

Université de Nantes
Faculté de Médecine

CARACTERISATION DE NOUVELLES MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA TOLERANCE IMMUNE

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie
Discipline : Médecine
Spécialité : Immunologie

*Présentée
Et soutenue publiquement par*

Thomas CONDAMINE

Le 29 Janvier 2009, devant le jury ci-dessous

<i>Président</i>	M. Ignacio ANEGON, Directeur de recherche, Nantes
<i>Rapporteurs</i>	M. Alain LE MOINