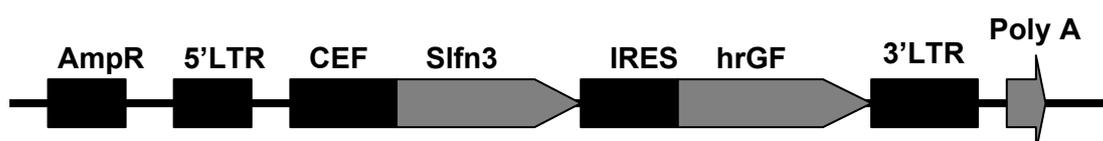
En conclusion de cette partie, nous avons montré que Slfn3 est préférentiellement exprimé dans les cellules T CD4+CD25+ dans le thymus ainsi qu'en périphérie et subit une régulation négative lors de l'activation de celles-ci. Nous avons aussi montré que l'expression de Slfn3 est induite lors de l'activation des LT et pendant le rejet de l'allogreffe. De plus, son expression dans les LT activés par anti-CD3 et anti-CD28 est fortement inhibée par le TGF- β alors que dans le même temps l'expression de FoxP3 est augmentée, ce qui suggère que Slfn3 pourrait avoir un rôle dans la différenciation des LT et pourrait être un nouveau marqueur de l'activation des LT.

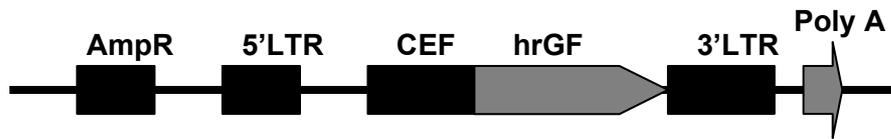
B. Perspectives

1. Construction d'un vecteur lentiviral pour étudier la fonction de Slfn3

Afin d'étudier la fonction de Slfn3 dans les cellules T, qui sont très difficilement transfectables, nous avons décidé de produire un lentivirus codant pour Slfn3. Ce type de vecteur à l'avantage de permettre d'obtenir un bon taux d'infection des cellules, tout en étant très peu immunogène (Costello et al. 2000; Dupuy et al. 2005)

Nous avons donc réalisé deux constructions. La première codant pour Slfn3 et la GFP avec un promoteur commun et une séquence IRES qui permet d'être certain de l'expression de la molécule placée en amont de la séquence codante pour la GFP (Figure 43). Et une seconde servant de contrôle et codant uniquement pour la GFP (Figure 43).





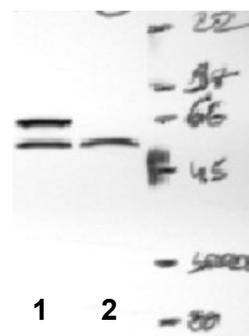
Name	Description
5' LTR site	5' long terminal repeat
CEF	CMV immediate early enhancer, Elongation factor-1-alpha promoter
Slfn3	rat Schlafen 3
IRES	internal ribosome entry site
hrGFP	humanized R. reniformis Green Fluorescent Protein
Poly A	poly A signal
AmpR	Ampicillin resistance gene

Figure 36 : Cartographie de la construction des vecteurs Slfn3-IRES-GFP et GFP.

2. Production et caractérisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre Slfn3

Nous avons fait produire un anticorps polyclonal chez le lapin (Neosystem, Strasbourg, France), contre un peptide spécifique de la séquence protéique de Slfn3 de rat. Ce peptide de séquence MSITVDQDQDYAEL correspond aux 14 premiers acides aminés de la partie N-Terminale de la séquence prédictive de Slfn3. Le peptide a été couplé à de l'ovalbumine avant d'être injecté. Après avoir récupéré le sérum des lapins sacrifiés, nous avons purifié l'anticorps sur le peptide en utilisant une colonne *HiTrap NHS-activated HP* (Amersham, Les Ulis, France).

Nous avons testé l'anticorps par Western blot sur des lysats protéiques de lignées cellulaires 2.93 (lignée embryonnaire de rein humain), transfectées ou non par un plasmide codant pour Slfn3. La figure 44 montre que nous avons obtenu une bande spécifique de 66 KDa dans les cellules transfectées, correspondant à la masse théorique de la protéine recombinante. Une deuxième bande protéique de masse inférieure a été détectée dans les cellules transfectées comme dans les cellules non transfectées.



1: Cellules 2.93 transfectées avec Slfn3
2: Cellules 2.93 non transfectées

Figure 44 : Analyse par Western blot de la spécificité de l'anticorps polyclonal dirigé contre Slfn3, sur une lignée de cellules embryonnaires de rein humain (2.93), transfectées ou non par un vecteur codant pour la protéine Slfn3.

Nous avons également testé la spécificité de notre anticorps en Immuno-histochimie sur des cellules 2.93 transfectées avec les vecteurs qui nous ont servi à produire les lentivirus. Nous avons donc transfecté des cellules avec le vecteur Slfn3-ires-GFP ainsi qu'avec le même vecteur codant uniquement pour la GFP. Nous avons ensuite testé l'anticorps dirigé contre Slfn3, ainsi que des immunoglobulines de lapin avant immunisation. La figure 45 montre que nous avons obtenu un marquage qui est spécifiquement co-localisé avec le marquage GFP dans les cellules transfectées avec le vecteur codant pour Slfn3 et la GFP. A l'inverse nous n'observons aucun marquage correspondant à la protéine Slfn3 dans les cellules transfectées avec le vecteur codant uniquement pour la GFP, ou avec les immunoglobines avant immunisation.

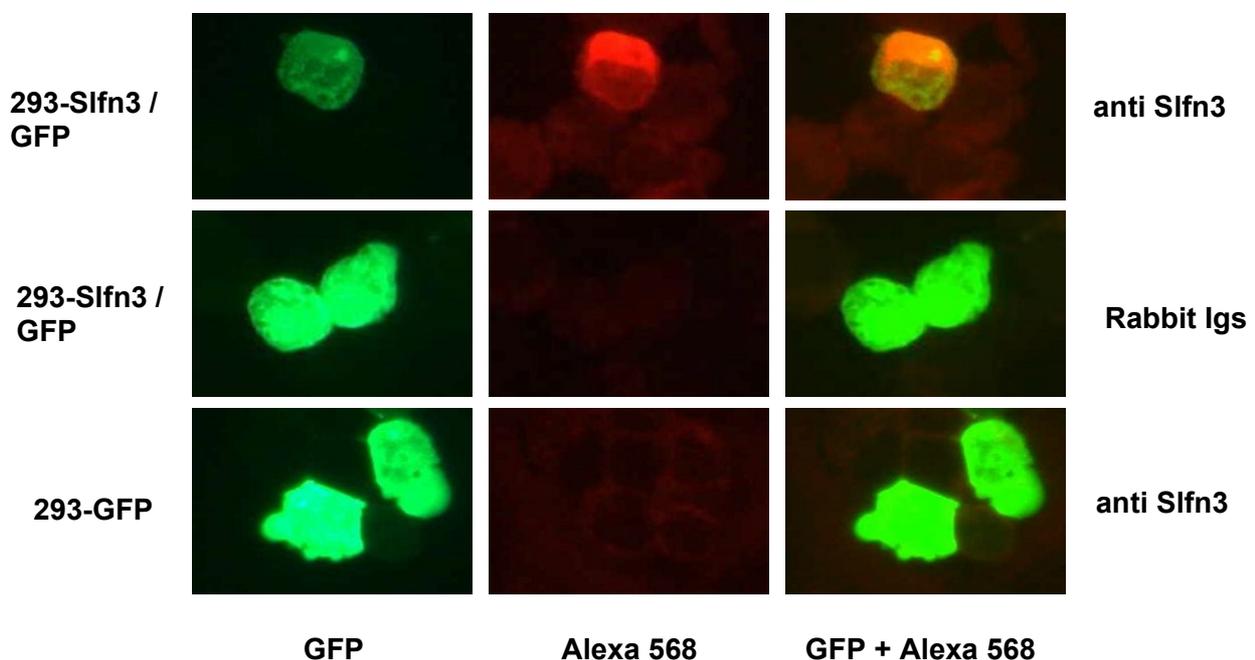


Figure 45 : Marquage par Immuno-histochimie sur des cellules 2.93 transfectées avec un vecteur codant pour une séquence Slfn3-ires-GFP ou un vecteur codant uniquement pour la GFP (ici en vert) . Les marquages sont réalisés avec l'anticorps primaire dirigé contre Slfn3 ou avec des immunoglobulines totales de lapin. Le marquage secondaire est réalisé avec un anticorps dirigé contre la partie Fc des immunoglobulines de lapin, produit chez l'âne et couplé à la biotine. La révélation du marquage se fait ensuite avec une streptavidine couplée à un fluorochrome Alexa 568 (ici en rouge).

3. Analyse de l'expression protéique de Slfn3 lors de l'activation des LT

Nous avons précédemment montré que l'expression transcriptionnelle de Slfn3 subissait une forte régulation durant l'activation des LT par anti-CD3 et anti-CD28. Nous avons voulu observer si l'expression protéique de Slfn3 suivait la même régulation que l'expression transcriptionnelle lors de l'activation des LT. Nous avons donc analysé par Western blot l'expression protéique de Slfn3 dans des lysats cellulaires d'une cinétique de LT, avant et après 24, 48, et 72h d'activation. La figure 46 montre les résultats que nous avons obtenus.

Alors que nous avons montré précédemment que la protéine correspondant à la forme recombinante de Slfn3 est unique et se situe à 66 KDa, nous observons dans la cinétique de LT activés, trois tailles de protéines correspondant à des masses moléculaires s'approchant de 66, 55 et 45 KDa. Nous avons réalisé un contrôle de spécificité de l'anticorps en pré-incubant l'anticorps dirigé contre Slfn3 avec le peptide qui nous a servi à produire et à purifier l'anticorps. Dans ce cas, nous perdons totalement le marquage correspondant aux trois bandes (Figure 46), ce qui montre bien que le marquage est spécifique de l'anticorps dirigé contre Slfn3.

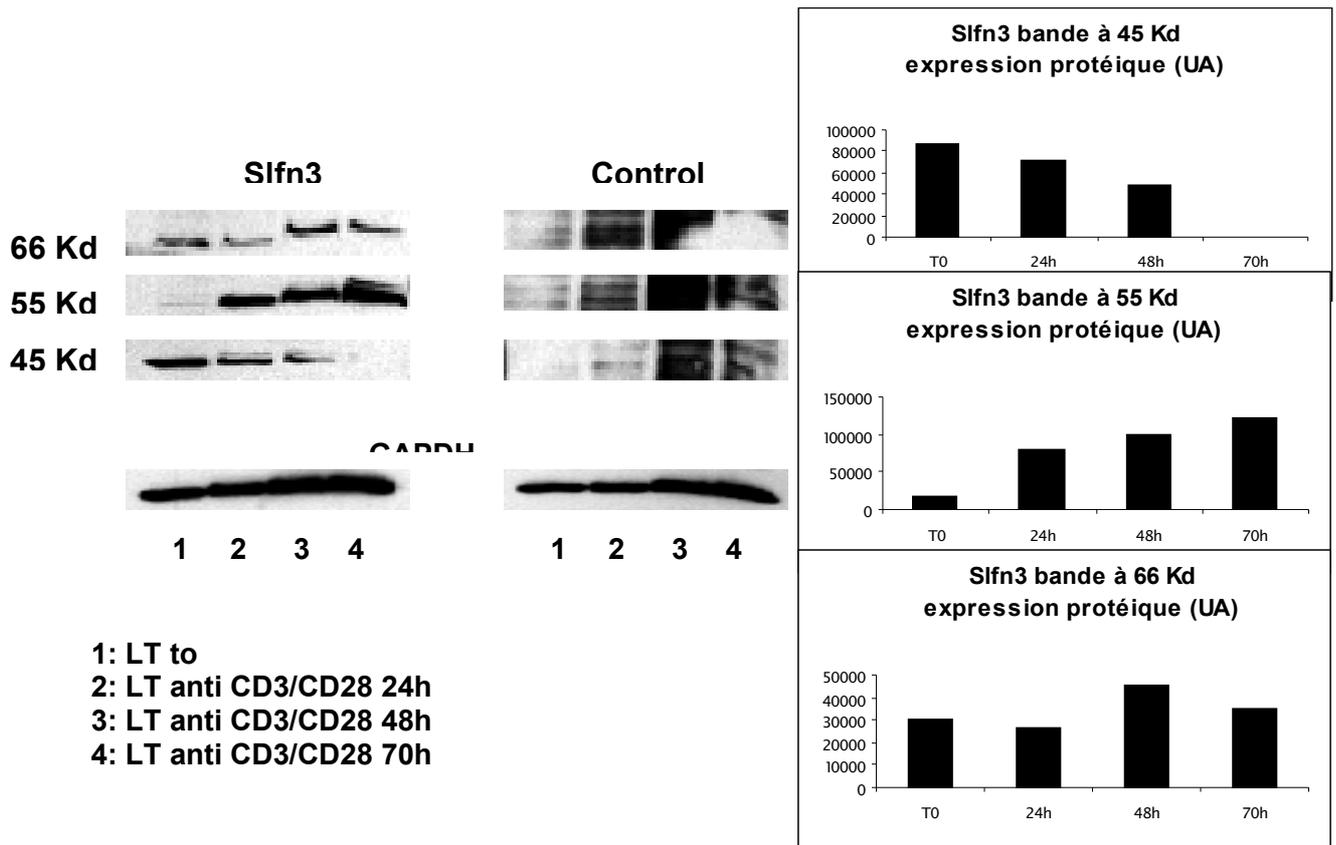


Figure 46 : Analyse par Western blot de l'expression protéique de Slfn3 dans une cinétique de LT activés par anti-CD3 et anti-CD28. Le marquage est réalisé avec l'anticorps primaire dirigé contre Slfn3 et le marquage secondaire est réalisé avec un anticorps dirigé contre la partie FC des anticorps de lapin, produit chez l'âne et couplé à un groupement avec une fonction peroxydase. Le marquage est ensuite révélé avec un réactif électroluminescent (ECL). Le contrôle réalisé a consisté à pré-incuber l'anticorps dirigé contre Slfn3 avec le peptide qui nous a servi à produire l'anticorps. L'expression de Slfn3 est normalisée par la GAPDH et représentée sous forme graphique suivant la taille de la forme protéique.

Ce résultat est très intéressant. En plus de la bande à 66 KDa correspondant à la masse de la protéine attendue, nous avons deux autres bandes. Pendant la cinétique d'activation, nous n'observons pas de différence d'expression pour la bande correspondant à 66 KDa. Par contre, alors que nous détectons très peu de protéines à 55 KDa dans les cellules au repos, son expression augmente fortement à 24H, puis augmente de façon régulière après 48 et 72h d'activation. De manière inverse, nous observons une bande correspondant à une

protéine de 45KDa dans les LT au repos, et dont l'expression décroît en fonction du temps de stimulation, pour devenir indétectable après 72h d'activation.

En partant de cette observation, plusieurs hypothèses peuvent alors être avancées. Soit les protéines reconnues sont des protéines ayant une séquence peptidique reconnue par notre anticorps, commune avec Slfn3. Soit l'ARNm codant pour la protéine subit un épissage alternatif. Soit la protéine subit un clivage par une protéase.

Nous avons vérifié dans les banques de séquences nucléiques ainsi que protéiques et nous n'avons trouvé aucune homologie du peptide de synthèse qui nous a servi à immuniser les lapins, avec d'autres séquences connues, autres que Slfn3. Nous avons alors cherché à savoir s'il existait plusieurs formes différentes de l'ARNm codant pour différentes formes de la protéine Slfn3. Pour cela nous avons utilisé la technique de PCR en choisissant différentes amorces nucléiques sur les différents exons codant pour Slfn3. La figure 47 montre une cartographie de la séquence de l'ARNm de Slfn3, avec l'emplacement des amorces que nous avons utilisées pour détecter un épissage alternatif éventuel.

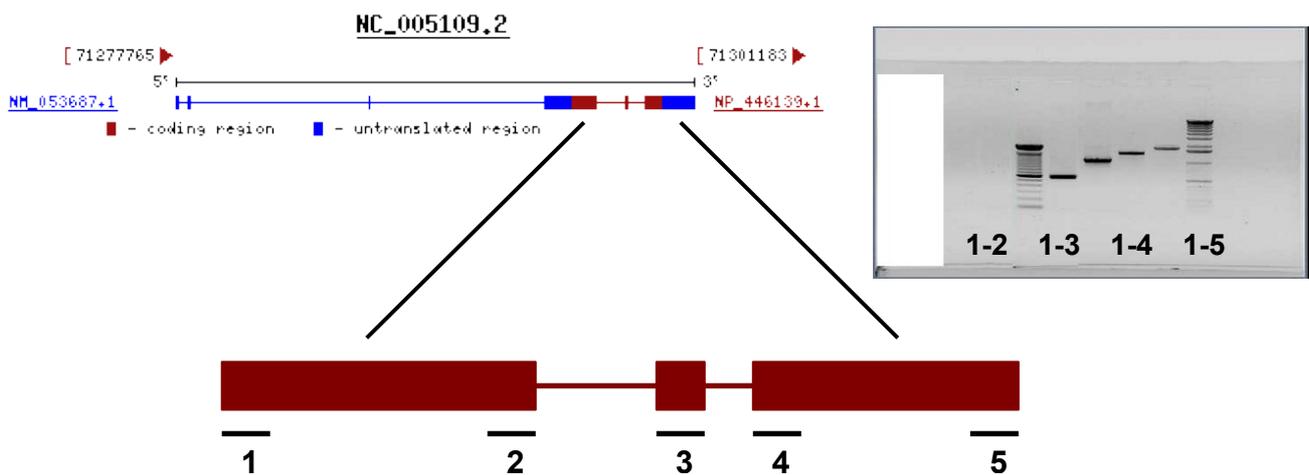


Figure 47 : Cartographie de la séquence transcriptionnelle de Slfn3 et étude de l'épissage alternatif. Des amorces nucléotidiques sont choisies dans les différents exons de la partie codante de l'ARNm de Slfn3. Les PCR sont réalisées sur les échantillons de cDNA de T activés à T0 et à 72h. L'image du gel correspond au gel de migration des produits de PCR de l'échantillon après 72h d'activation. Les résultats obtenus à T0 sont identiques.

L'image du gel d'agarose représentée dans la Figure 47 montre les produits de PCR obtenus avec différentes combinaisons d'amorces sur l'échantillon de LT activés avec anti-CD3 et anti-CD28, après 72h d'activation. Les résultats obtenus avec l'échantillon de LT non activés (T0) sont identiques au profil à 72h (résultats non montrés). Sur ce gel, nous n'avons pas observé de bandes doubles ou triples correspondant à trois formes d'ARNm épissées différemment. Les tailles obtenues correspondent aux tailles attendues de l'ARNm codant pour la forme native de la protéine (1-2 : 565pb, 1-3 : 1066pb, 1-4 : 1422pb, 1-5 : 1738pb), c'est à dire la forme de Slfn3 à 66KDa. N'ayant pas pu mettre en évidence un quelconque épissage alternatif, nous nous sommes dirigés vers notre dernière hypothèse, à savoir, que

la protéine subirait un clivage par une protéase. Dans de récentes publications, des auteurs ont montré que lors de l'activation des LT, il y avait une activation de certaines caspases responsables de la régulation, par clivage, de la fonction de certaines protéines impliquées dans l'activation des LT (Miossec et al. 1997; Alam et al. 1999). Nous avons alors regardé si nous retrouvions des sites de clivages spécifiquement reconnus par des membres de la famille des caspases dans la séquence protéique de Slfn3. La figure 48 montre la cartographie de la séquence protéique de Slfn3, qui comme nous le montrons, contient des motifs peptidiques spécifiquement reconnus par les caspases. Nous avons ainsi trouvé deux sites du motif DXXD reconnu potentiellement par les caspases 2, 3 et 7 (Thornberry et al. 1997). La caspase 3 a justement été mise en évidence comme ayant une activité non liée à l'apoptose lors de l'activation des LT, tout comme les caspases 8 et 9 (Alam, Cohen et al. 1999).

De manière très intéressante, lorsque nous avons calculé la taille des protéines résiduelles après le clivage au niveau des sites de caspases, qui seraient reconnues par notre anticorps, nous avons obtenu des masses de 51.6 kDa et 41.3KDa. Ceci est tout à fait compatible avec les résultats que nous avons obtenus lors de l'analyse par western blot de la cinétique d'activation des LT présentée dans la figure 46.

```

1 msitvdqtdt yaelvlsige itlgektrks mkdsqrrkre aktfqqavct llnsgggvak
61 ariknqnydf srdgvgqdle nflphildfp heyldfkqvk dyflmfvkaw klkqkgpgit
121 tlktnlyirs issielkav navkfiksrk cskgrsdsrl sspgtivcne vlnecnlnfn
181 rdcftckekf cftkathaev kltpkenile ilpqtvsfa nadggyflfig ldgktqeiig
241 feaeksdlvh leseiekcir qlpvthfcee rekikytkcf mevhhkpgaac sfvcalrver
301 fccavfaaep eswhvedscv krftaedwvk rcmdgpacfs kqdkgplqss rlpshsprcc
361 pdnpdalqqs aglpvisgkv isspealcgk lfstqeaheq llwaqldslp kgtlvvtrkw
421 aldplqdkh gvildtlhip qdsltllhgf vlgedledd stillrelgae lkgyyktav
481 tlkqtlanhg sytekigia i kitylghnka vslydssski hyptkyyllt etaknlekal
541 aeilgsresf ysprqncsd hfifafflsf sfllvflfws wglnpep

```

Peptide utilisé pour la production de l'Anticorps Slfn3

Sites de clivages des caspases (DXXD)

Séquences protéiques théoriques : 1-587 65,946 Kd

1-459 51,594 Kd

1.365 41,334 Kd

Partie transmembranaire théorique

Site d'adressage de la protéine de Trans Golgi vers les endosomes



Figure 48 : Cartographie de la séquence protéique de Slfn3.

Nous sommes actuellement en train de réaliser une cartographie de la séquence de ces protéines par technique de « peptide mapping » en spectrométrie de masse, pour confirmer que les 3 bandes représentent bien la même protéine, clivée de différentes manières. Si ce résultat est positif, nous pourrions alors travailler avec la protéine recombinante, pour déterminer quelle caspase est responsable du clivage de Slfn3. Il serait également intéressant de caractériser la localisation des différentes formes protéiques, par des systèmes de gradient de densité en ultracentrifugation, couplés à une analyse par Western blot.

Au niveau de l'étude fonctionnelle de Slfn3, nous allons tester la surexpression de Slfn3 dans des LT infectés par le lentivirus codant pour Slfn3-lres-GFP. Si l'hypothèse d'une régulation par les caspases de Slfn3 se révélait être confirmée, il faudra alors étudier les trois formes protéiques et tester leurs activités. Nous commençons également, à étudier la fonction de Slfn3 en utilisant des RNA inhibiteurs. Il est en effet plus facile d'isoler une fonction pour une molécule en inhibant de manière presque totale son expression plutôt qu'en l'augmentant de manière relative par rapport à son niveau basal. De plus, si nous avons une régulation de la fonction de Slfn3 au niveau protéique, que nous ne pouvons pas contrôler en faisant surexprimer l'ARNm, nous aurons moins de difficultés en inhibant son expression.

4. Slfn3 dans les DCs

Au niveau des DCs nous avons observé que comme pour les LT, lors de l'activation par stimulation au LPS, l'expression de Slfn3 est augmentée au niveau transcriptionnel (Figure 49). Dans les LT l'augmentation d'expression commence à 24h et augmente régulièrement avec le temps de stimulation. Dans les DCs, nous avons une très forte induction de Slfn3 dès 2h et une diminution ensuite à 24h. La cinétique d'induction de Slfn3 lors de la stimulation des cellules semble donc être différente entre les LT et les DCs

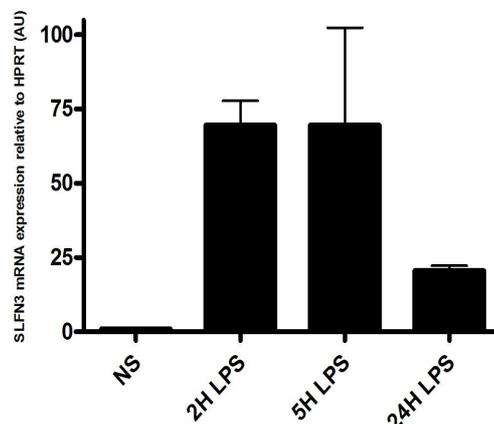


Figure 49 : Expression transcriptionnelle de Slfn3 dans une cinétique d'activation de DCs, après 2, 5, et 24h d'activation avec du LPS. Les résultats sont normalisés en fonction de l'expression de L'HPRT et sont exprimés en unité arbitraire (UA).

En analysant l'expression protéique par immuno-histochimie de Slfn3 dans des cellules dendritiques issues de la moelle osseuse (BMDCs) avant et après activation au LPS (Figure 50), nous avons remarqué une répartition différentielle de son marquage intracellulaire. Alors que nous avons un marquage net et bien localisé dans une structure proche du noyau dans les BMDCs fraîches (Figure 50A), la localisation du marquage de Slfn3 devient plus diffuse avec un marquage de forme granulaire, après activation par le LPS (Figure 50B). Il serait intéressant de vérifier par microscopie électronique la localisation précise de Slfn3, avant et après activation des BMDCs afin d'identifier ces structures.

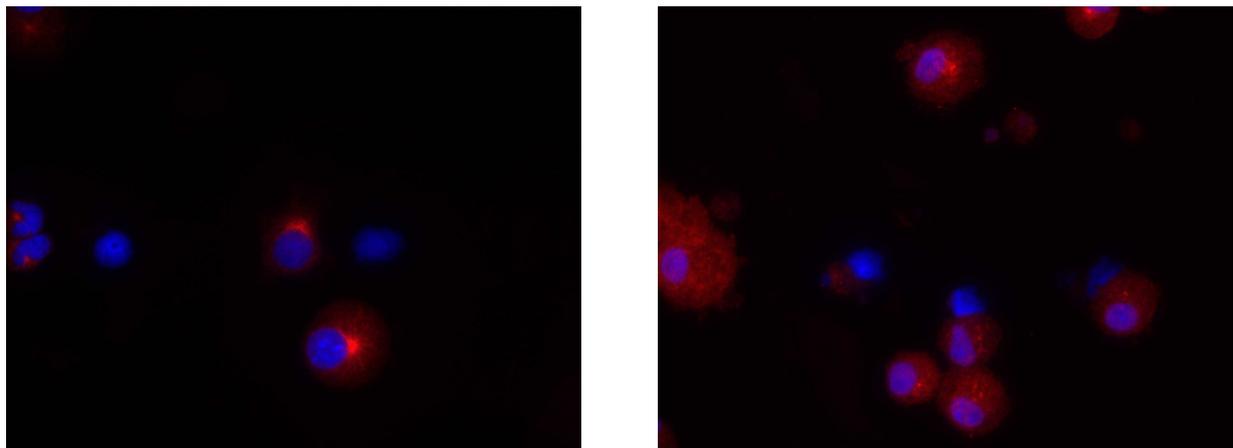


Figure 50 : Marquage par immuno-histochimie de BMDCs fraîches (A) ou activées au LPS (B). Les marquages sont réalisés avec l'anticorps primaire dirigé contre Slfn3. Le marquage secondaire est réalisé avec un anticorps dirigé contre la partie Fc des immunoglobulines de lapin, produit chez l'âne et couplé à la biotine. La révélation du marquage se fait ensuite avec une streptavidine couplée à un fluorochrome Alexa 568 (ici en rouge). Les noyaux des cellules sont marqués au dapi (ici en bleu).

Dans la figure 48 nous montrons que la séquence protéique de Slfn3 comporte un peptide signal d'adressage de la protéine du Golgi vers les endosomes. Cette séquence est collée à un site de clivage des caspases. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que, au repos, dans les BMDCs la localisation de la protéine Slfn3 pourrait être l'appareil de Golgi et que lorsque ces cellules sont activées, elles libèrent Slfn3 dans des vésicules, ce qui pourrait expliquer la forme granulaire du marquage. La localisation de la protéine Slfn3 pourrait être régulée par un système de clivage de la protéine, qui lorsque la protéine est coupée empêche l'adressage de celle-ci de Golgi vers les endosomes, en privant la protéine de son peptide signal (Figure 51). Et inversement, lorsque la protéine n'est pas clivée, elle fixe par son peptide signal le motif VHS de la protéine GGA, ce qui entraîne le recrutement de la clathrine et de l'actine nécessaire à la formation et l'exportation de protéines du Golgi (Puertollano et al. 2001). Slfn3 pourrait donc être impliqué dans le transport de protéines et pourquoi pas, de protéines membranaires d'activation ou de maturation. Ces hypothèses semblent plausibles, puisqu'il a été récemment démontré que dans les DCs à l'état immature, il y avait des caspases actives, chargées de réguler l'activité de certaines

protéines en les clivant. Ainsi la protéine β -adaptine faisant partie du complexe AP-1 est coupée par la caspase 3 dans les DCs immatures et lors de la maturation des DCs par stimulation au LPS, il y a une inhibition de l'activité caspase 3, qui permet au complexe AP-1 de devenir actif et d'entraîner l'exportation du CMHII à la membrane des cellules (Jensen 2005; Santambrogio et al. 2005). Afin de vérifier si nous avons un phénomène semblable pour Sfn3, il paraît nécessaire d'étudier par Western blot le polymorphisme protéique de Sfn3 lors de l'activation des BMDCs.

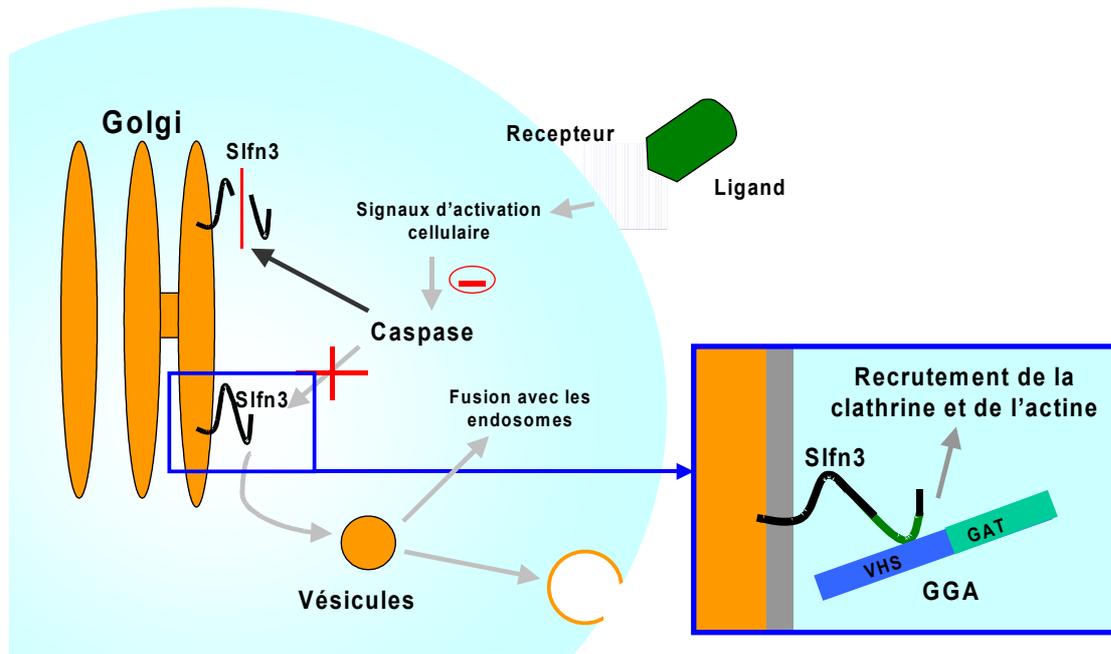


Figure 51 : Représentation de l'hypothèse de fonctionnement et de la régulation de la protéine Sfn3.

En conclusion, nous avons montré qu'il existait une régulation transcriptionnelle de Sfn3 lors de l'activation des différentes sous populations de LT, ainsi que lors de l'activation des DCs. Nous avons également développé plusieurs arguments qui nous orientent vers une possible régulation de la forme protéique de Sfn3 par les caspases, et ce qui pourrait avoir un rôle prédominant sur la fonction de cette molécule.

Conclusion

L'intérêt de la recherche de nouvelles molécules impliquées dans des modèles de tolérance est de trouver des agents capables d'intervenir dans le blocage spécifique de la réponse immune dirigée contre les antigènes du greffon, tout en perturbant le moins possible la réponse dirigée contre d'autres antigènes pathogènes. L'idéal étant de trouver une molécule permettant d'induire une tolérance spécifique et définitive.

FSTL1 par les résultats obtenus, mais aussi le fait qu'elle soit une protéine sécrétée soluble, et donc assez facile d'utilisation pour un éventuel traitement thérapeutique, semble très intéressante. Nous devons maintenant caractériser son mode d'action et optimiser son effet.

Au départ du travail qui nous a amené à nous intéresser à Slfn3, nous avions dans l'idée d'étudier une molécule directement impliquée dans la tolérance. Au travers des résultats que nous avons obtenu, Slfn3 ne semble pas être une molécule directement liée à la tolérance. Elle pourrait avoir une importance dans l'activation et la maturation cellulaire, et notamment dans les DCs, au niveau desquelles Slfn3 pourrait être impliquée plus ou moins directement dans la présentation antigénique. L'étude de cette molécule semble donc très intéressante, puisqu'elle pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'activation et de maturation de cellules qui sont au centre de la réponse immune.

En conclusion, les résultats apportés par l'étude des molécules impliquées dans les mécanismes d'induction de tolérance à l'allogreffe, permettent de faire un pas en avant en ouvrant des pistes, qui une fois explorées, permettront d'éclaircir la compréhension des mécanismes de tolérance, afin d'envisager de nouveaux protocoles cliniques.

Annexe I

Accumulation of T Cells with Potent Regulatory Properties and Restricted V β 7-TCR Rearrangements in Tolerated Allografts

Jean-Marie Heslan, Gaëlle Beriou, Jean-Benoît Le Luduec, Carole Guillonnet, Ignacio Anegón, Jean-Paul Soulillou, Maria-Cristina Cuturi, and Elise Chiffolleau

Background. We have previously demonstrated that a short-course treatment with LF15-0195, a 15-deoxyspergualin analogue, induces donor-specific tolerance of cardiac allografts in rats and expansion of splenic CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

Methods. To further characterize long-term tolerance in this model, we have analyzed the phenotype, regulatory properties and TCR-V β usage of the T cells infiltrating the tolerated allografts.

Results. We demonstrate that the tolerated allografts express high levels of FoxP3 transcripts and contain a large number of CD4⁺ T cells, half of which express CD25. Moreover, T cells from these tolerated allografts are very powerful at transferring tolerance to a subsequent allograft recipient, demonstrating the presence of potent regulatory T cells at the site of the graft. Interestingly, the T cells infiltrating the tolerated allografts systematically display restricted V β 7 TCR rearrangements.

Conclusion. These results demonstrate in this model of tolerance, a specific accumulation of T cells with potent regulatory properties and exhibiting restricted V β 7-TCR rearrangements at the graft site.

Keywords: Transplantation, Tolerance, Regulatory T cells, Spectratyping.

(*Transplantation* 2005;80: 1476–1484)

Establishment of true tolerance to an allograft with limited therapy remains a major goal in transplantation. Numerous reports have described the development of allospecific regulatory T cells following induction therapy (1). Regulatory T cells represent a heterogeneous population, defined mostly by their function rather than by their cell surface markers (1). The CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells have largely been reported to be required for self-tolerance but also to play a role in numerous models of allograft tolerance (1–4). In a previous study, we demonstrated that a short-term treatment with LF15-0195, a deoxyspergualin analogue, induces donor-specific long-term allograft acceptance associated with the progressive expansion of splenic CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (4). Interestingly, donor DC persisted in the graft and were required for the tolerance and the expansion of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells (4). We hypothesized that such an abundance of donor antigen may have induced allospecific regulatory T cells that would accumulate at the graft site. Indeed, alloantigen-specific and highly suppressive regulatory T cells have been shown to preferentially accumulate at the graft site, since they are dependent on a continuous supply of alloantigens in order to survive and expand (5–7). Moreover, regulatory T cells with specific TCR motifs may have been selec-

tively expanded during stimulation by alloantigens, thus leading to clonal dominance.

We therefore further characterized the T cells infiltrating long-term tolerated allografts by analyzing their phenotype, regulatory properties and TCR-V β chain usage. We show here that tolerated allografts express high levels of FoxP3 and contain a high percentage of T cells that are CD4⁺CD25⁺ and are very potent at transferring tolerance. These results demonstrate the presence of powerful regulatory T cells at the graft site. Moreover, we describe the presence of T cells displaying V β 7-restricted TCR usage that may therefore represent oligo-clonal regulatory T cells.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Transplantations, and Immunosuppression

Inbred 8-week-old male LEW.1W rats (RT1u) served as heart donors and LEW.1A (RT1a) as allograft recipients (Janvier, Savigny/Orge, France). Heterotopic cardiac allografts were performed as previously described (8). Graft survival was monitored daily by abdominal palpation. LF15-0195 (Fournier Laboratories, Daix, France) was delivered to allograft recipients by intraperitoneal injection at 3 mg/kg/day for 20 days starting the day of transplantation. For the model of chronic rejection with CTLA4Ig treatment, allografts were injected at the time of transplantation with recombinant adenovirus into the apex and ventricular walls at four different locations, as previously described (9).

Graft Infiltrating Cells

Graft infiltrating cells from LF15-0195 treated recipients (>100 days) were harvested as previously described (10). Briefly, allografts were isolated, minced and pressed through a stainless steel mesh. Mononuclear cells were then isolated by

Jean-Marie Heslan and Gaëlle Beriou contributed equally to this work. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 643 (INSERM U643) and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT), CHU Hôtel Dieu, Nantes, France. Address correspondence to: Elise Chiffolleau, Ph.D., INSERM U643, CHU Hôtel-Dieu, 30 bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France. E-mail: Elise.Chiffolleau@univ-nantes.fr Received 8 April 2005. Revision requested 4 May 2005. Accepted 16 May 2005. Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins ISSN 0041-1337/05/8010-1476 DOI: 10.1097/01.tp.0000185198.07663.ba

density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham, Biosciences, Sweden) and washed twice. Graft infiltrating cells were stained with monoclonal antibodies that had been purified from hybridoma culture supernatants (Hybridoma from the European Collection of Animal Cell Culture; Salisbury, UK) and coupled to fluorochrome (Bioatlantic, Nantes, France). The antibodies used were R7-3-FITC (anti-TCR), Ox35-APC (anti-CD4) and Ox39-PE (anti-CD25). Cells were analyzed with a FACS calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

In Vivo Transfer Experiments

Graft infiltrating cells (7.5×10^5) from tolerated hearts were resuspended in 500 μ l of PBS and injected intravenously the day of cardiac transplantation into a secondary syngeneic irradiated recipient (3 Grey, whole body irradiation (IFR 26, Nantes, France) 2 days before transplantation). Graft survival was monitored daily by abdominal palpation, and rejection was defined as cessation of heartbeat.

CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T lymphocyte Purification and Stimulation

CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were purified from splenocytes by positive selection using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA), as previously described (11, 12). Splenocytes were stained with R7-3-FITC (anti-TCR), Ox8-PE (anti-CD8), Ox35-Cy7 (anti-CD4) and Ox39-APC Alexa 647 (anti-CD25). Purity was >99%.

Stimulation Assays

CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁻ T cells from naive rats (5×10^4 cells/well) were stimulated in 96-well flat bottom plates (NUNC, Merck, Eurolab, France) coated with anti-CD3 (0.75 μ g/ml) (Pharmingen, Becton Dickinson Co) and with addition of soluble anti-CD28 (0.6 μ g/ml) (kindly provided by J. Bluestone, San Francisco, CA) in a final volume of 200 μ l of RPMI 1640 (GIBCO) supplemented with 2 mM l-glutamine, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate (GIBCO), 1% (w/v) non-essential amino acids (GIBCO), 100 U/ml penicillin (GIBCO); 0.1 mg/ml streptomycin (GIBCO) and 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (GIBCO).

The cultures were incubated at 37°C, in 5% (v/v) CO₂ for 48 hr, after which time the cells were harvested and washed twice.

Real-Time Quantitative RT-PCR

Total RNA from heart allografts was prepared by TRIzol extraction (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Genomic DNA was removed by DNase treatment (Turbo DNA-free, Ambion, Eur.Ltd, Huntingdon, UK) and mRNA was reverse transcribed as previously described (13). Real-time quantitative PCR was performed in a GenAmp 7700 Sequence Detection System, using SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) as previously described (13), except for the addition of 1 mg/ml of bovine serum albumin (Sigma, Saint Louis, USA) to prevent PCR inhibition. Primers for rat TCR-C β , TCR-V β 1 to 20 (14), and FoxP3 (forward-CCCAGGAAAGACAGCAACCTT, reverse-TGCTTGGCAGTGCTTGAGAA) were used at 300 nM

each. Data were normalized to HPRT or TCR-C β levels, and expressed as $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, where $\Delta\Delta(DD) Ct = (Ct_{gene} - Ct_{C\beta})_{sample} / (Ct_{gene} - Ct_{C\beta})_{reference}$. Data were further expressed in arbitrary units (AU), where the mean value for rejecting allografts at day 5 or for naive CD4⁺CD25⁻ T cells is equal to 1.

TCR-V β -CDR3 Spectratyping

The TCR-V β -CDR3 spectratyping was performed as previously described (14, 15). Briefly, amplification products were submitted to a five-cycle elongation reaction using a dye-labeled C β primer, then heat-denatured, loaded onto a 6% acrylamide-8 M urea gel, and electrophoresed using an ABI-377 DNA-Sequencer (Applied Biosystems). Immunoscope software was used to resolve the raw data of DNA sequencing gels into sets of peaks separated by three nucleotides including size and area of peaks representing the TCR-CDR3 length distribution (CDR3-LD) profiles. MatLab software was used to compute and display data as two-dimensional Top View TcLandscape representations. The X-axis displays the 21 V β families analyzed, and the Y-axis gives the various possible CDR3 lengths (1 to 13 amino acids). The colors represent the percentage of CDR3-LD alteration, defined as the difference between the frequency of each CDR3 length in the distribution profile of the V β family studied, and the control distribution, calculated from the spleens and peripheral blood lymphocytes of 11 normal rats. The color ranged from deep blue ($\leq 50\%$ of CDR3-LD alteration) to dark red ($> 50\%$ of CDR3-LD alteration), with green signifying unaltered ('gaussian') CDR3-LD.

Statistical Analysis

The Kaplan-Meier method was used to establish survival curves. Survival was analyzed with a log-rank test, and differences were considered significant when p values were <0.05. Statistical evaluation was performed using the Student's *t* test for unpaired data and results were considered significant if p values were <0.05.

Data were expressed as means \pm standard deviation (SD).

RESULTS

Graft-Infiltrating T Cells Contain Numerous CD4⁺CD25⁺ T Cells That Are Able to Transfer Tolerance

We previously demonstrated a striking expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the spleens (but not in lymph nodes) of long-term tolerated allografts that were able to transfer tolerance to a subsequent irradiated host (with a minimum of 5 million cells) (4).

To determine whether regulatory T cells accumulate at the graft site where alloantigens are continuously presented, we performed FACS analysis of graft infiltrating cells from long-term tolerated allografts and in vivo transfer experiments.

We observed that cells infiltrating tolerated allografts contained numerous T cells ($46.7\% \pm 11.7$, $n=3$). The majority of these T cells were CD4⁺ ($62.1\% \pm 8.3$, $n=3$). Interestingly, 26% of the T cells were CD4⁺CD25⁺ ($25.9\% \pm 0.7$, $n=3$), whereas 8.5% were CD8⁺CD25⁺ T cells ($8.5\% \pm 6.7$, $n=3$). A typical CD4 CD25 FACS analysis is shown in Figure

1, which illustrates the high percentage (25%) of CD4⁺CD25⁺ cells in T cells from long-term tolerant allografts (Fig. 1).

Recently, FoxP3 has been described as a marker of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (16, 17). Some discrepancy exists concerning the exclusivity of FoxP3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Indeed, some reports have demonstrated that in contrast to mice, FoxP3 expression can be induced in human CD4⁺CD25⁻ T cells following stimulation (16–18). To test this eventuality in rats, we analyzed the pattern of expression of Foxp3 mRNA in naive and in vitro stimulated CD4⁺CD25⁻ or CD25⁺ T cells by quantitative RT/PCR. We found that natural suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells from naive rats expressed high FoxP3 mRNA levels compared to CD4⁺CD25⁻ T cells (125 fold higher) (Fig. 2A). Stimulation (48h) of CD4⁺CD25⁻ T cells (by plate-bound α CD3 plus α CD28) did not induce FoxP3 mRNA expression (Fig. 2A). Interestingly, CD4⁺CD25⁺ T cell stimulation decreased the FoxP3 mRNA levels (6 fold) as previously described in mice (17). These results demonstrate that similarly to what has been observed in mice, FoxP3 mRNA expression is not induced in activated CD4⁺CD25⁻ rat T cells. FoxP3 can therefore be considered as a specific marker of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in this species.

We previously demonstrated a high number of CD4⁺CD25⁺ T cells in the spleens of long-term tolerant recipients that possess in vitro and in vivo suppressive properties (4). Therefore, we analyzed whether the splenic CD4⁺CD25⁺ T cells (25% of CD4⁺ T cells) from long-term tolerant animals were similar in terms of FoxP3 mRNA expression to natural suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells from

naive rats. We observed high FoxP3 mRNA expression in splenic CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant and naive rats compared to their CD4⁺CD25⁻ counterparts (40 fold and 78 fold, respectively, $n=3$, $P<0.01$) (Fig. 2B). Splenic CD4⁺CD25⁺ T cells from long-term tolerant recipients expressed a level of FoxP3 mRNA as high as that observed in CD4⁺CD25⁺ T cells from naive rats. These results show that the CD25⁺ T cells present in the spleens of long-term tolerant recipients are regulatory and not activated T cells.

We also analyzed FoxP3 mRNA expression in long-term tolerated allografts by quantitative RT/PCR. Due to the small quantity of graft infiltrating cells harvested, we performed our analysis on whole allografts and found higher FoxP3 mRNA expression in tolerated allografts at days 5 and 100 after transplantation compared to rejecting allografts (1.6 fold and 2.1 fold respectively, $n=4$, $P<0.05$) (Fig. 2C). These results demonstrate the progressive accumulation of Foxp3-expressing regulatory T cells in tolerated allografts. Regulatory T cells are reported to express IL10, TGF β , CTLA-4 or GITR (1). We previously showed low levels of TGF β and IL10 in long-term tolerated allografts (4). We looked at GITR and CTLA-4 mRNA expression but did not find any increase in tolerated compared to rejecting allografts (data not shown). However, as they are also markers of T cell activation, which is not the case for FoxP3, it is difficult to make any firm conclusions.

To determine whether T cells from tolerated allografts displayed suppressive properties, we transferred these cells to subsequent irradiated allograft recipients the day of the cardiac transplantation. We found that as little as 7.5×10^5 infiltrating T cells from tolerated allografts were able to transfer tolerance to a subsequent irradiated allograft recipient (Fig. 3). In comparison, 5×10^6 CD25⁺ T cells from the spleen were required to transfer tolerance (4). Due to the low number of T cells harvested from each long-term tolerated allograft (less than 1 million), we were unable to purify and transfer CD25⁻ or CD25⁺ subpopulations from these animals.

In conclusion, the T cells infiltrating long-term tolerated allografts displaying a high percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells, high expression of FoxP3 and the ability to transfer tolerance, and contain potent regulatory T cells.

Long-term Tolerated Allografts Systematically Harbor T Cells with a Restricted V β 7 TCR Gene Rearrangement

Repetitive stimulation by alloantigens at the graft site may have expanded regulatory T cell clones bearing a limited β chain rearrangement. Therefore, we analyzed the CDR3-LD of the 22 known V β genes using the TcLandscape method to determine whether tolerated allografts preferentially accumulated T cells with restricted V β expression.

Spectratyping of an unaltered repertoire revealed a gaussian distribution over the 10–12 peaks of each of the 20 V β gene families, and clonal T cell expansion biased the V β profiles enabling the identification of the V β families involved in the process (14, 15). A normal repertoire is characterized by a gaussian CDR3-LD over 10–12 peaks of all V β gene families, which is illustrated on TcLandscape representations by a green color. The color ranged from deep blue (<50% of CDR3-LD alteration) to dark red (>50% of CDR3-LD alteration), with green signifying unaltered ('gau-

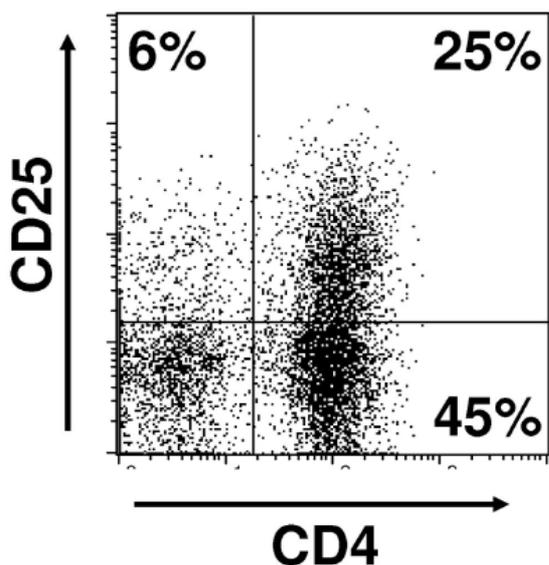


FIGURE 1. Representative CD4 CD25 FACS staining of T cells from a long-term tolerant allograft. Graft-infiltrating cells were isolated as described in the Materials and Methods and stained with R7-3-FITC (anti-TCR), Ox35-APC (anti-CD4) and Ox39-PE (anti-CD25). Cells were analyzed using a FACS calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

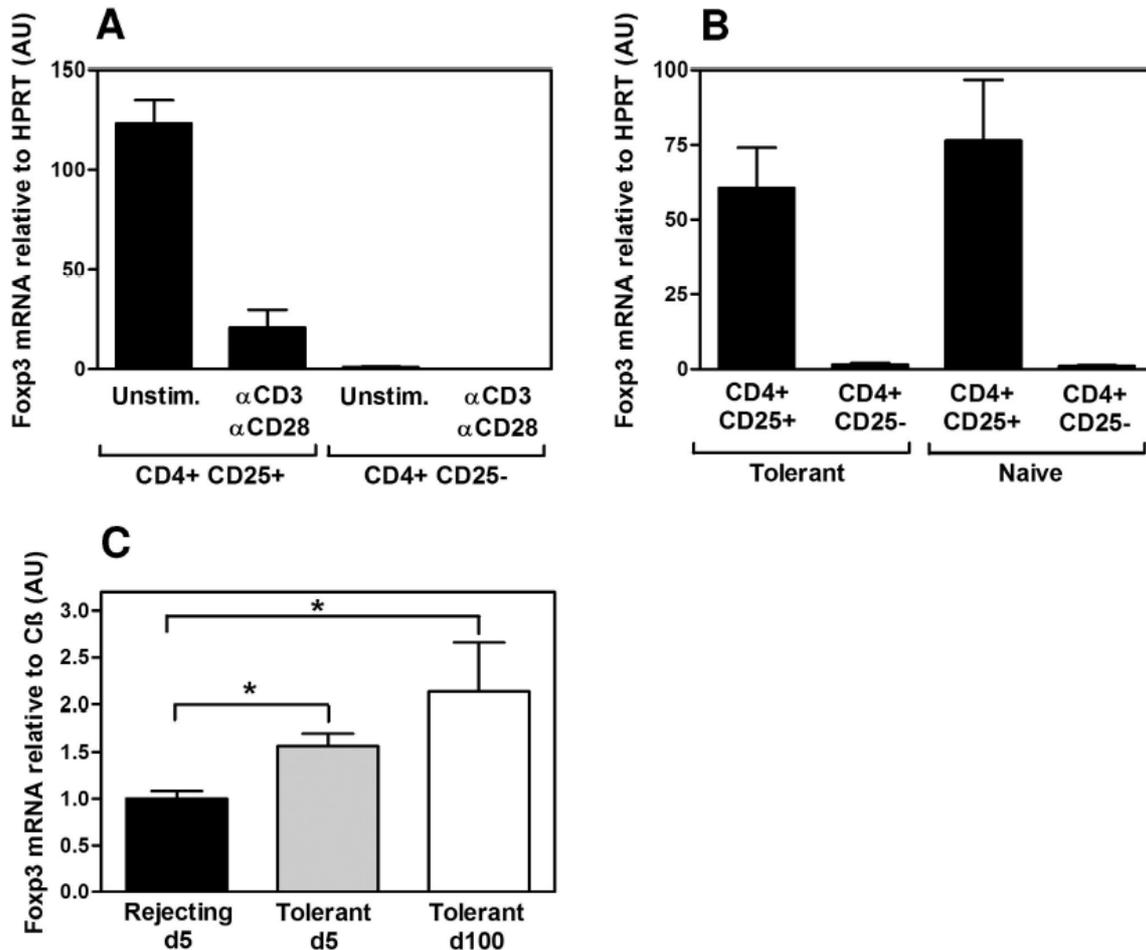


FIGURE 2. Foxp3 mRNA expression. (A) Foxp3 mRNA expression was analyzed by quantitative RT/PCR in unstimulated or anti-CD3/anti-CD28 (48h) stimulated CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells from naive rats. Data are expressed in Arbitrary Units (AU) relative to HPRT and are representative of two different experiments. (B) Foxp3 mRNA expression was analyzed by quantitative RT/PCR in splenic CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁻ T cells from naive or long-term tolerant rats (n=3). Data are expressed in Arbitrary Units (AU) relative to HPRT. (C) Foxp3 mRNA expression was analyzed by quantitative RT/PCR in rejecting or tolerant allografts at day 5 posttransplantation and in long-term tolerant allografts (day 100) (n=4). Data are expressed in Arbitrary Units (AU) relative to C β .

sian') CDR3-LD. We analyzed the CDR3-LD of the V β genes in rejecting or tolerated allografts (at days 5 and 100 after transplantation).

As previously reported, the T cells extracted from rejecting allografts at day 5 after transplantation (rejecting d5) expressed all the V β families, with moderate alterations in CDR3-LD (yellow color) (Fig. 4) (14, 15). Similarly, the T cells from tolerated grafts at day 5 after transplantation (tolerant d5) also displayed moderately restricted V β repertoires. In contrast, at day 100, T cells from tolerated allografts (tolerant d100), exhibited an overall altered repertoire with some of the V β families restricted in their CDR3 LD (red color). Some altered V β families differed from one animal to another. However, the V β 7 family was systematically altered in

all of the long-term tolerated grafts analyzed (n=10). In long-term tolerated allografts, the CDR3 region of the V β 7 family was restricted to one or two lengths, varying in each individual from 7 to 10 amino acids. These dominant CDR3 rearrangements did not present homology in their amino acid sequences (data not shown). Therefore, the predominance of CDR3 lengths of the V β 7 family was not due to a monoclonal but rather to an oligoclonal expansion of T cells.

Accumulation of V β 7 Family Transcripts in Long-Term Tolerated Allografts

Levels of TCR-V β transcripts for each family were measured by quantitative RT/PCR in rejecting and tolerated allografts. We found V β family mRNA levels to be similar in

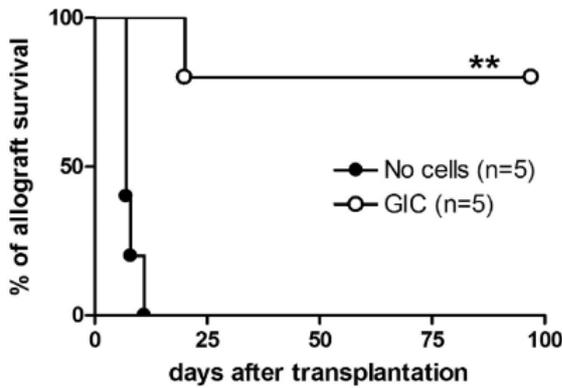


FIGURE 3. Graft infiltrating cells transfer tolerance to a subsequent allograft recipient. Purified graft infiltrating cells (7.5×10^6) from tolerated hearts were injected intravenously into a secondary syngeneic irradiated recipient (3 Grey) the day of cardiac transplantation.

rejecting allografts and tolerated allografts at day 5 posttransplantation, except for the $V\beta 9$ family, whose levels were decreased in tolerated allografts at day 5 ($n=3$, $P<0.05$) (Fig. 5). In contrast, the mRNA levels for the $V\beta 3$, $V\beta 9$, $V\beta 10$, $V\beta 12$, and $V\beta 16$ families were decreased in long-term tolerated allografts (day 100) compared to rejecting allografts ($n=3$, $P<0.05$), whereas the $V\beta 6$ and $V\beta 18$ families were increased (3 fold and 8 fold respectively versus rejecting allografts). Interestingly, the mRNA levels of the $V\beta 7$ family were dramatically increased in long-term tolerated allografts (19 fold versus rejecting allografts) ($n=3$). We observed a high diversity in the long-term tolerated allograft group, but for each long-term tolerated allograft, $V\beta 7$ mRNA levels were higher than those in rejecting allografts: 3, 20, and 35, vs. 0.7, 0.6, and 1.7 (arbitrary units (AU)).

Because long-term tolerated allografts displayed high levels of $V\beta 7$ transcripts, the alteration of the $V\beta 7$ family CDR3-LD observed demonstrates the presence of specific T cells.

Thus, in addition to restricted CDR3 LD, the accumulation of the $V\beta 7$ transcripts at the graft site suggests the presence of numerous T cells exhibiting a $V\beta 7$ oligoclonal expansion.

$V\beta 7$ Alteration and Accumulation Is Specific to this Particular Model of Tolerance

T cells with particular TCR motifs are selectively expanded over time by repetitive stimulation by antigens. Therefore, T cells with restricted $V\beta 7$ TCR gene rearrangements could represent T cells that have restricted their TCR CDR3-LD over time as a result of recurrent contact with alloantigens at the graft site and consequently, may not be observed at day 5 after transplantation in rejecting allografts. Therefore, in order to determine whether this TCR chain usage would be systematically found in every long-term allograft in the same strain combination or is specific to the model of tolerance, we performed the same $V\beta$ repertoire analysis on long-term allografts in a model of chronic rejection.

In the same allograft combination, CTLA4Ig treatment prevents acute rejection, however, 100 days after transplantation the allografts display strong signs of chronic rejection (CR-allograft) (9; data not shown). Quantification of $C\beta$ transcripts revealed that these CR-allografts were similarly infiltrated by T cells to tolerated allografts (Fig. 6A). Figure 6B shows three representative spectratypings of the $V\beta 7$ -TCR LD of rejecting or tolerated allografts at day 5 after transplantation or of long-term tolerated or CR-allografts at day 100 posttransplantation. As previously shown in the TopView format of Figure 4, the $V\beta 7$ family was characterized by a strong percentage of CDR3-LD alteration ($56.3\% \pm 10.1$, $n=3$) in long-term tolerated allografts (d100) compared to rejecting allografts ($12.3\% \pm 0.6$, $n=3$, $P<0.01$) or to tolerated allografts at day 5 posttransplantation ($14.7\% \pm 1.2$, $n=3$, $P<0.01$) (Fig. 6B).

In contrast, the CDR3-LD of the $V\beta 7$ family was not significantly altered in CR-allografts ($25.6\% \pm 15.8$, $n=3$) compared to rejecting allografts ($12.3\% \pm 0.6$, $n=3$). Importantly, the accumulation of the $V\beta 7$ family transcripts was only observed in long-term tolerated allografts (Fig. 6C). Alteration and accumulation of the $V\beta 7$ family in long-term tolerated allografts is therefore not a result of time or allograft combination but is specific to the regulation in this particular model of tolerance.

As no anti-rat $V\beta 7$ antibody exists to date, we were unable to determine whether the T cells with $V\beta 7$ restricted TCR gene rearrangements are regulatory T cells.

DISCUSSION

Tolerance is an active phenomenon that operates beyond secondary lymphoid organs. Some reports have demonstrated an accumulation of specific regulatory T cells in tolerated allografts and the importance of the presence of alloantigens for the maintenance of tolerance (5–7). We previously demonstrated that a short-term treatment with LF15-0195, a deoxyspergualin analogue, induces donor-specific long-term allograft acceptance associated with the progressive expansion of splenic $CD4^+ CD25^+$ regulatory T cells that are able to transfer tolerance (4). Moreover, we demonstrated the presence of a high level of chimerism (presence of donor APC) that persists in long term tolerant allografts and that is required for the tolerance (4). The persistence of donor antigen in tolerated allografts may have induced the accumulation of specific regulatory T cells at the graft site. We therefore analyzed the phenotype and function of the graft infiltrating T cells as well as their TCR- $V\beta$ repertoire usage.

We observed a high percentage of $CD4^+ CD25^+$ T cells and FoxP3 mRNA expression in tolerated allografts. We showed that in rats, FoxP3 is specifically expressed by $CD4^+ CD25^+$ regulatory T cells and is not induced in $CD4^+ CD25^-$ following stimulation. These results are consistent with what has been observed in mice but not in humans (16, 18). In addition, the T cells infiltrating tolerated allografts were very potent at transferring tolerance (6 fold more efficient than splenic $CD4^+ CD25^+$ T cells). This means that these graft regulatory T cells may possess more potent suppressive activity than splenic regulatory T cells.

We also observed the gradual emergence of T cell clones with altered TCR- $V\beta$ repertoires in tolerated allografts. This

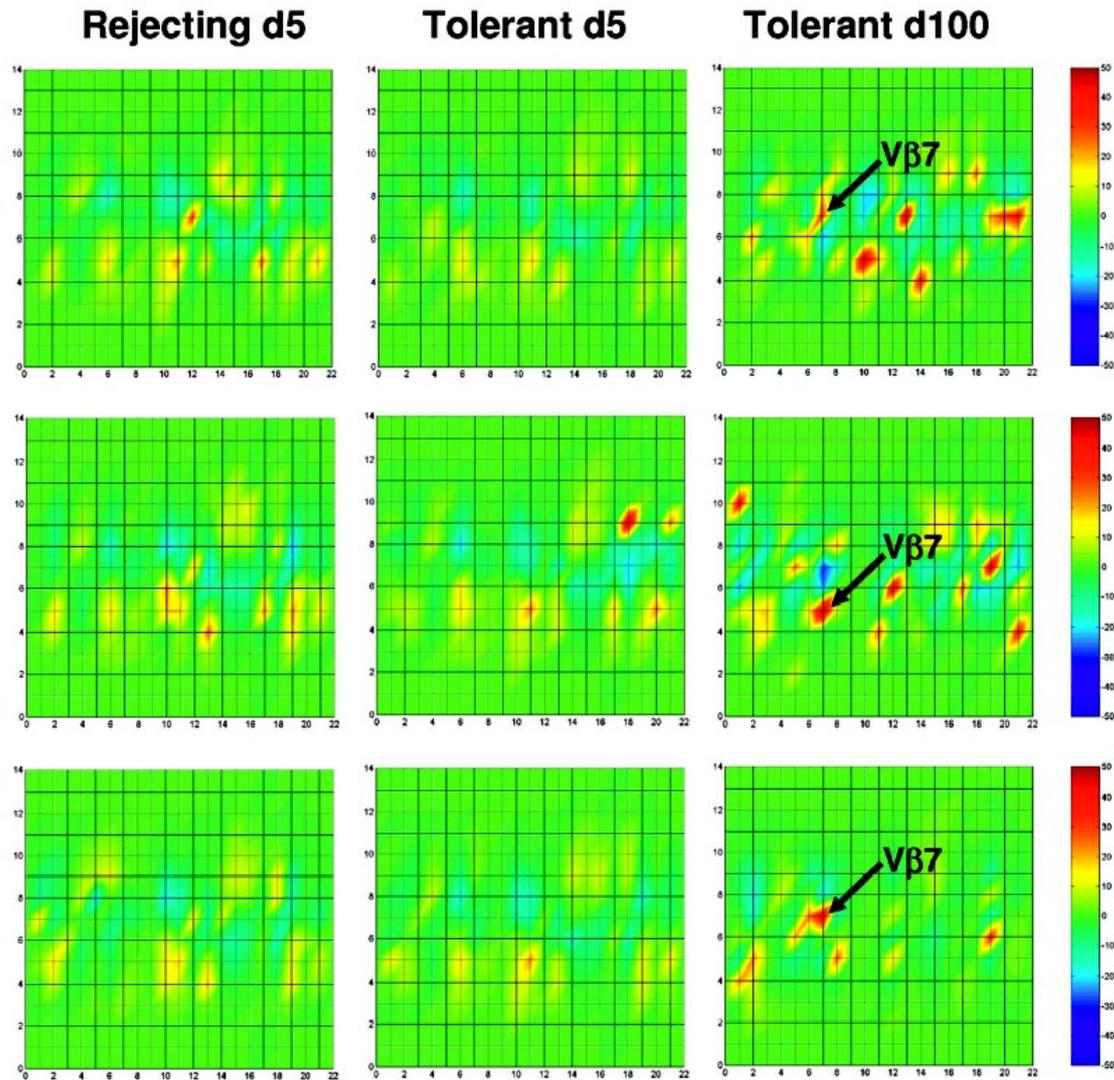


FIGURE 4. TopView representation of allograft TcLandscape profiles. The TCR-V β -CDR3 spectratyping of the 20 V β rat genes was performed, as previously described (14, 15), in rejecting or tolerant allografts at day 5 posttransplantation and in long-term tolerant allografts (day 100) (n=4). The Immunoscope software transcribed CDR3-LD alterations by reference to a theoretical Gaussian profile using a colorimetric scale. Color ranged from deep blue (value <-50% of CDR3-LD alteration) to dark red (>50% of CDR3-LD alteration), with green signifying unaltered ('gaussian') CDR3-LD.

contrasts with the Gaussian distribution of V β repertoires of graft infiltrating T cells from rejecting or tolerant recipients at day 5 posttransplantation (our results and (14, 15)). Indeed, at day 5 posttransplantation, T cells with a broad repertoire are possibly mobilized by the direct recognition of allo MHC/peptide complexes, whereas, at day 100, oligoclonal expansions may represent T cells specific for a limited set of allo-peptides that are also presented on self-MHC. Interestingly, we observed a systematic alteration in the TCR rearrangement of the V β 7 family. Moreover, along with restricted TCR-V β 7 rearrangements, we found a clear accumulation of

V β 7 transcripts within the grafts. We demonstrated that the alteration and accumulation of the V β 7 family are not a result of time or allograft combination, since they were not found in a model of chronic rejection in the same allograft combination. This TCR-V β 7 family selection and accumulation appears to be specific to the regulation observed in this model of tolerance. Interestingly, the TCR-V β 7 alteration was detected neither in the blood nor in the spleens of the long-term tolerant recipients (data not shown), suggesting a specific accumulation of the clones within the graft. These T cell clones may have expanded locally at the graft site where alloantigens

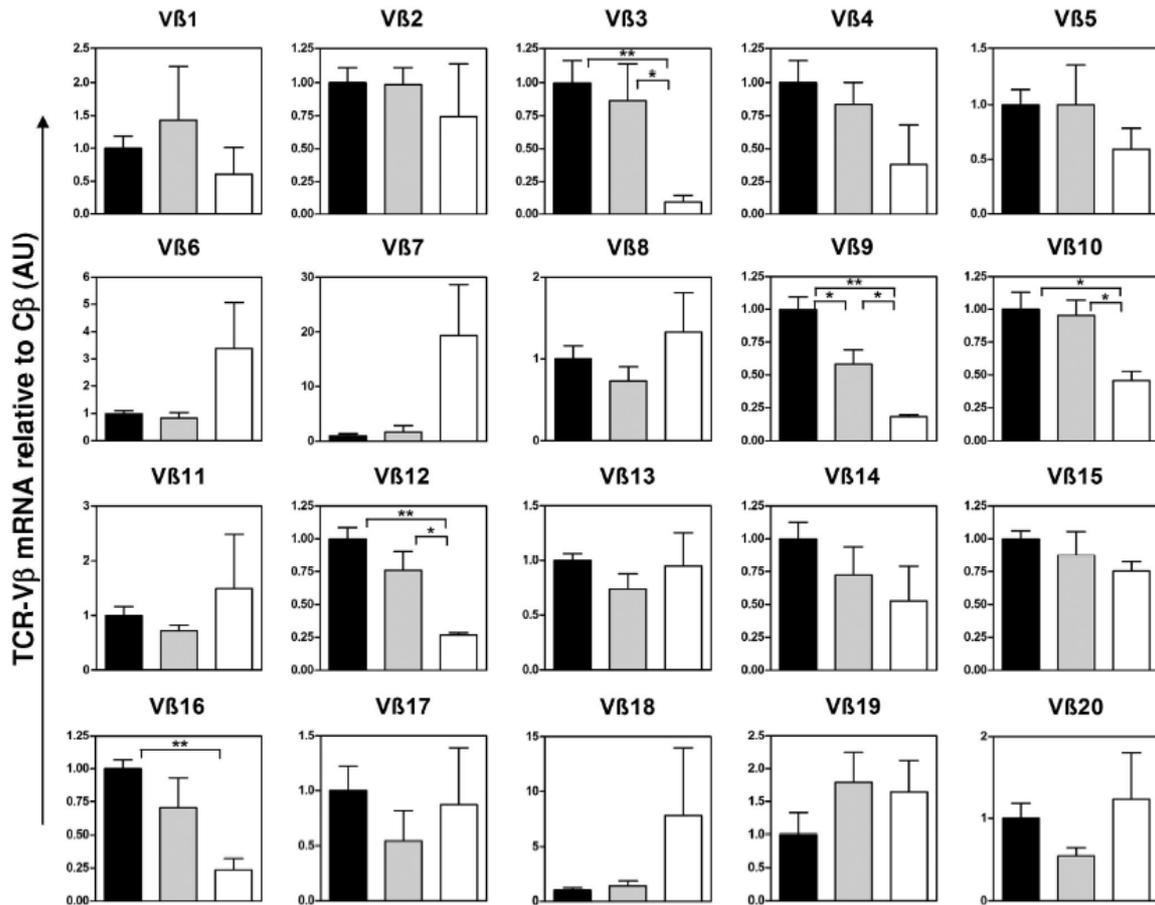


FIGURE 5. Allograft TCR-V β mRNA levels. TCR β mRNA expression of the 20 families were analyzed by quantitative RT/PCR in rejecting (■) or tolerating allografts at day 5 after transplantation (▒) and in long-term tolerant allografts (□) (day 100) (n=3). Data are expressed in Arbitrary Units (AU) relative to C β .

are continuously present and then migrated to the periphery, where they scattered, thus remaining undetectable by our spectratyping method. Alternatively, T cell clones generated in the blood or spleen may have migrated and accumulated in time within the graft.

The T cells harboring the restricted TCR-V β 7 rearrangements may represent regulatory T cells. Natural suppressive CD4⁺ CD25⁺ T cells, which have a very broad TCR-V β repertoire, have been shown capable, once stimulated, of expanding to a specific antigen, as do conventional T cells, while contracting their TCR repertoire (19, 20). Importantly, the presence of T cell clones expressing selective V β genes at the graft site has also been described in models of rat allograft tolerance induced by nondepleting anti-CD4 treatment (21) or by donor-specific blood transfusion (14, 22).

Moreover, T cells with strongly altered TCR usage, TCR transcript accumulation and characteristics of hyporespon-

sive cells have been described in the blood of human tolerant kidney recipients (23). The authors suggested that these features may serve as a marker to identify a state of operational tolerance in recipients under immunosuppression (23).

To conclude, in this model of tolerance, we demonstrate the presence of potent regulatory T cells at the graft site together with a specific accumulation of T cells with restricted TCR-V β 7 rearrangements. These cells may represent oligoclonal T cells with regulatory properties that accumulate at the graft site. These observations may help to characterize operational tolerance in a clinical setting.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claire Usal, Helga Smit, Emmanuel Meriau and Bernard Martinet for their excellent technical assistance in grafting the rats. We also thank Joanna Chess-Ashton for proof-reading the article.

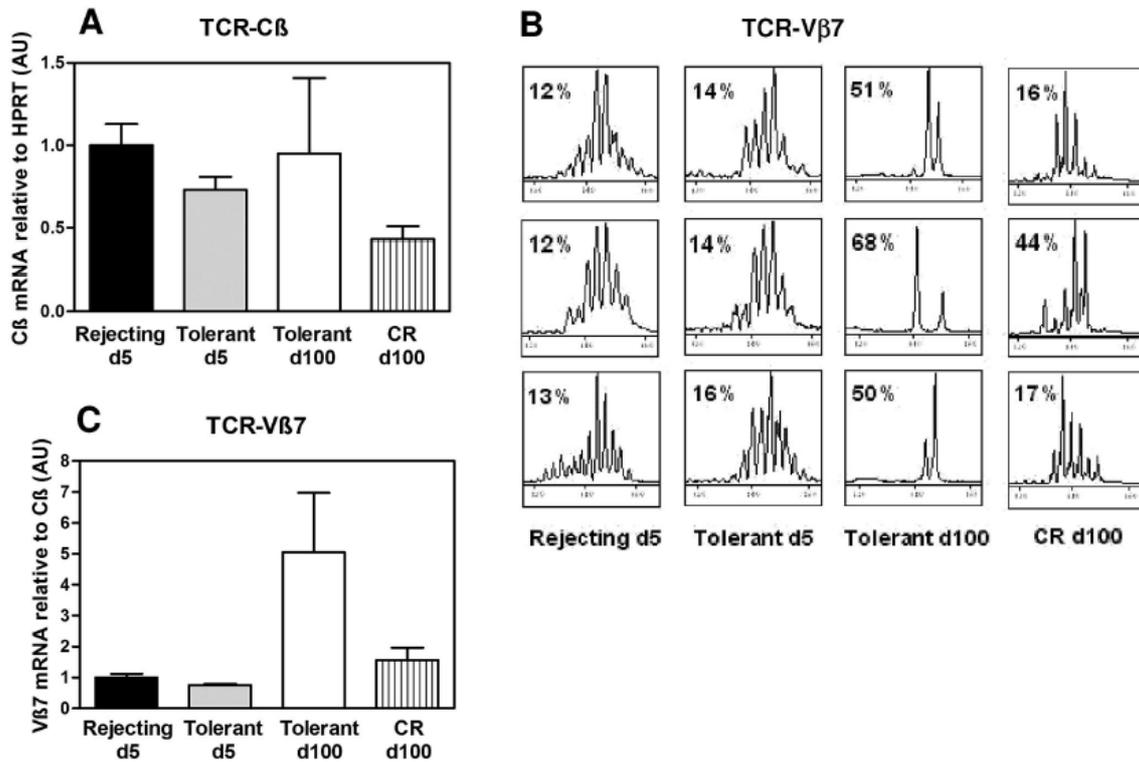


FIGURE 6. Allograft $C\beta$ mRNA levels. (A) $C\beta$ mRNA expression was analyzed by quantitative RT/PCR in rejecting or tolerant allografts at day 5 posttransplantation, in long-term tolerant allografts and in allografts displaying signs of chronic rejection following CTLA-4 Ig treatment (CR) at day 100 posttransplantation ($n=4$). Data are expressed in Arbitrary Units (AU) relative to HPRT. (B) Spectratyping of TCR-V β 7 gene rearrangement was analyzed in rejecting or tolerant allografts at day 5 posttransplantation, in long-term tolerant allografts and in allografts displaying signs of chronic rejection following CTLA-4 Ig treatment (CR) at day 100 posttransplantation (three representative samples). (C) V β 7 mRNA expression was analyzed by quantitative RT/PCR in rejecting or tolerant allografts at day 5 posttransplantation, in long-term tolerant allografts and in allografts displaying signs of chronic rejection following CTLA-4 Ig treatment (CR) at day 100 posttransplantation ($n=4$). Data are expressed in Arbitrary Units (AU) relative to $C\beta$.

REFERENCES

- Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; (3): 199.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. 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 (3): 1151.
- Graca L, Thompson S, Lin CY, et al. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 2002; 168(11): 5558.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutarte P, et al. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 2002; 168(10): 5058.
- Scully R, Qin S, Cobbold S, Waldmann H. Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 1994; 24(10): 2383.
- Chen ZK, Cobbold SP, Waldmann H, Metcalfe S. Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. *Transplantation* 1996; 62(9): 1200.
- Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts *J Exp Med* 2002; 195 (12): 1641.
- Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 57(2): 225.
- Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, et al. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J Immunol* 2000; 164(10): 5258.
- Josien R, Pannetier C, Douillard P, et al. Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats. *Transplantation* 1995; 60(10): 1131.
- Hubert F-X, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. Rat Plasmacytoid Dendritic Cells Are an Abundant Subset of MHC Class II+ CD4+CD11b-OX62- and Type I IFN-Producing Cells That Exhibit Selective Expression of Toll-Like Receptors 7 and 9 and Strong Responsiveness to CpG *J Immunol* 2004; 172 (12): 7485.
- Voisine C, Hubert FX, Trinite B, et al. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002; 169(5): 2284.
- Guillonnet C, Louvet C, Renaudin K, et al. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 2004; 172 (3): 1619.

14. Douillard P, Pannetier C, Josien R, et al. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 1996; 157(3): 1250.
15. Guillet M, Brouard S, Gagne K, et al. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol* 2002; 168(10): 5088.
16. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299 (5609): 1057.
17. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330.
18. Walker MR, Kasproicz DJ, Gersuk VH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25-T cells. *J Clin Invest* 2003; 112(9): 1437.
19. Hayashi Y, Tsukumo S, Shiota H, et al. Antigen-specific T cell repertoire modification of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172(9): 5240.
20. Hsieh CS, Liang Y, Tzysnik AJ, et al. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 2004; 21(2): 267.
21. Zhai Y, Li J, Hammer M, et al. Evidence of T cell clonality in the infectious tolerance pathway: implications toward identification of regulatory T cells. *Transplantation* 2001; 71(12): 1701.
22. Vignes C, Chiffolleau E, Douillard P, et al. Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8+ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *J Immunol* 2000; 165(1): 96.
23. Brouard S, Dupont A, Giral M, et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2005; 5(2): 330.

Annexe II

Matériel et méthodes de la recherche des gènes

1. Analyse des ARNm par puce Agilent

Les puces agilent (RNA 6000 Nano LabChip, Agilent Technologie), permettent de mesurer quantitativement et qualitativement des ARN, avec une sensibilité très fine. Ces puces, sont des lames de verres sur lesquelles est gravé un réseau de capillaires. Un gel d'acrylamide y est coulé. Douze échantillons peuvent être testés en même temps.

Un aliquot contenant 130 μl de gel d'ARN et 2 μl de marqueur d'ARN est préparé. Après avoir installé la puce sur la station de préparation, 9 μl de ce gel sont déposés dans l'un des puits de la puce. On injecte alors le gel dans le réseau de capillaire en exerçant une pression positive à l'aide d'une seringue montée sur la station. Deux autres dépôts de 9 μl sont réalisés dans deux autres puits de la puce. On dépose ensuite 5 μl de tampon contenant un témoin de calibrage dans les douze puits de dépôts des échantillons ainsi que dans le puits servant au calibrage de l'appareil. Dans chaque puits de lecture nous déposons ensuite 1 μl des échantillons à tester. Dans le puits de calibrage, 1 μl d'une solution de marqueur est déposée. Après 1 minute de vortex, la puce est alors prête à être lue. La puce est alors placée dans l'appareil.

Lors de la lecture dans l'Agilent 2100 bioanalyser, des électrodes qui vont tremper dans les puits de dépôts vont faire migrer les ARN marqués par un agent fluorescent. Un capteur va mesurer l'intensité de fluorescence lors de la migration de l'ARN. L'appareil va être calibré grâce à une solution de différents marqueurs de taille, dont la concentration est définie à 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Le logiciel d'analyse (Agilent 2100 Bioanalyser Software), couplé au lecteur, va réaliser une représentation de l'intensité de fluorescence qui est en corrélation directe avec la quantité d'ARN en fonction du temps de migration. Le marqueur de taille présent dans le tampon de lecture va permettre d'aligner les différentes mesures entre elles. En rapportant les aires des courbes obtenues pour chaque échantillon à l'aire de la courbe de la solution de marqueurs de taille, le logiciel, va directement calculer la quantité d'ARN présente dans chaque échantillon. La quantité de matériel analysée dans chaque puits doit être comprise entre 25 et 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour que la mesure puisse être efficace.

2. Les puces à ADN

2.1 Principe

Les puces à ADN permettent d'étudier parallèlement l'expression de plusieurs milliers de gènes. La figure 52 résume leur principe de fonctionnement. De très nombreuses sondes moléculaires sous la forme de produits de PCR sont fixées sur une surface de quelques centimètres carrés par des pointes métalliques équivalentes à des micro-pipettes (spotter). Ces sondes correspondent à un pannel de gènes dont on veut analyser le niveau d'expression dans des situations biologiques données. Deux populations de cibles venant de deux situations biologiques différentes, sous la forme d'ADNc, vont être couplées à des fluorochromes différents (la cyanine 5 et la cyanine 3). La mise en présence des séquences cibles marquées et des sondes conduit à la formation par hybridation de duplexes selon la règle d'appariement définie par Watson et Crick. Les deux populations de cibles étant déposées en même temps sur la puce, elles rentrent en compétition pour s'hybrider avec les différentes sondes. L'expression d'un gène dans une situation donnée est donc en corrélation directe avec la quantité de fluorochrome présent sur le spot correspondant. Après une étape de lavage, la puce est lue à l'aide d'un scanner, ce qui va permettre l'enregistrement d'une image. Il en suit des étapes d'extraction de données, de normalisation, puis une analyse statistique des données. C'est à ce niveau que l'on va pouvoir déterminer quels gènes ont une expression différentielle dans les situations étudiées.

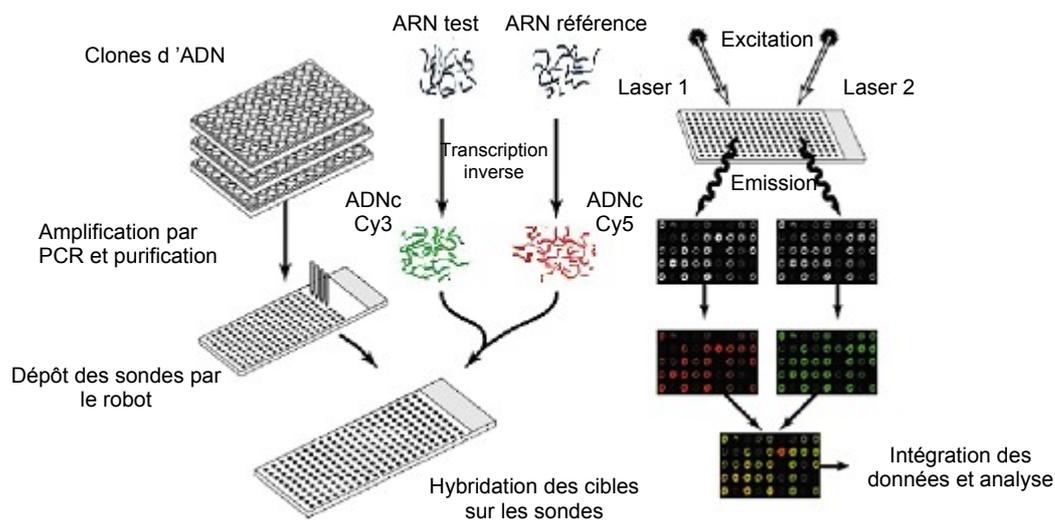


Figure 52 : Principe de fonctionnement des puces à ADN. (Adapté de Duggan et al., 1999)

2.2 Préparation des sondes

Les sondes qui vont être déposées sur les puces, sont obtenues par PCR, en utilisant les amorces universelles M13 situées de part et d'autre du site de clonage multiple du plasmide

pCRII-TOPO dans lesquels ils ont été sous-clonés par TA-cloning (Invitrogen). Les sondes sont transférées sur plaque Multiscreen (Millipore). Après filtration, chaque produit de PCR est resuspendu dans 50 µl de SSC 3X pendant 1 à 2 heures. Deux microlitres de chaque puits sont prélevés de façon à effectuer un contrôle des sondes sur gel d'agarose à 1,5%. Les sondes obtenues, sont alors redistribuées dans des plaques 384 puits par un robot distributeur. Les produits sont alors prêts à être spottés.

2.3 Préparation des lames

Le support utilisé pour déposer les sondes est constitué de lames de microscope. Elles sont recouvertes par une couche de poly-L-lysine (coating) qui va permettre l'adsorption de l'ADN sur la surface de lame. Cette adsorption se fera via des interactions ioniques entre les charges négatives des phosphodiesteres des acides nucléiques et les charges positives de la poly-L-lysine.

Le coating à la poly-L-lysine se fait de la façon suivante : les lames sont plongées dans une solution de lavage alcaline (50g de NaOH ; 200ml H₂O distillée ; 300 ml d'éthanol 95%) et sont mises sous agitation orbitale pendant 2 heures. Cette étape permet de décaper la surface des lames. Les lames sont ensuite rincées 5 fois à l'eau distillée sous agitation, et ce en évitant au maximum, le contact avec l'air afin d'éviter que des poussières viennent se fixer sur les lames.

Les lames sont ensuite incubées dans une solution de poly-L-lysine préparée extemporanément (50 ml de poly-L-lysine (Sigma) ; 5 ml de PBS 10X (Gibco) ; 445 ml d'eau distillée) et mises sous agitation douce pendant 1 heure. Elles sont ensuite séchées par centrifugation à température ambiante. Les lames ne peuvent toutefois pas encore être utilisées. Elles doivent être conservées à température ambiante pendant au minimum 4 semaines. Cette période va permettre à la couche de Poly-L-lysine de se réticuler et former une couche suffisamment solide pour pouvoir être spottée.

2.4 Le dépôt des sondes

Le spotteur est placé dans une enceinte fermée dont l'hygrométrie est maintenue entre 65 et 75 %. L'air y est filtré pour protéger les lames des poussières.

Le prélèvement des sondes dans les puits se fait par capillarité grâce à des pointes fendues en inox. Leur dépôt sur les lames se fait par effet de tension de surface. Après chaque dépôt, les pointes sont lavées et séchées. La distance entre chaque spot est de 300 µm.

La surface des spots dépend directement du volume de sondes déposées. Ce volume pourra varier en fonction d'un certain nombre de facteurs : la caractéristique des pointes,

l'hydrophobicité de la poly-L-lysine, les facteurs environnementaux, et les caractéristiques des solutions de sondes.

Les lames une fois spottées, sont stockées à l'abri de la poussière et devront être utilisées au cours du mois suivant.

2.5 Préparation des cibles

Le marquage des cibles se fait par le kit Cyscribe cDNA Post Labelling (Amersham Pharmacia Biotech).

Les cibles sont préparées à partir de 1 µg d'ARN polyA. Elles sont obtenues par transcription inverse des ARNm en ADNc au cours de laquelle sont incorporés des AminoAllyl-dUTP, qui seront par la suite couplés avec des molécules fluorescentes. Ces molécules fluorescentes sont Cy5 et Cy3. Elles diffèrent par leur spectre d'absorption et d'émission : la Cy3 émet à 540 nm (vert) tandis que la Cy5 émet à 650 nm (rouge). La transcription inverse est réalisée avec des amorces oligoT et des amorces aléatoires.

La première étape de la préparation des cibles permet la synthèse de l'ADNc marqué par l'incorporation des AminoAllyl-dUTP. Dans un tube de 1,5 ml pour chaque réaction on mélange 5 µl d'ARNm (1µg) à 1µl de randoms nonamers, 1µl d'anchored oligo (dT) et 4µl d'H₂O. Ces mélanges sont incubés 5min à 70°C au bain marie, afin de supprimer les structures secondaires des ARN. Les tubes sont placés 10 min à température ambiante pour permettre l'hybridation progressive, avec la baisse de température, des amorces oligodT et randoms sur les ARN. Les tubes sont placés dans la glace et dans chaque tube on ajoute dans l'ordre : 4 µl de tampon CyScript 5x, 2µl de dithiothréitol (DTT) 0.1M, 1µl de nucléotide mix, 1µl de AminoAllyl-dUTP et 1µl de reverse transcriptase CyScript.

Les tubes sont placés au bain marie à 42°C pendant 1H30. Au cours de cette étape, la transcription inverse des ARN en ADNc permet l'incorporation des AminoAllyl-dUTP. Les ARN sont dégradés par l'ajout de 2 µl de NaOH 2.5M, suivi d'une incubation de 15 min à 37°C. Le NaOH est en suite neutralisé par l'ajout de 10µl d'HEPES 2M.

Les ADNc sont purifiés sur colonnes GFX DNA purification Kit (Amersham Pharmacia), et resuspendus dans 50µl d'H₂O.

Les ADNc sont ensuite séchés et resuspendus dans 15µl d'H₂O. Les aliquots de CyDye (1tube par fluorochrome) sont repris dans 15 µl de NaHCO₃, 1M, puis mélangés avec les 15 µl de AminoAllyl-cDNA purifiés. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, à l'abri de la lumière, les marqueurs fluorescents se sont accrochés aux groupements AminoAllyl

des ADNc. On ajoute 15µl d'hydroxylamine 4M à chaque réaction. Puis les échantillons sont incubés 15 min à température ambiante à l'abri de la lumière.

Les cibles sont purifiées sur des colonnes Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen), et éluées dans 50 µl d'eau.

Les cibles sont ensuite séchées au speed-vac et resuspendues dans 20µl de mix d'hybridation qui se compose de : 10µl de TE, 4 µl de Mouse Cot1 DNA, 1µl de polyA RNA, 1µl de Yeast RNA, 3,5 µl de SSC 20X et 0,6µl de SDS 10%. Les ARN de levure et les ARN polyA limitent les hybridations non spécifiques. L'ADN de souris permet de saturer les charges négatives de la poly-L-lysine pour diminuer le bruit de fond. Le TE permet de tamponner le milieu.

2.6 Préparation des lames pour l'hybridation

La première étape dans la préparation des lames consiste à les graver, afin de pouvoir les différencier. La zone spottée est également délimitée. La lame est hydratée sur la vapeur d'un bain marie à 60°C (ADN vers l'eau) quelques secondes. Cette étape permet de mieux distribuer les ADNc au niveau des spots. Les lames sont ensuite immédiatement séchées, jusqu'à disparition de la buée sur une plaque chauffée à 70-80°C.

L'ADN est ensuite cross-lié à la lame par irradiation UV au Stratalinker à 600*100µJ/cm².

Puis, les lames sont plongées dans une solution préparée extemporanément composée de 2,4 g d'anhydride succinique, 130 ml de 1-Méthyl-2-pyrrolidone, 10ml de tampon Borate 1M, pH8. Elles sont placées 15 min sous agitation. Cette étape dite de fixation permet la succinylation des molécules de lysine libres, dans l'objectif de minimiser leur habilité à lier les cibles marquées, ce qui génère un bruit de fond important. Les lames sont ensuite plongées 2 min dans l'eau bouillante, ce qui permet l'ouverture des doubles brins d'ADNc des sondes, qui est essentielle pour l'hybridation des cibles. Pour finir, les lames sont transférées dans un bac contenant de l'éthanol à 95 %, puis centrifugées 30 min à 500 rpm avec une centrifugeuse GR 4 22 (Jouan), à température ambiante afin de les sécher.

Les lames ainsi traitées sont prêtes pour l'hybridation et peuvent se conserver à température ambiante et au sec pendant 8 jours.

2.7 Hybridation des lames

Un mélange de 10 µl de cibles Cy3 avec 10 µl de cibles Cy5 est dénaturé 2 min à 100°C pour éliminer les structures secondaires et permettre la séparation de l'ADNc de son ARN. La solution est incubée 30 min à 37°C. Les mélanges de cibles sont ensuite déposés sur les

lames préalablement préparées, et une lamelle (20*20 mm) est déposée sur la zone d'hybridation. Le tout est installé dans une chambre d'hybridation, qui est fermée hermétiquement et déposée dans un bain marie à 60°C durant 14 à 18 heures, pour permettre l'hybridation des cibles sur les sondes par complémentarité de séquences.

2.8 Lavages

Après l'incubation, les lames hybridées sont lavées à plusieurs reprises dans des solutions de lavage de stringence croissante. Cette étape permet d'éliminer les sondes non hybridées et diverses hybridations aspécifiques. Les lames sont d'abord plongées dans une solution de SDS 0,1% (SDS 10%, 2 ml ; SSC 20X, 198 ml), puis dans une solution de SSC 1X, et pour finir dans une solution de SSC 0,2X. Les lames sont ensuite centrifugées 3 min à 500 rpm à température ambiante afin de les sécher. Elles sont stockées à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les lames sont alors prêtes à être lues au scanner.

2.9 Lecture des lames

La lecture des puces est réalisée à l'aide d'un scanner qui se compose d'un microscope confocal (Scanarray, GSI Lumonics) couplé à un photomultiplicateur (Microarray Analysis Software, GSI Lumonics). Le scanner contient des lasers qui permettent d'exciter les cyanines, les molécules fluorescentes incorporées dans les cibles. Elles absorbent alors l'énergie émise par le laser et émettent des photons, qui sont alors captés par le photomultiplicateur (PMT). Ce PMT convertit les photons en signal électrique et amplifie le signal. Lors de la lecture, on obtient une image pour chaque cyanine. Le niveau de gris pour chaque spot représente l'intensité de la fluorescence. Un spot blanc caractérise une saturation de la fluorescence pour au moins l'un des fluorochromes, un spot noir, une absence de fluorescence. Cette image en niveaux de gris est convertie en image en fausses couleurs. La Cy3 est représentée par la couleur verte, la Cy5 par la couleur rouge. Les images des deux cyanines sont ensuite superposées. Un spot jaune caractérise une expression homologue du gène dans les deux situations étudiées, un spot vert une expression préférentielle du gène de la situation marquée au Cy3, un spot rouge une expression préférentielle du gène de la situation marquée au Cy5.

A cette étape, il est important d'équilibrer les intensités des deux fluorochromes en agissant sur l'intensité de stimulation du laser, ou la sensibilité de réception du signal par le PMT, afin de compenser une différence d'incorporation des fluorochromes. La lecture doit se faire en

utilisant des intensités croissantes pour arriver à une intensité de stimulation et un PMT optimaux. Si l'intensité de stimulation est trop importante, alors les fluorochromes vont être détruits, et il n'y aura plus assez de signal pour faire de nouvelles mesures.

2.10 Acquisition et analyse des données

Les images générées par la lecture des lames sont analysées avec le logiciel d'analyse d'images GenePix (Axon Instruments, Inc). Ce logiciel permet de créer des grilles paramétrables qui vont être superposées à l'image de la puce. Le logiciel va générer automatiquement un cercle adaptatif autour de chaque spot. Il va aussi déterminer si le spot est valide ou non en fonction de son homogénéité et de son niveau de signal. Une relecture manuelle, permet de vérifier la qualité d'interprétation du logiciel, et si besoin est de modifier la segmentation du spot.

GenePix va générer un ensemble de données sous la forme d'un fichier de tableur qui sera ensuite exploitable sous Excel (Microsoft). Ce logiciel va permettre pour chaque spot de mesurer notamment, la moyenne et la médiane des intensités, et le bruit de fond local.

Pour l'interprétation des données nous avons choisi de travailler sur la médiane des intensités, qui représente l'intensité du $n^{\text{ième}}$ pixel du spot, ou n est la moitié du nombre des pixels du spot classés par intensité. L'avantage est que cette valeur n'est influencée par les pixels peu nombreux dus à des poussières lumineuses, ou bien les pixels noirs qui auraient été pris en compte dans le cercle. Nous n'avons pas choisi d'utiliser la moyenne des intensités, car cette valeur est influencée d'une part, par le bruit de fond qui pourrait apparaître dans le cercle du spot, et d'autre part, par les poussières dont l'intensité est très importante.

L'extraction des données brutes et la qualité des critères d'analyse permettent de détecter les gènes d'intérêt. A cause des variations expérimentales, les données doivent être filtrées, normalisées, et étudiées de manière statistique pour identifier les gènes ayant une expression différentielle significative. Une puce est composée de sous unités de surface, ou blocs qui correspondent au nombre de pointes utilisées pour spotter les gènes sur la puce. Une sous unité de surface est similaire à une matrice ordonnée avec i lignes et J colonnes. L'analyse de l'image par un logiciel d'extraction de données génère des données brutes, des mesures quantitatives et qualitatives, qui sont répertoriées dans un fichier informatique de type tableur. Le traitement manuel des données générées à partir des puces prends beaucoup de temps et est la source de beaucoup d'erreurs. Pour augmenter la rapidité de l'analyse des données, l'unité 533 de l'Inserm a développé une série de macros écrites en Visual Basic. Ces applications fonctionnent en une succession d'étapes logiques.

La première étape consiste à filtrer les données suivant une série de critères (valeur du signal, du bruit, et de la saturation). Un système d'attribution de scores permet d'éliminer les mauvais spots et d'analyser uniquement les gènes exprimés.

La seconde étape est la normalisation de données. Une régression non linéaire, "The lowess fitness algorithm", est utilisée (Yang et al., 2002). Les gènes filtrés sont normalisés par la courbe "lowess" elle-même construite à partir des gènes invariants estimées par la méthode de Tseng et al. : "The Rank Invariant method". Cet algorithme requiert l'intégration d'une fonction mathématique implémentée dans R (Tseng et al. 2001) (Yang et al., 2002). La connexion entre R et Excel est basée sur un serveur COM et une interface spécifique (Neuwirth et Baier., 2001). Cette procédure permet la comparaison et la combinaison de trois types de standardisation spatiale. Il est possible de travailler au choix avec une normalisation globale ou une normalisation par blocs (bloc par bloc), ou par les blocs adjacents. Plusieurs expérimentations ont montré que la normalisation locale est meilleure que la normalisation globale (Yang et al., 2002). Cependant, parfois le nombre de gènes invariants peut être bas ou insuffisant pour une normalisation par blocs satisfaisante (Tseng, Oh et al. 2001). Pour corriger ce problème, il est parfois préférable d'inclure dans l'algorithme des gènes invariants des blocs adjacents de celui étudié.

La troisième étape consiste à combiner la filtration et la normalisation des données. Les données une fois filtrées et normalisées, sont visualisées par des graphiques. La décision de la normalisation bloc par bloc, ou globale est appliquée pour avoir une sélection de gènes filtrés et normalisés. Enfin, la pertinence des gènes sélectionnés est testée statistiquement (Tusher et al. 2001).

2.11 Séquençage

Le séquençage des clones est réalisé en utilisant la technique de séquençage automatique ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing de Perkin-Elmer. Une solution de Mix de séquence fournie dans le kit contient l'enzyme de polymérisation de l'ADN, et les dNTP, dont une partie est couplée à un fluorochrome différent pour chacune des bases A, G, T et C. 4 µl du Mix de séquence, 200-500 ng d'ADN plasmidique (1 à 5 µl), et 3,2 pmoles de l'amorce (1µl) sont mélangés dans un volume final de 10µl, et placés dans un thermocycleur pour une réaction d'élongation de 25 cycles (96°C, 10 sec ; 50°C, 5 sec ; 60°C, 4 min). Les produits d'élongation sont précipités 10 min sur glace avec 2µl d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 50µl d'éthanol 95%, puis centrifugés 30 min à 13000 tr/min. Le culot est lavé par 250 µl d'éthanol 70%, séché sous vide, et repris dans 3µl d'une solution de formamide déionisée – EDTA 25 mM. L'échantillon est ensuite dénaturé à 90°C pendant 2 min, et déposé dans un gel de polyacrylamide 6%, urée 10M dénaturant, installé dans le séquenceur 373 DNA Sequencer

(Perkin-Elmer). Pendant qu'un champ électrique permet la migration de l'échantillon, un laser provoque l'excitation des fluorochromes portés par les brin d'ADN, séparés selon leurs longueurs par l'électrophorèse. L'intensité de la fluorescence correspondant aux longueurs d'ondes émises par les quatre fluorochromes est enregistrée en temps réel.

Les données obtenues sont traitées par le logiciel 373 DNA Sequencer Data Collection (Pekin-Elmer), qui permet d'établir un électrophorégramme, composé d'une succession de pics correspondant aux bases de la séquence. La longueur des séquences obtenues varie entre 100 et 500 bases, suivant la qualité des échantillons et du gel dénaturant.

3. La PCR quantitative en temps réel

3.1 Principe

La comparaison précise du niveau d'expression des ARNm entre différentes situations biologiques a été réalisée grâce à la technique de PCR quantitative en temps réel SYBR Green PCR (Perkin-Elmer), basée sur la technologie TaqMan.

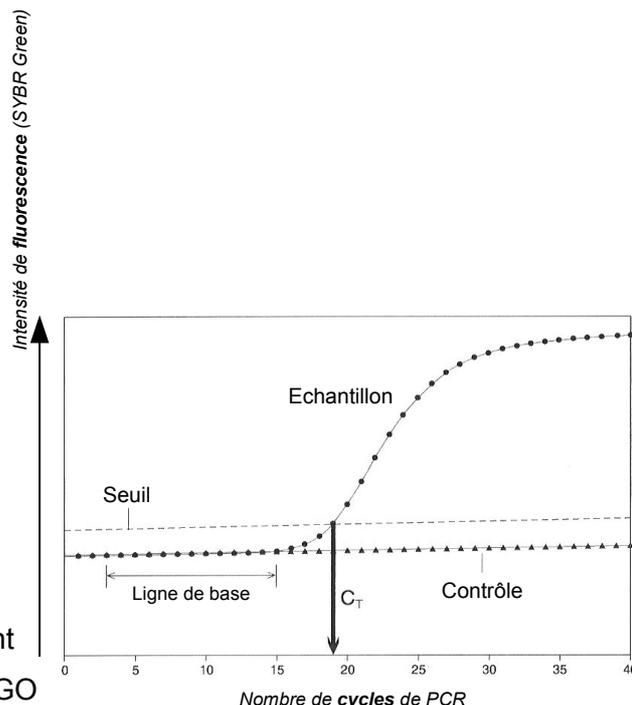
Chaque échantillon d'ADNc (issus des ARNm) est utilisé dans une PCR avec des amorces spécifiques du transcrit à analyser. Le produit de PCR est détecté en mesurant en continu la fluorescence causée par la liaison du SYBR Green (marqueur fluorescent) à l'ADN double brin. La valeur Ct est définie comme le nombre de cycles auquel la courbe d'amplification atteint le seuil de fluorescence, situé dans la portion exponentielle de la courbe d'amplification. Ainsi, le Ct est d'autant plus faible que le transcrit est fortement exprimé. Puisque le rendement de l'extraction des ARN et la qualité de la rétrotranscription varient d'un échantillon à l'autre, ces derniers sont aussi analysés pour un gène de ménage (à expression constitutive stable), l'Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), permettant de normaliser les taux d'ARN. L'index d'accumulation des transcrits (TAI ou unité arbitraire) détermine l'expression relative d'un échantillon par rapport à un témoin, le témoin représentant la valeur 1 d'expression de chaque gène.

Le TAI est calculé d'après la formule $TAI = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, où $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{HPRT}})_{\text{échantillon}} - (Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{HPRT}})_{\text{témoin}}$. La méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ne peut être utilisée qu'après avoir vérifié que l'efficacité de chaque PCR spécifique est supérieure à 90%, ce qui est déterminé par la pente de la $f(\log(DNA_{\text{échantillon}}))$.

Ainsi, l'abondance d'une molécule, même faiblement exprimée, pourra être comparée de façon très précise.

3.2 Recherche

Les primers sont
du logiciel OLIGO



de primer
choisis par l'intermédiaire
4.0s (National

Figure 53 : PCR quantitative en temps réel. Au cours de la PCR, l'augmentation de la fluorescence reflète l'amplification exponentielle de l'amplicon du transcrite (ADNc) analysé. L'échantillon testé est assigné d'une valeur (C_T) représentant le nombre de cycles nécessaires au dépassement d'un seuil de fluorescence.

Biosciences, Inc., USA). Les critères de sélection, mis au point au laboratoire, sont multiples. La taille de l'oligonucléotide doit être comprise entre 20 et 25 pb. La température de dissociation (T_d) doit être de 66°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). La distance entre les deux primers (5' et 3') doit être comprise entre 150 et 300 pb de façon à ce que le produit d'amplification ne soit pas trop court pour être bien caractérisé, mais aussi pas trop long, pour que l'enzyme de polymérisation n'ait pas de problème à réaliser l'amplification (cf Figure 53). Le pourcentage de GC doit être compris entre 30% et 80%. Il ne doit pas y avoir plus de 3 G à suivre, ou d'un GC dans les 5 derniers nucléotides en 3'. L'énergie pour la formation de duplexes dans l'oligonucléotide est satisfaisante entre 0 et -5 Kcal/mol (on pourra éventuellement tolérer jusqu'à -10 Kcal/mol). Il en est de même pour les duplexes Upper/Lower des primers en 5' et 3' de la séquence. Il ne doit pas y avoir de faux sites d'amorçage dans la séquence entière pour chacun des deux primers. Il faut également s'assurer qu'il n'y ait pas d'hybridation possible avec d'autres séquences, que celle que l'on souhaite (vérification sur Blast).

3.3 Rétrotranscription des ARN en ADNc simple brin

10 μl contenant 10 μg des ARN totaux sont mélangés avec 8 μL d'une solution contenant des oligo (dT) (25 mers, 250ng), des dNTP (12,5 μmol chacun), et du dithiothréitol (200 nmol, Gibco BRL), puis incubés 10 minutes à 70°C (étape de dénaturation – hybridation). 7 μL d'une solution contenant du tampon (1X final : Tris 10mM, MgCl_2 3mM, KCl 75mM, Gibco

BRL), de la RNAsine (40U/mL final, Gibco BRL), et l'enzyme de rétrotranscription M-MLV reverse transcriptase (200U/mL final, Gibco BRL) sont ajoutés pour une rétrotranscription à 42°C pendant 1 heure (synthèse du premier brin d'ADNc).

3.4 Dosage des échantillons

1 µL d'échantillon (ADNc ou standard) est mélangé à 24µL d'un mélange réactionnel composé du tampon 1X SYBR Green (Perkin-Elmer), de MgCl₂ (3mM, Perkin-Elmer), de dNTP Blend (dA,C,G 200µM chacun, dUTP 400µM, Perkin-Elmer), de chacune des amorces spécifiques de la séquence étudiée (0,3µM), et de l'enzyme AmpliTaqGold (25U/mL, Perkin-Elmer). Chaque dosage est effectué en duplicat dans une plaque 96 puits placée dans le détecteur ABI PRISM 7700 Sequence Detector. 10 minutes à 95°C permettent d'activer l'enzyme AmpliTaqGold et de dénaturer l'ADNc, l'amplification se déroule pendant 40 cycles alternant 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

Bibliographie

- Aaltonen, J. and P. Bjorses (1999). "Cloning of the APECED gene provides new insight into human autoimmunity." Ann Med **31**(2): 111-6.
- Ackerman, A. L. and P. Cresswell (2004). "Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens." Nat Immunol **5**(7): 678-84.
- Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe and P. Cresswell (2005). "Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells." Nat Immunol **6**(1): 107-13.
- Alam, A., L. Y. Cohen, S. Aouad and R. P. Sekaly (1999). "Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells." J Exp Med **190**(12): 1879-90.
- Allan, R. S., C. M. Smith, G. T. Belz, A. L. van Lint, L. M. Wakim, W. R. Heath and F. R. Carbone (2003). "Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells." Science **301**(5641): 1925-8.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Amthor, H., D. Connolly, K. Patel, B. Brand-Saberi, D. G. Wilkinson, J. Cooke and B. Christ (1996). "The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis." Dev Biol **178**(2): 343-62.
- Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S. K. Shaw, F. W. Luscinskas and D. Gabuzda (2003). "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes." J Exp Med **197**(12): 1701-7.
- Anderson, G., K. M. Partington and E. J. Jenkinson (1998). "Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus." J Immunol **161**(12): 6599-603.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist and D. Mathis (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." Science **298**(5597): 1395-401.
- Anegon, I., C. Guillonneau, M. Hill and C. Chauveau (2004). "Application of gene transfer technologies to transplantation." Ther Drug Monit **26**(3): 248-50.
- Araki, M., T. Kondo, J. E. Gumperz, M. B. Brenner, S. Miyake and T. Yamamura (2003). "Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission." Int Immunol **15**(2): 279-88.
- Armstrong, H. E., E. M. Bolton, I. McMillan, S. C. Spencer and J. A. Bradley (1987). "Prolonged survival of actively enhanced rat renal allografts despite accelerated cellular infiltration and rapid induction of both class I and class II MHC antigens." J Exp Med **165**(3): 891-907.
- Arthur, A. G. and H. White (1996). "Children's assignment of gender to animal characters in pictures." J Genet Psychol **157**(3): 297-301.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." J Exp Med **184**(2): 387-96.

- Asiedu, C. K., K. J. Goodwin, G. Balgansuren, S. M. Jenkins, S. Le Bas-Bernardet, U. Jargal, D. M. Neville, Jr. and J. M. Thomas (2005). "Elevated T regulatory cells in long-term stable transplant tolerance in rhesus macaques induced by anti-CD3 immunotoxin and deoxyspergualin." J Immunol **175**(12): 8060-8.
- Auchincloss, H., Jr., R. Lee, S. Shea, J. S. Markowitz, M. J. Grusby and L. H. Glimcher (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.
- Autiero, M., P. Abrescia and J. Guardiola (1991). "Interaction of seminal plasma proteins with cell surface antigens: presence of a CD4-binding glycoprotein in human seminal plasma." Exp Cell Res **197**(2): 268-71.
- Autiero, M., G. Cammarota, A. Friedlein, M. Zulauf, G. Chiappetta, V. Dragone and J. Guardiola (1995). "A 17-kDa CD4-binding glycoprotein present in human seminal plasma and in breast tumor cells." Eur J Immunol **25**(5): 1461-4.
- Azuma, T., T. Takahashi, A. Kunisato, T. Kitamura and H. Hirai (2003). "Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions." Cancer Res **63**(15): 4516-20.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman and D. A. Hafler (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-53.
- Barker, C. F. and R. E. Billingham (1977). "Immunologically privileged sites." Adv Immunol **25**: 1-54.
- Bassett, D. E., Jr., M. B. Eisen and M. S. Boguski (1999). "Gene expression informatics--it's all in your mine." Nat Genet **21**(1 Suppl): 51-5.
- Bautz, E. K. and E. Reilly (1966). "Gene-specific messenger RNA: isolation by the deletion method." Science **151**(708): 328-30.
- Bemelman, F., K. Honey, E. Adams, S. Cobbold and H. Waldmann (1998). "Bone marrow transplantation induces either clonal deletion or infectious tolerance depending on the dose." J Immunol **160**(6): 2645-8.
- Benghiat, F. S., L. Graca, M. Y. Braun, S. Detienne, F. Moore, S. Buonocore, V. Flamand, H. Waldmann, M. Goldman and A. Le Moine (2005). "Critical influence of natural regulatory CD25+ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression." Transplantation **79**(6): 648-54.
- Benichou, G., R. C. Tam, L. R. Soares, I. A. Popov, M. R. Garovoy and E. V. Fedoseyeva (1996). "The influence of two distinct alloresponse pathways on the design of peptide-based strategies for allograft tolerance." Res Immunol **147**(6): 377-87.
- Billingham, R. E., L. Brent and P. B. Medawar (1953). "Activity acquired tolerance of foreign cells." Nature **172**(4379): 603-6.
- Bjorkman, P. J. and P. Parham (1990). "Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules." Annu Rev Biochem **59**: 253-88.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1987). "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2." Nature **329**(6139): 506-12.

- Bouneaud, C., P. Kourilsky and P. Bousso (2000). "Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion." Immunity **13**(6): 829-40.
- Brekken, R. A. and E. H. Sage (2001). "SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication." Matrix Biol **19**(8): 816-27.
- Brunner, T., R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware and et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." Nature **373**(6513): 441-4.
- Bugeon, L., M. C. Cuturi, M. M. Hallet, J. Paineau, D. Chabannes and J. P. Soulillou (1992). "Peripheral tolerance of an allograft in adult rats--characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft." Transplantation **54**(2): 219-25.
- Bugeon, L., M. C. Cuturi, J. Paineau, I. Anegon and J. P. Soulillou (1993). "Similar levels of granzyme A and perforin mRNA expression in rejected and tolerated heart allografts in donor-specific tolerance in rats." Transplantation **56**(2): 405-8.
- Bushell, A., T. C. Pearson, P. J. Morris and K. J. Wood (1995). "Donor-recipient microchimerism is not required for tolerance induction following recipient pretreatment with donor-specific transfusion and anti-CD4 antibody. Evidence of a clear role for short-term antigen persistence." Transplantation **59**(10): 1367-71.
- Camara, N. O., F. Seville and R. I. Lechler (2003). "Human CD4+CD25+ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8+ T cell activation." Eur J Immunol **33**(12): 3473-83.
- Campos, L., A. Naji, B. C. Deli, J. H. Kern, J. I. Kim, C. F. Barker and J. F. Markmann (1995). "Survival of MHC-deficient mouse heterotopic cardiac allografts." Transplantation **59**(2): 187-91.
- Cara, C. J., A. S. Pena, M. Sans, L. Rodrigo, M. Guerrero-Esteo, J. Hinojosa, J. Garcia-Paredes and L. G. Guijarro (2004). "Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice." Med Sci Monit **10**(11): RA247-54.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera and N. Suci-Foca (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." Nat Immunol **3**(3): 237-43.
- Chang, M. D., J. W. Pollard, H. Khalili, S. M. Goyert and B. Diamond (1993). "Mouse placental macrophages have a decreased ability to present antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 462-6.
- Chen, S., K. B. Bacon, L. Li, G. E. Garcia, Y. Xia, D. Lo, D. A. Thompson, M. A. Siani, T. Yamamoto, J. K. Harrison and L. Feng (1998). "In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II." J Exp Med **188**(1): 193-8.
- Chen, W., M. S. Ford, K. J. Young and L. Zhang (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., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (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, W., W. Jin, M. Cook, H. L. Weiner and S. M. Wahl (1998). "Oral delivery of group A streptococcal cell walls augments circulating TGF-beta and suppresses streptococcal cell wall arthritis." J Immunol **161**(11): 6297-304.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-40.
- Cheon, H., S. J. Yu, D. H. Yoo, I. J. Chae, G. G. Song and J. Sohn (2002). "Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals." Clin Exp Immunol **127**(3): 547-52.
- Chevalier, S., H. Lacroix, J. F. Moreau and J. P. Soulillou (1987). "Blood transfusion plus allograft--but not blood transfusion alone--induce IL 2-producing suppressor cells in LEW-1A recipients of LEW-1W heart allograft." Transplant Proc **19**(1 Pt 1): 544-6.
- Chiffolleau, 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**(8): 745-57.
- Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soulillou 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**(10): 5058-69.
- Chiffolleau, E., J. M. Heslan, J. P. Soulillou and M. C. Cuturi (2000). "New insight into mechanisms of allograft transplantation in the rat by differential display: macrophage scavenger receptor-A brings to light." Mol Med **6**(12): 1054-61.
- Choi, B. M., H. O. Pae, Y. R. Jeong, Y. M. Kim and H. T. Chung (2005). "Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression." Biochem Biophys Res Commun **327**(4): 1066-71.
- Chothia, C., D. R. Boswell and A. M. Lesk (1988). "The outline structure of the T-cell alpha beta receptor." Embo J **7**(12): 3745-55.
- Chowdhury, N. C., B. Murphy, M. H. Sayegh, M. A. Hardy and S. F. Oluwole (1997). "Induction of transplant tolerance by intrathymic inoculation of synthetic MHC class I allopeptides." Transplant Proc **29**(1-2): 1136.
- Ciubotariu, R., A. I. Colovai, G. Pennesi, Z. Liu, D. Smith, P. Berlocco, R. Cortesini and N. Suci-Foca (1998). "Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells." J Immunol **161**(10): 5193-202.
- Colovai, A. I., M. Mirza, G. Vlad, S. Wang, E. Ho, R. Cortesini and N. Suci-Foca (2003). "Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients." Hum Immunol **64**(1): 31-7.

- Cortesini, R., J. LeMaoult, R. Ciubotariu and N. S. Cortesini (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.
- Costello, E., M. Munoz, E. Buetti, P. R. Meylan, H. Diggelmann and M. Thali (2000). "Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors." Gene Ther **7**(7): 596-604.
- 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.
- Cozzo, C., J. Larkin, 3rd and A. J. Caton (2003). "Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **171**(11): 5678-82.
- Cresswell, P. (1996). "Invariant chain structure and MHC class II function." Cell **84**(4): 505-7.
- Cresswell, P., A. L. Ackerman, A. Giodini, D. R. Peaper and P. A. Wearsch (2005). "Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation." Immunol Rev **207**: 145-57.
- Cruikshank, W. W., J. S. Berman, A. C. Theodore, J. Bernardo and D. M. Center (1987). "Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes." J Immunol **138**(11): 3817-23.
- Cruikshank, W. W., D. M. Center, N. Nisar, M. Wu, B. Natke, A. C. Theodore and H. Kornfeld (1994). "Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 5109-13.
- Cruikshank, W. W., H. Kornfeld and D. M. Center (1998). "Signaling and functional properties of interleukin-16." Int Rev Immunol **16**(5-6): 523-40.
- Cuturi, M. C., J. M. Heslan, R. Josien, P. Douillard and J. P. Souillou (1997). "High interleukin-12 p40 mRNA expression in tolerant heart allografts in recipient rats treated by donor-specific transfusion." Transplant Proc **29**(1-2): 1170.
- Cuturi, M. C., R. Josien, D. Cantarovich, L. Bugeon, I. Anegon, S. Menoret, H. Smit, P. Douillard and J. P. Souillou (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.
- Daidone, M. G., A. Paradiso, M. Gion, N. Harbeck, F. Sweep and M. Schmitt (2004). "Biomolecular features of clinical relevance in breast cancer." Eur J Nucl Med Mol Imaging **31 Suppl 1**: S3-14.
- Dallman, M. J., O. Shiho, T. H. Page, K. J. Wood and P. J. Morris (1991). "Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway." J Exp Med **173**(1): 79-87.
- Dallman, M. J., K. J. Wood and P. J. Morris (1987). "Specific cytotoxic T cells are found in the nonrejected kidneys of blood-transfused rats." J Exp Med **165**(2): 566-71.
- Dalloul, A. H., E. Chmouzis, K. Ngo and W. P. Fung-Leung (1996). "Adoptively transferred CD4+ lymphocytes from CD8 -/- mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts." J Immunol **156**(11): 4114-9.

- Dantal, J. and J. P. Souillou (2005). "Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation." N Engl J Med **352**(13): 1371-3.
- Dausset, J. (1981). "The major histocompatibility complex in man." Science **213**(4515): 1469-74.
- Davies, J. D., L. Y. Leong, A. Mellor, S. P. Cobbold and H. Waldmann (1996). "T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition." J Immunol **156**(10): 3602-7.
- Davis, M. M. (1990). "T cell receptor gene diversity and selection." Annu Rev Biochem **59**: 475-96.
- Debouck, C. and P. N. Goodfellow (1999). "DNA microarrays in drug discovery and development." Nat Genet **21**(1 Suppl): 48-50.
- Demetris, A., D. Adams, C. Bellamy, K. Blakolmer, A. Clouston, A. P. Dhillon, J. Fung, A. Gouw, B. Gustafsson, H. Haga, D. Harrison, J. Hart, S. Hubscher, R. Jaffe, U. Khettry, C. Lassman, K. Lewin, O. Martinez, Y. Nakazawa, D. Neil, O. Pappo, M. Parizhskaya, P. Randhawa, S. Rasoul-Rockenschaub, F. Reinholt, M. Reynes, M. Robert, A. Tsamandas, I. Wanless, R. Wiesner, A. Wernerson, F. Wrba, J. Wyatt and H. Yamabe (2000). "Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel." Hepatology **31**(3): 792-9.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.
- Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov and P. D. Siebert (1996). "Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6025-30.
- Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger and G. Schuler (2001). "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." J Exp Med **193**(11): 1303-10.
- Douillard, P., R. Josien, C. Pannetier, M. Bonneville, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1998). "Selection of T cell clones with restricted TCR-CDR3 lengths during in vitro and in vivo alloresponses." Int Immunol **10**(1): 71-83.
- Douillard, P., C. Pannetier, R. Josien, S. Menoret, P. Kourilsky, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1996). "Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts." J Immunol **157**(3): 1250-60.
- Douillard, P., C. Vignes, R. Josien, E. Chiffolleau, J. M. Heslan, V. Proust, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1999). "Reassessment of the role of CD8+ T cells in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion." Eur J Immunol **29**(6): 1919-24.
- Ducoroy, P., D. de Fornel, F. Chirade, P. Fontet and P. Dutartre (2001). "The immunosuppressant LF-150195 inhibits the progression of established collagen-induced arthritis by blockage of anticollagen IgG2a production." Transplant Proc **33**(3): 2281-3.

- Ducoroy, P., D. de Fornel, F. Chirade, P. Fontet and P. Dutartre (2001). "The immunosuppressant LF 15-0195 prevents collagen-induced arthritis with IL-10 down-regulation." Transplant Proc **33**(3): 2142-5.
- Ducoroy, P., D. de Fornel, L. Dubrez-Daloz, E. Solary and P. Dutartre (2003). "Longterm protection of mice against collagen-induced arthritis after short-term LF 15-0195 treatment: modulation of B and T lymphocyte activation." J Rheumatol **30**(5): 918-25.
- Ducoroy, P., O. Micheau, S. Perruche, L. Dubrez-Daloz, D. de Fornel, P. Dutartre, P. Saas and E. Solary (2003). "LF 15-0195 immunosuppressive agent enhances activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level." Blood **101**(1): 194-201.
- Duguid, J. R. and M. C. Dinauer (1990). "Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection." Nucleic Acids Res **18**(9): 2789-92.
- Dujardin, H. C., O. Burlen-Defranoux, L. Boucontet, P. Vieira, A. Cumano and A. Bandeira (2004). "Regulatory potential and control of Foxp3 expression in newborn CD4+ T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14473-8.
- Duplan, V., P. Dutartre, P. Druet and A. Saoudi (2002). "The immunosuppressant LF 15-0195 prevents experimental autoimmune myasthenia gravis in Brown-Norway rats." Transplant Proc **34**(7): 2962-5.
- Duplan, V., P. Dutartre, P. Druet and A. Saoudi (2002). "LF 15-0195 prevents from the development and inhibits the progression of rat experimental autoimmune myasthenia gravis." J Neuroimmunol **129**(1-2): 115-24.
- Duplan, V., P. Dutartre, L. T. Mars, R. S. Liblau, P. Druet and A. Saoudi (2003). "LF 15-0195 inhibits the development of rat central nervous system autoimmunity by inducing long-lasting tolerance in autoreactive CD4 T cells." J Immunol **170**(4): 2179-85.
- Duplan, V., A. Stennevin, K. Ipinazar, P. Druet, P. Dutartre and A. Saoudi (2002). "Beneficial effect of the immunosuppressant LF 15-0195 on passively induced rat experimental autoimmune encephalomyelitis." Transplant Proc **34**(7): 2966-9.
- Dupuy, F. P., E. Mouly, M. Mesel-Lemoine, C. Morel, J. Abriol, M. Cherai, C. Baillou, D. Negre, F. L. Cosset, D. Klatzmann and F. M. Lemoine (2005). "Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters." J Gene Med **7**(9): 1158-71.
- Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg and C. Mauri (2004). "Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy." J Exp Med **200**(3): 277-85.
- Elsner, A., A. I. Doseff, M. Duncan, M. Kotur and M. D. Wewers (2004). "IL-16 is constitutively present in peripheral blood monocytes and spontaneously released during apoptosis." J Immunol **172**(12): 7721-5.
- Evans, S. J., N. A. Datson, M. Kabbaj, R. C. Thompson, E. Vreugdenhil, E. R. De Kloet, S. J. Watson and H. Akil (2002). "Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. Serial Analysis of Gene Expression." Eur J Neurosci **16**(3): 409-13.

- Esch, F. S., S. Shimasaki, M. Mercado, K. Cooksey, N. Ling, S. Ying, N. Ueno and R. Guillemin (1987). "Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad." Mol Endocrinol **1**(11): 849-55.
- Fadok, V. A., P. P. McDonald, D. L. Bratton and P. M. Henson (1998). "Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells." Biochem Soc Trans **26**(4): 653-6.
- Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle and M. F. Neurath (2004). "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7." J Immunol **172**(9): 5149-53.
- Faustman, D., P. Lacy, J. Davie and V. Hauptfeld (1982). "Prevention of allograft rejection by immunization with donor blood depleted of Ia-bearing cells." Science **217**(4555): 157-8.
- Fava, R. A., N. J. Olsen, A. E. Postlethwaite, K. N. Broadley, J. M. Davidson, L. B. Nanney, C. Lucas and A. S. Townes (1991). "Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia." J Exp Med **173**(5): 1121-32.
- Fischer, K., S. Voelkl, J. Heymann, G. K. Przybylski, K. Mondal, M. Laumer, L. Kunz-Schughart, C. A. Schmidt, R. Andreesen and A. Mackensen (2005). "Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells." Blood **105**(7): 2828-35.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-6.
- Foti, M., D. P. Lew, J. L. Carpentier and K. H. Krause (1995). "CD4 in nonlymphocytic cells: more than an HIV receptor?" J Lab Clin Med **126**(3): 233-9.
- Foussat, A., F. Cottrez, V. Brun, N. Fournier, J. P. Breittmayer and H. Groux (2003). "A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation." J Immunol **171**(10): 5018-26.
- Frauwirth, K. A. and C. B. Thompson (2002). "Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation." J Clin Invest **109**(3): 295-9.
- Fu, S., N. Zhang, A. C. Yopp, D. Chen, M. Mao, H. Zhang, Y. Ding and J. S. Bromberg (2004). "TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors." Am J Transplant **4**(10): 1614-27.
- Fuchimoto, Y., C. A. Huang, K. Yamada, A. Shimizu, H. Kitamura, R. B. Colvin, V. Ferrara, M. C. Murphy, M. Sykes, M. White-Scharf, D. M. Neville, Jr. and D. H. Sachs (2000). "Mixed chimerism and tolerance without whole body irradiation in a large animal model." J Clin Invest **105**(12): 1779-89.
- Gagne, K., S. Brouard, M. Guillet, M. C. Cuturi and J. P. Souilillou (2001). "TGF-beta1 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**(10): 3111-20.
- Game, D. S. and R. I. Lechler (2002). "Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance." Transpl Immunol **10**(2-3): 101-8.

- Garboczi, D. N., P. Ghosh, U. Utz, Q. R. Fan, W. E. Biddison and D. C. Wiley (1996). "Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2." Nature **384**(6605): 134-41.
- Garcia, K. C., M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton and I. A. Wilson (1996). "An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex." Science **274**(5285): 209-19.
- Gavin, M. A., S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos and A. Rudensky (2002). "Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo." Nat Immunol **3**(1): 33-41.
- Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.
- Germain, R. N. and A. G. Rinker, Jr. (1993). "Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules." Nature **363**(6431): 725-8.
- Geserick, P., F. Kaiser, U. Klemm, S. H. Kaufmann and J. Zerrahn (2004). "Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif." Int Immunol **16**(10): 1535-48.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.
- Gill, T. J., 3rd, H. W. Kunz, D. N. Misra and A. L. Hassett (1987). "The major histocompatibility complex of the rat." Transplantation **43**(6): 773-85.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2002). "Transforming growth factor-beta in T-cell biology." Nat Rev Immunol **2**(1): 46-53.
- Goss, J. A., Y. Nakafusa, S. Yu and M. W. Flye (1993). "Intrathymic injection of donor alloantigens induces specific tolerance to cardiac allografts." Transplantation **56**(1): 166-73.
- Graca, L., S. P. Cobbold and H. Waldmann (2002). "Identification of regulatory T cells in tolerated allografts." J Exp Med **195**(12): 1641-6.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**(5425): 221-7.
- Green, D. R., N. Droin and M. Pinkoski (2003). "Activation-induced cell death in T cells." Immunol Rev **193**: 70-81.
- Groothuis, T. A., A. C. Griekspoor, J. J. Neijssen, C. A. Herberts and J. J. Neefjes (2005). "MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery." Immunol Rev **207**: 60-76.
- Groothuis, T. A. and J. Neefjes (2005). "The many roads to cross-presentation." J Exp Med **202**(10): 1313-8.
- Groux, H. (2003). "Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses." Transplantation **75**(9 Suppl): 8S-12S.

- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
- Gunther, E. and L. Walter (2001). "The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*)." Immunogenetics **53**(7): 520-42.
- Hall, B. M., M. E. Jelbart, K. E. Gurley and S. E. Dorsch (1985). "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. Mediation of specific suppression by T helper/inducer cells." J Exp Med **162**(5): 1683-94.
- Hamano, K., M. Ohmi, K. Esato and T. Fukumoto (1989). "Effect of donor specific transfusion (DST) is restricted to the rat combination used and closely related with alloantibody in heart transplantation." Immunol Cell Biol **67 (Pt 5)**: 297-302.
- Hambrock, H. O., B. Kaufmann, S. Muller, F. G. Hanisch, K. Nose, M. Paulsson, P. Maurer and U. Hartmann (2004). "Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms." J Biol Chem **279**(12): 11727-35.
- Hammer, G. E., F. Gonzalez, M. Champsaur, D. Cado and N. Shastri (2006). "The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules." Nat Immunol **7**(1): 103-12.
- Hancock, W. W., R. Buelow, M. H. Sayegh and L. A. Turka (1998). "Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes." Nat Med **4**(12): 1392-6.
- Hancock, W. W., M. H. Sayegh, C. A. Kwok, H. L. Weiner and C. B. Carpenter (1993). "Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated allograft rejection by selective intragraft Th2 cell activation." Transplantation **55**(5): 1112-8.
- Hara, E., T. Kato, S. Nakada, S. Sekiya and K. Oda (1991). "Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells." Nucleic Acids Res **19**(25): 7097-104.
- Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie and K. J. Wood (2001). "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." J Immunol **166**(6): 3789-96.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-32.
- Hayette, S., M. Gadoux, S. Martel, S. Bertrand, I. Tigaud, J. P. Magaud and R. Rimokh (1998). "FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders." Oncogene **16**(22): 2949-54.
- Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, G. M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone and J. A. Villadangos (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." Immunol Rev **199**: 9-26.
- Hedrick, S. M., D. I. Cohen, E. A. Nielsen and M. M. Davis (1984). "Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins." Nature **308**(5955): 149-53.

- Heslan, J. M., G. Beriou, J. B. Le Luduec, C. Guillonnet, I. Anegon, J. P. Souillou, M. C. Cuturi and E. Chiffolleau (2005). "Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vbeta7-TCR rearrangements in tolerated allografts." Transplantation **80**(10): 1476-84.
- Hibberd, A. D. and L. J. Scott (1983). "Allogeneic platelets increase the survival of rat renal allografts." Transplantation **35**(6): 622-4.
- Higuchi, M., D. Zeng, J. Shizuru, J. Gworek, S. Dejbakhsh-Jones, M. Taniguchi and S. Strober (2002). "Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion." J Immunol **169**(10): 5564-70.
- Holt, P. G., M. A. Schon-Hegrad and J. Oliver (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.
- Horejsi, V., W. Zhang and B. Schraven (2004). "Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(8): 603-16.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.
- Houbiers, J. G., A. Brand, L. M. van de Wattering, J. Hermans, P. J. Verwey, A. B. Bijnen, P. Pahlplatz, M. Eeftink Schattenkerk, T. Wobbles, J. E. de Vries and et al. (1994). "Randomised controlled trial comparing transfusion of leucocyte-depleted or buffy-coat-depleted blood in surgery for colorectal cancer." Lancet **344**(8922): 573-8.
- Houset, D. and B. Malissen (2003). "What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity?" Trends Immunol **24**(8): 429-37.
- Huang, C. A., Y. Fuchimoto, R. Scheier-Dolberg, M. C. Murphy, D. M. Neville, Jr. and D. H. Sachs (2000). "Stable mixed chimerism and tolerance using a nonmyeloablative preparative regimen in a large-animal model." J Clin Invest **105**(2): 173-81.
- Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins and G. G. MacPherson (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med **191**(3): 435-44.
- Hubank, M. and D. G. Schatz (1994). "Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA." Nucleic Acids Res **22**(25): 5640-8.
- Hunig, T., N. Torres-Nagel, B. Mehling, H. J. Park and T. Herrmann (2001). "Thymic development and repertoire selection: the rat perspective." Immunol Rev **184**: 7-19.
- Iwasawa, H., S. Kondo, D. Ikeda, T. Takeuchi and H. Umezawa (1982). "Synthesis of (-)-15-deoxyspergualin and (-)-spergualin-15-phosphate." J Antibiot (Tokyo) **35**(12): 1665-9.
- Jameson, J., D. Witherden and W. L. Havran (2003). "T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets." Curr Opin Immunol **15**(3): 349-53.
- Janeway, C. A., Jr. and K. Bottomly (1994). "Signals and signs for lymphocyte responses." Cell **76**(2): 275-85.

- Jenkins, A. M. and M. F. Woodruff (1971). "The effect of prior administration of donor strain blood or blood constituents on the survival of cardiac allografts in rats." Transplantation **12**(1): 57-60.
- Jenkins, M. K., P. S. Taylor, S. D. Norton and K. B. Urdahl (1991). "CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells." J Immunol **147**(8): 2461-6.
- Jensen, L. S., M. Hokland and H. J. Nielsen (1996). "A randomized controlled study of the effect of bedside leucocyte depletion on the immunosuppressive effect of whole blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery." Br J Surg **83**(7): 973-7.
- Jensen, P. E. (2005). "Dendritic cells: caspases keep them young." Nat Immunol **6**(10): 968-9.
- Jiang, H. and L. Chess (2004). "An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation." J Clin Invest **114**(9): 1198-208.
- Jiang, S., O. Herrera and R. I. Lechler (2004). "New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **16**(5): 550-7.
- Jin, H., X. Cheng, L. Diatchenko, P. D. Siebert and C. C. Huang (1997). "Differential screening of a subtracted cDNA library: a method to search for genes preferentially expressed in multiple tissues." Biotechniques **23**(6): 1084-6.
- Johnston, I. M., H. J. Spence, J. N. Winnie, L. McGarry, J. K. Vass, L. Meagher, G. Stapleton and B. W. Ozanne (2000). "Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a down-regulated gene, TSC-36, inhibits invasion." Oncogene **19**(47): 5348-58.
- Jonuleit, H. and E. Schmitt (2003). "The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations." J Immunol **171**(12): 6323-7.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." J Exp Med **193**(11): 1285-94.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (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.
- Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Naji and A. J. Caton (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." Nat Immunol **2**(4): 301-6.
- Josien, R., P. Douillard, C. Guillot, M. Muschen, I. Anegon, J. Chetritt, S. Menoret, C. Vignes, J. P. Soulillou and M. C. Cuturi (1998). "A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance." J Clin Invest **102**(11): 1920-6.
- Josien, R., M. Heslan, S. Brouard, J. P. Soulillou and M. C. Cuturi (1998). "Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion." Blood **92**(12): 4539-44.

- Josien, R., M. Muschen, E. Gilbert, P. Douillard, J. M. Heslan, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1998). "Fas ligand, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance." Transplantation **66**(7): 887-93.
- Josien, R., C. Pannetier, P. Douillard, D. Cantarovich, S. Menoret, L. Bugeon, P. Kourilsky, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1995). "Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats." Transplantation **60**(10): 1131-9.
- Josien, R., B. R. Wong, H. L. Li, R. M. Steinman and Y. Choi (1999). "TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells." J Immunol **162**(5): 2562-8.
- Kabelitz, D., T. Pohl and K. Pechhold (1993). "Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes." Immunol Today **14**(7): 338-9.
- Kafatos, F. C., C. W. Jones and A. Efstratiadis (1979). "Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure." Nucleic Acids Res **7**(6): 1541-52.
- Kappes, D. J. and X. He (2005). "CD4-CD8 lineage commitment: an inside view." Nat Immunol **6**(8): 761-6.
- Kari, L., A. Loboda, M. Nebozhyn, A. H. Rook, E. C. Vonderheid, C. Nichols, D. Virok, C. Chang, W. H. Horng, J. Johnston, M. Wysocka, M. K. Showe and L. C. Showe (2003). "Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma." J Exp Med **197**(11): 1477-88.
- Kawabata, D., M. Tanaka, T. Fujii, H. Umehara, Y. Fujita, H. Yoshifuji, T. Mimori and S. Ozaki (2004). "Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis." Arthritis Rheum **50**(2): 660-8.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, R. B. Colvin, J. Powelson, J. Eason, T. Kozlowski, M. Sykes, R. Monroy, M. Tanaka and D. H. Sachs (1995). "Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys." Transplantation **59**(2): 256-62.
- Kawamura, H., H. Kameyama, T. Kosaka, O. Kuwahara, M. Bannai, T. Kawamura, H. Watanabe and T. Abo (2002). "Association of CD8+ natural killer T cells in the liver with neonatal tolerance phenomenon." Transplantation **73**(6): 978-92.
- Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn and A. S. Fauci (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." J Exp Med **163**(5): 1037-50.
- Klein, J. and A. Sato (2000). "The HLA system. First of two parts." N Engl J Med **343**(10): 702-9.
- Kojima, A. and R. T. Prehn (1981). "Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice." Immunogenetics **14**(1-2): 15-27.
- Kojima, A., O. Taguchi and Y. Nishizuka (1980). "Experimental production of possible autoimmune castritis followed by macrocytic anemia in athymic nude mice." Lab Invest **42**(4): 387-95.

- Kojima, A., Y. Tanaka-Kojima, T. Sakakura and Y. Nishizuka (1976). "Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice." Lab Invest **34**(6): 550-7.
- Kolls, J. K. and A. Linden (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." Immunity **21**(4): 467-76.
- Komesli, S., C. Dumas and P. Dutartre (1999). "Analysis of in vivo immunosuppressive and in vitro interaction with constitutive heat shock protein 70 activity of LF08-0299 (Tresperimus) and analogues." Int J Immunopharmacol **21**(5): 349-58.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-95.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, K. R. Balsara, M. Riha, A. E. Gelman, S. H. Popma, W. Y. Szeto, L. A. Turka and B. R. Rosengard (2002). "Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion." J Immunol **169**(11): 6154-61.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, A. E. Gelman, F. H. Engels, S. H. Popma, A. M. Krasinskas, K. R. Balsara, W. Y. Szeto, L. A. Turka and B. R. Rosengard (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.
- Kriegel, M. A., T. Lohmann, C. Gabler, N. Blank, J. R. Kalden and H. M. Lorenz (2004). "Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II." J Exp Med **199**(9): 1285-91.
- Krummel, M. F., M. D. Sjaastad, C. Wulfing and M. M. Davis (2000). "Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition." Science **289**(5483): 1349-52.
- Kurts, C., R. M. Sutherland, G. Davey, M. Li, A. M. Lew, E. Blanas, F. R. Carbone, J. F. Miller and W. R. Heath (1999). "CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12703-7.
- Kyewski, B., J. Derbinski, J. Gotter and L. Klein (2002). "Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye." Trends Immunol **23**(7): 364-71.
- Lafaille, J. J., K. Nagashima, M. Katsuki and S. Tonegawa (1994). "High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice." Cell **78**(3): 399-408.
- Lafyatis, R., E. F. Remmers, A. B. Roberts, D. E. Yocum, M. B. Sporn and R. L. Wilder (1989). "Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids." J Clin Invest **83**(4): 1267-76.
- Larsen, C. P. and T. C. Pearson (1997). "The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance, and tolerance." Curr Opin Immunol **9**(5): 641-7.
- Le Moine, A., M. Goldman and D. Abramowicz (2002). "Multiple pathways to allograft rejection." Transplantation **73**(9): 1373-81.
- Lebreton, L., J. Annat, P. Derrepas, P. Dutartre and P. Renaut (1999). "Structure-immunosuppressive activity relationships of new analogues of 15-deoxyspergualin. 1. Structural modifications of the hydroxyglycine moiety." J Med Chem **42**(2): 277-90.

- Lechler, R., J. G. Chai, F. Marelli-Berg and G. Lombardi (2001). "The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance." Immunology **103**(3): 262-9.
- 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.
- Lechler, R. I., T. Heaton, L. Barber, V. Bal, J. R. Batchelor and G. Lombardi (1992). "Molecular mimicry by major histocompatibility complex molecules and peptides accounts for some alloresponses." Immunol Lett **34**(1): 63-9.
- Lechler, R. I., G. Lombardi, J. R. Batchelor, N. Reinsmoen and F. H. Bach (1990). "The molecular basis of alloreactivity." Immunol Today **11**(3): 83-8.
- Lee, G. K., H. J. Park, M. Macleod, P. Chandler, D. H. Munn and A. L. Mellor (2002). "Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division." Immunology **107**(4): 452-60.
- Lee, K. M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattry, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson and J. A. Bluestone (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." Science **282**(5397): 2263-6.
- Lee, V. W. and J. R. Chapman (2005). "Sirolimus: its role in nephrology." Nephrology (Carlton) **10**(6): 606-14.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, C. Sartirana, A. L. Moschin, M. Battaglia, P. C. Orban and M. G. Roncarolo (2002). "Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells." J Exp Med **196**(10): 1335-46.
- Li, Y., X. C. Li, X. X. Zheng, A. D. Wells, L. A. Turka and T. B. Strom (1999). "Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance." Nat Med **5**(11): 1298-302.
- Liang, P. and A. B. Pardee (1992). "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction." Science **257**(5072): 967-71.
- Libby, P. and J. S. Pober (2001). "Chronic rejection." Immunity **14**(4): 387-97.
- Linsley, P. S. and J. A. Ledbetter (1993). "The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen." Annu Rev Immunol **11**: 191-212.
- Lipshutz, R. J., S. P. Fodor, T. R. Gingeras and D. J. Lockhart (1999). "High density synthetic oligonucleotide arrays." Nat Genet **21**(1 Suppl): 20-4.
- Lisitsyn, N. and M. Wigler (1993). "Cloning the differences between two complex genomes." Science **259**(5097): 946-51.
- Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen and C. C. Goodnow (2003). "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." Nat Immunol **4**(4): 350-4.
- Liu, J., Z. Liu, P. Witkowski, G. Vlad, J. S. Manavalan, L. Scotto, S. Kim-Schulze, R. Cortesini, M. A. Hardy and N. Suci-Foca (2004). "Rat CD8+ FOXP3+ T suppressor cells mediate tolerance to allogeneic heart transplants, inducing PIR-B in APC and rendering the graft invulnerable to rejection." Transpl Immunol **13**(4): 239-47.

- Liu, S., L. Wang, W. Wang, J. Lin, J. Han, H. Sun, H. Guo, R. Sun and Q. Wu (2006). "TSC-36/FRP inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration." Exp Mol Pathol **80**(2): 132-40.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. F. de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler and J. A. Bluestone (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-11.
- Liu, X. and R. Bosselut (2004). "Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo." Nat Immunol **5**(3): 280-8.
- Liu, Z., Y. K. Sun, Y. P. Xi, A. Maffei, E. Reed, P. Harris and N. Suci-Foca (1993). "Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity." J Exp Med **177**(6): 1643-50.
- Liu, Z., S. Tugulea, R. Cortesini and N. Suci-Foca (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." Int Immunol **10**(6): 775-83.
- Louvet, C., E. Chiffolleau, M. Heslan, L. Tesson, J. M. Heslan, R. Brion, G. Beriou, C. Guillonnet, J. Khalife, I. Anegon and M. C. Cuturi (2005). "Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts." Am J Transplant **5**(9): 2143-53.
- Louvet, C., J. M. Heslan, E. Merieau, J. P. Soullillou, M. C. Cuturi and E. Chiffolleau (2004). "Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion." Transplantation **78**(9): 1259-66.
- Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol **23**(9): 445-9.
- Lutz, M. B., R. M. Suri, M. Niimi, A. L. Ogilvie, N. A. Kukutsch, S. Rossner, G. Schuler and J. M. Austyn (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.
- Mackay, I. R. (2000). "Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity." Bmj **321**(7253): 93-6.
- Maddon, P. J., S. M. Molineaux, D. E. Maddon, K. A. Zimmerman, M. Godfrey, F. W. Alt, L. Chess and R. Axel (1987). "Structure and expression of the human and mouse T4 genes." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9155-9.
- Maffei, A. and P. E. Harris (1998). "Peptides bound to major histocompatibility complex molecules." Peptides **19**(1): 179-98.
- Malek, T. R., B. O. Porter, E. K. Codias, P. Scibelli and A. Yu (2000). "Normal lymphoid homeostasis and lack of lethal autoimmunity in mice containing mature T cells with severely impaired IL-2 receptors." J Immunol **164**(6): 2905-14.
- Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli and L. Kong (2002). "CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2." Immunity **17**(2): 167-78.

- Malissen, B. and M. Malissen (1996). "Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation." Curr Opin Immunol **8**(3): 383-93.
- Manavalan, J. S., S. Kim-Schulze, L. Scotto, A. J. Naiyer, G. Vlad, P. C. Colombo, C. Marboe, D. Mancini, R. Cortesini and N. Suci-Foca (2004). "Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity." Int Immunol **16**(8): 1055-68.
- Manilay, J. O., D. A. Pearson, J. J. Sergio, K. G. Swenson and M. Sykes (1998). "Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a nonmyeloablative conditioning regimen." Transplantation **66**(1): 96-102.
- Markmann, J. F., H. Bassiri, N. M. Desai, J. S. Odorico, J. I. Kim, B. H. Koller, O. Smithies and C. F. Barker (1992). "Indefinite survival of MHC class I-deficient murine pancreatic islet allografts." Transplantation **54**(6): 1085-9.
- Marrack, P. and J. Kappler (2004). "Control of T cell viability." Annu Rev Immunol **22**: 765-87.
- Mashimo, J., R. Maniwa, H. Sugino and K. Nose (1997). "Decrease in the expression of a novel TGF beta1-inducible and ras-recision gene, TSC-36, in human cancer cells." Cancer Lett **113**(1-2): 213-9.
- Meagher, L. C., J. S. Savill, A. Baker, R. W. Fuller and C. Haslett (1992). "Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2." J Leukoc Biol **52**(3): 269-73.
- McDermott, D. H., A. M. Fong, Q. Yang, J. M. Sechler, L. A. Cupples, M. N. Merrell, P. W. Wilson, R. B. D'Agostino, C. J. O'Donnell, D. D. Patel and P. M. Murphy (2003). "Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans." J Clin Invest **111**(8): 1241-50.
- McDonald, P. P., V. A. Fadok, D. Bratton and P. M. Henson (1999). "Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells." J Immunol **163**(11): 6164-72.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins and M. C. Byrne (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." Immunity **16**(2): 311-23.
- McKenzie, J. L., M. E. Beard and D. N. Hart (1984). "Depletion of donor kidney dendritic cells prolongs graft survival." Transplant Proc **16**(4): 948-51.
- McPherson, J. D., M. Marra, L. Hillier, R. H. Waterston, A. Chinwalla, J. Wallis, M. Sekhon, K. Wylie, E. R. Mardis, R. K. Wilson, R. Fulton, T. A. Kucaba, C. Wagner-McPherson, W. B. Barbazuk, S. G. Gregory, S. J. Humphray, L. French, R. S. Evans, G. Bethel, A. Whittaker, J. L. Holden, O. T. McCann, A. Dunham, C. Soderlund, C. E. Scott, D. R. Bentley, G. Schuler, H. C. Chen, W. Jang, E. D. Green, J. R. Idol, V. V. Maduro, K. T. Montgomery, E. Lee, A. Miller, S. Emerling, Kucherlapati, R. Gibbs, S. Scherer, J. H. Gorrell, E. Sodergren, K. Clerc-Blankenburg, P. Tabor, S. Naylor, D. Garcia, P. J. de Jong, J. J. Catanese, N. Nowak, K. Osoegawa, S. Qin, L. Rowen, A. Madan, M. Dors, L. Hood, B. Trask, C. Friedman, H. Massa, V. G. Cheung, I. R. Kirsch, T. Reid, R. Yonescu, J. Weissenbach, T. Bruls, R. Heilig, E. Branscomb, A. Olsen, N. Doggett, J. F. Cheng, T. Hawkins, R. M. Myers, J. Shang, L. Ramirez, J. Schmutz, O. Velasquez,

- K. Dixon, N. E. Stone, D. R. Cox, D. Haussler, W. J. Kent, T. Furey, S. Rogic, S. Kennedy, S. Jones, A. Rosenthal, G. Wen, M. Schilhabel, G. Gloeckner, G. Nyakatura, R. Siebert, B. Schlegelberger, J. Korenberg, X. N. Chen, A. Fujiiyama, M. Hattori, A. Toyoda, T. Yada, H. S. Park, Y. Sakaki, N. Shimizu, S. Asakawa, K. Kawasaki, T. Sasaki, A. Shintani, A. Shimizu, K. Shibuya, J. Kudoh, S. Minoshima, J. Ramser, P. Seranski, C. Hoff, A. Poustka, R. Reinhardt and H. Lehrach (2001). "A physical map of the human genome." Nature **409**(6822): 934-41.
- Miller, J., L. Daitch, S. Rath and E. Selsing (1990). "Tissue-specific expression of allogeneic class II MHC molecules induces neither tissue rejection nor clonal inactivation of alloreactive T cells." J Immunol **144**(1): 334-41.
- Min, W. P., D. Zhou, T. E. Ichim, G. H. Strejan, X. Xia, J. Yang, X. Huang, B. Garcia, D. White, P. Dutartre, A. M. Jevnikar and R. Zhong (2003). "Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance." J Immunol **170**(3): 1304-12.
- Min, W. P., D. Zhou, T. E. Ichim, X. Xia, X. Zhang, J. Yang, X. Huang, B. Garcia, P. Dutartre, A. M. Jevnikar, G. H. Strejan and R. Zhong (2003). "Synergistic tolerance induced by LF15-0195 and anti-CD45RB monoclonal antibody through suppressive dendritic cells." Transplantation **75**(8): 1160-5.
- Miossec, C., V. Dutilleul, F. Fassy and A. Diu-Hercend (1997). "Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation." J Biol Chem **272**(21): 13459-62.
- Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine and S. V. Kaveri (2004). "Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells." J Immunol **172**(8): 4676-80.
- Modigliani, Y., A. Coutinho, P. Pereira, N. Le Douarin, V. Thomas-Vaslin, O. Burlen-Defranoux, J. Salaun and A. Bandeira (1996). "Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium." Eur J Immunol **26**(8): 1807-15.
- Modigliani, Y., V. Thomas-Vaslin, A. Bandeira, M. Coltey, N. M. Le Douarin, A. Coutinho and J. Salaun (1995). "Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7555-9.
- Morgan, M. E., J. H. van Bilsen, A. M. Bakker, B. Heemskerk, M. W. Schilham, F. C. Hartgers, B. G. Elferink, L. van der Zanden, R. R. de Vries, T. W. Huizinga, T. H. Ottenhoff and R. E. Toes (2005). "Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans." Hum Immunol **66**(1): 13-20.
- Morris, P. J., A. Ting and J. Stocker (1968). "Leukocyte antigens in renal transplantation. 1. The paradox of blood transfusions in renal transplantation." Med J Aust **2**(24): 1088-90.
- Mosmann, T. R. and S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunol Today **17**(3): 138-46.
- Mues, B., D. Langer, G. Zwadlo and C. Sorg (1989). "Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta." Immunology **67**(3): 303-7.

- Nadler, S. G., M. A. Tepper, B. Schacter and C. E. Mazzucco (1992). "Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the Hsp70 family of heat shock proteins." Science **258**(5081): 484-6.
- Nagamine, K., P. Peterson, H. S. Scott, J. Kudoh, S. Minoshima, M. Heino, K. J. Krohn, M. D. Lalioti, P. E. Mullis, S. E. Antonarakis, K. Kawasaki, S. Asakawa, F. Ito and N. Shimizu (1997). "Positional cloning of the APECED gene." Nat Genet **17**(4): 393-8.
- Nicholas, R. J. and R. J. Scothorne (1969). "Studies on the testis as an 'immunologically privileged' site." J Anat **104**(Pt 1): 194.
- Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka and I. Messaoudi (2004). "The many important facets of T-cell repertoire diversity." Nat Rev Immunol **4**(2): 123-32.
- Okabayashi, K., H. Shoji, Y. Onuma, T. Nakamura, K. Nose, H. Sugino and M. Asashima (1999). "cDNA cloning and distribution of the Xenopus follistatin-related protein." Biochem Biophys Res Commun **254**(1): 42-8.
- Olivares-Villagomez, D., Y. Wang and J. J. Lafaille (1998). "Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **188**(10): 1883-94.
- Ono, K. and E. S. Lindsey (1969). "Improved technique of heart transplantation in rats." J Thorac Cardiovasc Surg **57**(2): 225-9.
- Opelz, G., D. P. Sengar, M. R. Mickey and P. I. Terasaki (1973). "Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants." Transplant Proc **5**(1): 253-9.
- Pae, H. O., G. S. Oh, B. M. Choi, S. C. Chae and H. T. Chung (2003). "Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells." Biochem Biophys Res Commun **306**(3): 701-5.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-41.
- Patel, K., D. J. Connolly, H. Amthor, K. Nose and J. Cooke (1996). "Cloning and early dorsal axial expression of Flik, a chick follistatin-related gene: evidence for involvement in dorsalization/neural induction." Dev Biol **178**(2): 327-42.
- Pease, A. C., D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes and S. P. Fodor (1994). "Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 5022-6.
- Pelletier, R. P., P. K. Hennessy, P. W. Adams, A. M. VanBuskirk, R. M. Ferguson and C. G. Orosz (2002). "Clinical significance of MHC-reactive alloantibodies that develop after kidney or kidney-pancreas transplantation." Am J Transplant **2**(2): 134-41.
- Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara and E. M. Shevach (2002). "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness." J Exp Med **196**(2): 237-46.
- Pierre, P. and I. Mellman (1998). "Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells." Cell **93**(7): 1135-45.

- Plissonnier, D., M. Henaff, P. Poncet, E. Paris, F. Tron, C. Thuillez and J. B. Michel (2000). "Involvement of antibody-dependent apoptosis in graft rejection." Transplantation **69**(12): 2601-8.
- Puertollano, R., P. A. Randazzo, J. F. Presley, L. M. Hartnell and J. S. Bonifacino (2001). "The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN." Cell **105**(1): 93-102.
- Puppi, J., C. Guillonnet, V. Pichard, M. Bellodi-Privato, M. C. Cuturi, I. Anegon and N. Ferry (2004). "Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene." J Hepatol **41**(2): 222-8.
- Qin, S., S. P. Cobbold, H. Pope, J. Elliott, D. Kioussis, J. Davies and H. Waldmann (1993). "'Infectious' transplantation tolerance." Science **259**(5097): 974-7.
- Racusen, L. C., R. B. Colvin, K. Solez, M. J. Mihatsch, P. F. Halloran, P. M. Campbell, M. J. Cecka, J. P. Cosyns, A. J. Demetris, M. C. Fishbein, A. Fogo, P. Furness, I. W. Gibson, D. Glotz, P. Hayry, L. Hunsicker, M. Kashgarian, R. Kerman, A. J. Magil, R. Montgomery, K. Morozumi, V. Nickleit, P. Randhawa, H. Regele, D. Seron, S. Seshan, S. Sund and K. Trpkov (2003). "Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection." Am J Transplant **3**(6): 708-14.
- Racusen, L. C., K. Solez, R. B. Colvin, S. M. Bonsib, M. C. Castro, T. Cavallo, B. P. Croker, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, A. B. Fogo, P. Furness, L. W. Gaber, I. W. Gibson, D. Glotz, J. C. Goldberg, J. Grande, P. F. Halloran, H. E. Hansen, B. Hartley, P. J. Hayry, C. M. Hill, E. O. Hoffman, L. G. Hunsicker, A. S. Lindblad, Y. Yamaguchi and et al. (1999). "The Banff 97 working classification of renal allograft pathology." Kidney Int **55**(2): 713-23.
- Raetz, E. A. and P. J. Moos (2004). "Impact of microarray technology in clinical oncology." Cancer Invest **22**(2): 312-20.
- Rand, T. H., W. W. Cruikshank, D. M. Center and P. F. Weller (1991). "CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration." J Exp Med **173**(6): 1521-8.
- Ranges, G. E., I. S. Figari, T. Espevik and M. A. Palladino, Jr. (1987). "Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **166**(4): 991-8.
- Rebrikov, D. V., O. V. Britanova, N. G. Gurskaya, K. A. Lukyanov, V. S. Tarabykin and S. A. Lukyanov (2000). "Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization." Nucleic Acids Res **28**(20): E90.
- Reinherz, E. L., K. Tan, L. Tang, P. Kern, J. Liu, Y. Xiong, R. E. Hussey, A. Smolyar, B. Hare, R. Zhang, A. Joachimiak, H. C. Chang, G. Wagner and J. Wang (1999). "The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II." Science **286**(5446): 1913-21.
- Reza, J. N. and M. A. Ritter (1998). "Positive and negative selection in the thymus and the thymic paradox." Dev Immunol **5**(3): 161-8.

- Rock, K. L. and L. Shen (2005). "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance." Immunol Rev **207**: 166-83.
- Rock, K. L., I. A. York, T. Saric and A. L. Goldberg (2002). "Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides." Adv Immunol **80**: 1-70.
- Rodgers, J. R. and R. G. Cook (2005). "MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity." Nat Rev Immunol **5**(6): 459-71.
- Rothman, J. E. (1989). "Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells." Cell **59**(4): 591-601.
- Roy-Chaudhury, P., P. W. Nickerson, R. C. Manfro, X. X. Zheng, J. Steiger, Y. S. Li and T. B. Strom (1997). "CTLA4Ig attenuates accelerated rejection (presensitization) in the mouse islet allograft model." Transplantation **64**(1): 172-5.
- Russell, P. S., C. M. Chase and R. B. Colvin (1997). "Alloantibody- and T cell-mediated immunity in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis: lack of progression to sclerotic lesions in B cell-deficient mice." Transplantation **64**(11): 1531-6.
- Russell, P. S., C. M. Chase, H. J. Winn and R. B. Colvin (1994). "Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity." J Immunol **152**(10): 5135-41.
- Sakaguchi, S. (2003). "The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery." J Clin Invest **112**(9): 1310-2.
- 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., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (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.
- Salaun, J., A. Bandeira, I. Khazaal, F. Calman, M. Coltey, A. Coutinho and N. M. Le Douarin (1990). "Thymic epithelium tolerizes for histocompatibility antigens." Science **247**(4949 Pt 1): 1471-4.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone (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., S. Sandner, A. Habicht, C. Mariat, J. Kenny, N. Degauque, X. X. Zheng, T. B. Strom, L. A. Turka and M. H. Sayegh (2006). "Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity." J Immunol **176**(1): 329-34.
- Santambrogio, L., I. Poticchio, S. P. Fessler, S. H. Wong, G. Raposo and J. L. Strominger (2005). "Involvement of caspase-cleaved and intact adaptor protein 1 complex in endosomal remodeling in maturing dendritic cells." Nat Immunol **6**(10): 1020-8.
- Saveanu, L., O. Carroll, Y. Hassainya and P. van Endert (2005). "Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation." Immunol Rev **207**: 42-59.

- Sayegh, M. H. and A. M. Krensky (1996). "Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides." Kidney Int Suppl **53**: S13-20.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**(5235): 467-70.
- Schneyer, A., D. Tortoriello, Y. Sidis, H. Keutmann, T. Matsuzaki and W. Holmes (2001). "Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family." Mol Cell Endocrinol **180**(1-2): 33-8.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." Annu Rev Immunol **21**: 305-34.
- Schwarz, D. A., C. D. Katayama and S. M. Hedrick (1998). "Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development." Immunity **9**(5): 657-68.
- Schweighoffer, F., A. Ait-Ikhlef, A. L. Resink, B. Brinkman, D. Melle-Milovanovic, P. Laurent-Puig, J. Kearsley and L. Bracco (2000). "Qualitative gene profiling: a novel tool in genomics and in pharmacogenomics that deciphers messenger RNA isoforms diversity." Pharmacogenomics **1**(2): 187-97.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher and B. Fazekas de St Groth (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." J Exp Med **203**(7): 1693-700.
- 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**(5): 2577-81.
- Shastri, N., S. Cardinaud, S. R. Schwab, T. Serwold and J. Kunisawa (2005). "All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway." Immunol Rev **207**: 31-41.
- Shawar, S. M., J. M. Vyas, J. R. Rodgers and R. R. Rich (1994). "Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules." Annu Rev Immunol **12**: 839-80.
- Shen, L. and K. L. Rock (2006). "Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules." Curr Opin Immunol **18**(1): 85-91.
- Shibanuma, M., J. Mashimo, A. Mita, T. Kuroki and K. Nose (1993). "Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide." Eur J Biochem **217**(1): 13-9.
- Shirwan, H., A. Mhoyan, E. S. Yolcu, X. Que and S. Ibrahim (2003). "Chronic cardiac allograft rejection in a rat model disparate for one single class I MHC molecule is associated with indirect recognition by CD4(+) T cells." Transpl Immunol **11**(2): 179-85.
- Shirwan, H., G. D. Wu, L. Barwari, A. Liu and D. V. Cramer (1997). "Induction of allograft nonresponsiveness after intrathymic inoculation with donor class I allopeptides. II. Evidence for persistent chronic rejection despite high levels of donor microchimerism." Transplantation **64**(12): 1671-6.

- Smith, C. R., A. Jaramillo, W. Liu, Y. Tu, Z. Kaleem, C. J. Swanson and T. Mohanakumar (2001). "CD4+ T cell recognition of a single discordant HLA-A2-transgenic molecule through the indirect antigen presentation pathway induces acute rejection of murine cardiac allografts." Transplantation **71**(11): 1640-8.
- Smyth, M. J., S. L. Strobl, H. A. Young, J. R. Ortaldo and A. C. Ochoa (1991). "Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta." J Immunol **146**(10): 3289-97.
- Solez, K., R. A. Axelsen, H. Benediktsson, J. F. Burdick, A. H. Cohen, R. B. Colvin, B. P. Croker, D. Droz, M. S. Dunnill, P. F. Halloran and et al. (1993). "International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology." Kidney Int **44**(2): 411-22.
- Solez, K., H. Benediktsson, T. Cavallo, B. Croker, A. J. Demetris, C. Drachenberg, S. Emancipator, P. N. Furness, L. W. Gaber, I. W. Gibson, J. Gough, R. Gupta, P. Halloran, P. Hayry, M. Kashgarian, N. Marcussen, Z. A. Massy, M. J. Mihatsch, K. Morozumi, I. Noronha, S. Olsen, J. Papadimitriou, L. C. Paul, M. Picken, L. C. Racusen and et al. (1996). "Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology." Transplant Proc **28**(1): 441-4.
- Song, X. Y., M. Gu, W. W. Jin, D. M. Klinman and S. M. Wahl (1998). "Plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 suppresses chronic disease in a streptococcal cell wall-induced arthritis model." J Clin Invest **101**(12): 2615-21.
- Soulillou, J. P., F. Blandin, E. Gunther and V. Lemoine (1984). "Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats." Transplantation **38**(1): 63-7.
- Srivastava, P. K., H. Udono, N. E. Blachere and Z. Li (1994). "Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming." Immunogenetics **39**(2): 93-8.
- Steller, H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." Science **267**(5203): 1445-9.
- 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.
- Stephens, L. A., C. Mottet, D. Mason and F. Powrie (2001). "Human CD4(+)/CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro." Eur J Immunol **31**(4): 1247-54.
- Suchin, E. J., P. B. Langmuir, E. Palmer, M. H. Sayegh, A. D. Wells and L. A. Turka (2001). "Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question." J Immunol **166**(2): 973-81.
- Sumitomo, K., A. Kurisaki, N. Yamakawa, K. Tsuchida, E. Shimizu, S. Sone and H. Sugino (2000). "Expression of a TGF-beta1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines." Cancer Lett **155**(1): 37-46.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton and E. M. Shevach (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.

- Suri-Payer, E. and H. Cantor (2001). "Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells." J Autoimmun **16**(2): 115-23.
- Taams, L. S., J. M. van Amelsfort, M. M. Tiemessen, K. M. Jacobs, E. C. de Jong, A. N. Akbar, J. W. Bijlsma and F. P. Lafeber (2005). "Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells." Hum Immunol **66**(3): 222-30.
- Taguchi, O. and Y. Nishizuka (1980). "Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: T cell requirement in adoptive cell transfer." Clin Exp Immunol **42**(2): 324-31.
- Taguchi, O. and Y. Nishizuka (1981). "Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse." Clin Exp Immunol **46**(2): 425-34.
- Takeuchi, T., R. P. Lowry and B. Konieczny (1992). "Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance." Transplantation **53**(6): 1281-94.
- Tanaka, M., S. Ozaki, D. Kawabata, M. Kishimura, F. Osakada, M. Okubo, M. Murakami, K. Nakao and T. Mimori (2003). "Potential preventive effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint destruction and antagonistic modulation of its autoantibodies in rheumatoid arthritis." Int Immunol **15**(1): 71-7.
- Tanaka, M., S. Ozaki, F. Osakada, K. Mori, M. Okubo and K. Nakao (1998). "Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases." Int Immunol **10**(9): 1305-14.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, E. K. Boden, A. J. Tooley, J. Ye, S. K. Subudhi, X. X. Zheng, T. B. Strom and J. A. Bluestone (2003). "Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **171**(7): 3348-52.
- Taylor, P. A., R. J. Noelle and B. R. Blazar (2001). "CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade." J Exp Med **193**(11): 1311-8.
- Tepper, M. A., S. G. Nadler, J. M. Esselstyn and K. G. Sterbenz (1995). "Deoxyspergualin inhibits kappa light chain expression in 70Z/3 pre-B cells by blocking lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation." J Immunol **155**(5): 2427-36.
- Tesch, G. H., P. A. Hill, M. Wei, D. J. Nikolic-Paterson, P. Dutartre and R. C. Atkins (2001). "LF15-0195 prevents the induction and inhibits the progression of rat anti-GBM disease." Kidney Int **60**(4): 1354-65.
- Thomas, C. E., A. Ehrhardt and M. A. Kay (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." Nat Rev Genet **4**(5): 346-58.
- Thornberry, N. A., T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman and D. W. Nicholson (1997). "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis." J Biol Chem **272**(29): 17907-11.
- 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**(11): 6519-23.

- 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.
- Thornton, S., D. Sowers, B. Aronow, D. P. Witte, H. I. Brunner, E. H. Giannini and R. Hirsch (2002). "DNA microarray analysis reveals novel gene expression profiles in collagen-induced arthritis." Clin Immunol **105**(2): 155-68.
- Tochitani, S., F. Liang, A. Watakabe, T. Hashikawa and T. Yamamori (2001). "The occ1 gene is preferentially expressed in the primary visual cortex in an activity-dependent manner: a pattern of gene expression related to the cytoarchitectonic area in adult macaque neocortex." Eur J Neurosci **13**(2): 297-307.
- Tomita, Y., A. Khan and M. Sykes (1994). "Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen." J Immunol **153**(3): 1087-98.
- Towers, P., K. Patel, S. Withington, A. Isaac and J. Cooke (1999). "Flik, a chick follistatin-related gene, functions in gastrular dorsalisation/neural induction and in subsequent maintenance of midline Sonic hedgehog signalling." Dev Biol **214**(2): 298-317.
- Townsend, A., J. Bastin, H. Bodmer, G. Brownlee, J. Davey, F. Gotch, K. Gould, I. Jones, A. McMichael, J. Rothbard and et al. (1989). "Recognition of influenza virus proteins by cytotoxic T lymphocytes." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **323**(1217): 527-33.
- Trzonkowski, P., E. Szmit, J. Mysliwska, A. Dobyszuk and A. Mysliwski (2004). "CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction." Clin Immunol **112**(3): 258-67.
- Tsaknaridis, L., L. Spencer, N. Culbertson, K. Hicks, D. LaTocha, Y. K. Chou, R. H. Whitham, A. Bakke, R. E. Jones, H. Offner, D. N. Bourdette and A. A. Vandenbark (2003). "Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity." J Neurosci Res **74**(2): 296-308.
- Tseng, G. C., M. K. Oh, L. Rohlin, J. C. Liao and W. H. Wong (2001). "Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects." Nucleic Acids Res **29**(12): 2549-57.
- Tsuchida, K., K. Y. Arai, Y. Kuramoto, N. Yamakawa, Y. Hasegawa and H. Sugino (2000). "Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family." J Biol Chem **275**(52): 40788-96.
- Tung, K. S., S. Smith, P. Matzner, K. Kasai, J. Oliver, F. Feuchter and R. E. Anderson (1987). "Murine autoimmune oophoritis, epididymoorchitis, and gastritis induced by day 3 thymectomy. Autoantibodies." Am J Pathol **126**(2): 303-14.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-21.
- Umezawa, H., M. Ishizuka, T. Takeuchi, F. Abe, K. Nemoto, K. Shibuya and T. Nakamura (1985). "Suppression of tissue graft rejection by spargualin." J Antibiot (Tokyo) **38**(2): 283-4.
- Valujskikh, A., O. Lantz, S. Celli, P. Matzinger and P. S. Heeger (2002). "Cross-primed CD8(+) T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway." Nat Immunol **3**(9): 844-51.

- Valujskikh, A., D. Matesic, A. Gilliam, D. Anthony, T. M. Haqqi and P. S. Heeger (1998). "T cells reactive to a single immunodominant self-restricted allopeptide induce skin graft rejection in mice." J Clin Invest **101**(6): 1398-407.
- van de Watering, L. M., J. Hermans, J. G. Houbiers, P. J. van den Broek, H. Bouter, F. Boer, M. S. Harvey, H. A. Huysmans and A. Brand (1998). "Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial." Circulation **97**(6): 562-8.
- Van Kaer, L. (2004). "Natural killer T cells as targets for immunotherapy of autoimmune diseases." Immunol Cell Biol **82**(3): 315-22.
- Vanbuskirk, A., B. L. Crump, E. Margoliash and S. K. Pierce (1989). "A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family." J Exp Med **170**(6): 1799-809.
- Velculescu, V. E., L. Zhang, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1995). "Serial analysis of gene expression." Science **270**(5235): 484-7.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A.

- Xia, A. Zandieh and X. Zhu (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Verhasselt, V., O. Vosters, C. Beuneu, C. Nicaise, P. Stordeur and M. Goldman (2004). "Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells." Eur J Immunol **34**(3): 762-72.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H. L. Weiner and D. A. Hafler (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." J Exp Med **199**(7): 971-9.
- Vignes, C., E. Chiffoleau, P. Douillard, R. Josien, H. Peche, J. M. Heslan, C. Usal, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (2000). "Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8+ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion." J Immunol **165**(1): 96-101.
- Villadangos, J. A., P. Schnorrer and N. S. Wilson (2005). "Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces." Immunol Rev **207**: 191-205.
- 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**(5): 2284-91.
- Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden and I. Girkontaite (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-1.
- Wahl, S. M., J. B. Allen, G. L. Costa, H. L. Wong and J. R. Dasch (1993). "Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta." J Exp Med **177**(1): 225-30.
- Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez and H. Groux (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." Immunity **18**(5): 605-17.
- Walker, L. S., A. Chodos, M. Eggena, H. Dooms and A. K. Abbas (2003). "Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo." J Exp Med **198**(2): 249-58.
- Walsh, P. T., D. K. Taylor and L. A. Turka (2004). "Tregs and transplantation tolerance." J Clin Invest **114**(10): 1398-403.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker and J. A. Bluestone (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." J Exp Med **183**(6): 2541-50.
- Wang, H., K. A. Hosiawa, B. Garcia, J. B. Shum, P. Dutartre, D. J. Kelvin and R. Zhong (2003). "Attenuation of acute xenograft rejection by short-term treatment with LF15-0195 and monoclonal antibody against CD45RB in a rat-to-mouse cardiac transplantation model." Transplantation **75**(9): 1475-81.
- Wang, H., K. A. Hosiawa, B. Garcia, J. B. Shum, P. Dutartre, D. J. Kelvin and R. Zhong (2003). "Treatment with a short course of LF 15-0195 and continuous cyclosporin A attenuates acute xenograft rejection in a rat-to-mouse cardiac transplantation model." Xenotransplantation **10**(4): 325-36.

- Wasowska, B., W. M. Baldwin, 3rd and F. Sanfilippo (1992). "IgG alloantibody responses to donor-specific blood transfusion in different rat strain combinations as a predictor of renal allograft survival." Transplantation **53**(1): 175-80.
- Wasowska, B., W. M. Baldwin, D. N. Howell and F. Sanfilippo (1991). "The effects of donor-specific blood transfusion enhancement of rat renal allografts on cytotoxic activity and phenotypes of peripheral blood lymphocytes, splenocytes, and graft-infiltrating cells." Transplantation **51**(2): 451-9.
- Watanabe, N., Y. H. Wang, H. K. Lee, T. Ito, W. Cao and Y. J. Liu (2005). "Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus." Nature **436**(7054): 1181-5.
- Wekerle, T., M. H. Sayegh, J. Hill, Y. Zhao, A. Chandraker, K. G. Swenson, G. Zhao and M. Sykes (1998). "Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance." J Exp Med **187**(12): 2037-44.
- Wells, A. D., X. C. Li, Y. Li, M. C. Walsh, X. X. Zheng, Z. Wu, G. Nunez, A. Tang, M. Sayegh, W. W. Hancock, T. B. Strom and L. A. Turka (1999). "Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance." Nat Med **5**(11): 1303-7.
- Whitmore, W. F. and R. F. Gittes (1978). "Intratesticular grafts: the testis as an exceptional immunologically privileged site." Trans Am Assoc Genitourin Surg **70**: 76-80.
- Wilson, S. B., S. C. Kent, K. T. Patton, T. Orban, R. A. Jackson, M. Exley, S. Porcelli, D. A. Schatz, M. A. Atkinson, S. P. Balk, J. L. Strominger and D. A. Hafler (1998). "Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes." Nature **391**(6663): 177-81.
- Wing, K., A. Ekmark, H. Karlsson, A. Rudin and E. Suri-Payer (2002). "Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood." Immunology **106**(2): 190-9.
- Wood, K. J., J. Evins and P. J. Morris (1985). "Suppression of renal allograft rejection in the rat by class I antigens on purified erythrocytes." Transplantation **39**(1): 56-62.
- Wood, K. J., A. Hopley, M. J. Dallman and P. J. Morris (1988). "Lack of correlation between the induction of donor class I and class II major histocompatibility complex antigens and graft rejection." Transplantation **45**(4): 759-67.
- Yamada, A., T. M. Laufer, A. J. Gerth, C. M. Chase, R. B. Colvin, P. S. Russell, M. H. Sayegh and H. Auchincloss, Jr. (2003). "Further analysis of the T-cell subsets and pathways of murine cardiac allograft rejection." Am J Transplant **3**(1): 23-7.
- Yang, C. P., E. Shittu, B. McManus, P. J. Wood and E. B. Bell (1998). "Contrasting outcomes of donor-specific blood transfusion: effectiveness against cell-mediated but not antibody-mediated rejection." Transplantation **66**(5): 639-45.
- Yang, H., G. Chen, N. Kanai, J. Shum, B. Garcia, X. Huang, W. Min, Y. Luo, P. Dutartre and R. Zhong (2003). "Monotherapy with LF 15-0195, an analogue of 15-deoxyspergualin, significantly prolongs renal allograft survival in monkeys." Transplantation **75**(8): 1166-71.

- Yoshimura, N., M. Okamoto, K. Akioka and S. Kaihara (2004). "transplantatOptimization of the use of cyclosporine in renal ion." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 181S-185S.
- Young, K. J., L. Yang, M. J. Phillips and L. Zhang (2002). "Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells." Blood **100**(9): 3408-14.
- Yunis, E. J., R. Hong, M. A. Grewe, C. Martinez, E. Cornelius and R. A. Good (1967). "Postthymectomy wasting associated with autoimmune phenomena. I. Antiglobulin-positive anemia in A and C57BL-6 Ks mice." J Exp Med **125**(5): 947-66.
- Zaiss, A. K. and D. A. Muruve (2005). "Immune responses to adeno-associated virus vectors." Curr Gene Ther **5**(3): 323-31.
- Zhang, Z. X., L. Yang, K. J. Young, B. DuTemple and L. Zhang (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, R. J. DiPaolo and E. M. Shevach (2006). "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes." Blood **107**(10): 3925-32.
- Zheng, X. X., Y. Li, X. C. Li, P. Roy-Chaudhury, P. Nickerson, Y. Tian, M. H. Sayegh and T. B. Strom (1999). "Blockade of CD40L/CD40 costimulatory pathway in a DST presensitization model of islet allograft leads to a state of Allo-Ag specific tolerance and permits subsequent engraftment of donor strain islet or heart allografts." Transplant Proc **31**(1-2): 627-8.
- Zhou, D., C. O'Brien, J. Shum, B. Garcia, W. Min, A. M. Jevnikar, P. Dutartre and R. Zhong (2003). "LF 15-0195, a novel immunosuppressive agent prevents rejection and induces operational tolerance in a mouse cardiac allograft model." Transplantation **76**(4): 644-50.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.
- Zwijssen, A., H. Blockx, W. Van Arnhem, J. Willems, L. Fransen, K. Devos, J. Raymackers, A. Van de Voorde and H. Slegers (1994). "Characterization of a rat C6 glioma-secreted follistatin-related protein (FRP). Cloning and sequence of the human homologue." Eur J Biochem **225**(3): 937-46.

RESUME

Recherche et étude de gènes différentiellement exprimés dans des modèles de tolérance à l'allogreffe chez le rat.

Par des méthodes de recherche de gènes différentiellement exprimés, nous avons identifié deux molécules jouant potentiellement un rôle dans les mécanismes de tolérance. Dans un premier modèle basé sur l'administration d'un immunosuppresseur, le LF15-0195, nous avons identifié Schlafen-3 (Slfn3), sur-exprimé dans les LT d'animaux tolérants. Nous montrons que Slfn3 est un marqueur non exclusif des cellules T naturelles régulatrices CD4+CD25+, mais également un marqueur de l'activation des cellules T. Dans un deuxième modèle basé sur l'induction de tolérance par Transfusion Sanguine du Donneur (TSD), nous avons identifié le gène codant pour la molécule Follistatin-Like 1 (FSTL1), sur-exprimée dans les allogreffes tolérées. Nous montrons que FSTL1 est une molécule exprimée par les cellules T CD8+ infiltrant la greffe. La surexpression de FSTL1 à l'aide de vecteurs viraux permet de prolonger significativement la survie de l'allogreffe, suggérant un rôle immunomodulateur de cette molécule.

Mots clés : Allogreffe, Rat, Tolérance, Lymphocytes T

ABSTRACT

Research and study of differentially expressed genes in allograft tolerance models.

Using genes searching methods, we identified two molecules playing a potential role in the tolerance mechanisms. In a first model, based on the administration of an immunosuppressor, LF15-0195, we identified of Schlafen-3 (Slfn3), which is overexpressed in LT of tolerant animals. We showed that Slfn3 is a non exclusive marker of CD4+CD25+ natural regulatory T cells, but is also a marker of T cell activation. In a second model, based on the induction of tolerance by Donor Specific Transfusion (DST), we identified a gene coding for the Follistatin-Like 1 molecule (FSTL1), which is overexpressed in tolerated allografts. We showed that FSTL1 is expressed by T CD8+ graft infiltrating cells. The FSTL1 overexpression using viral vectors have a prolongation effect on allograft survival, suggesting an immunoregulator role of this molecule.

Keywords : Allograft, Rat, Tolerance, T cell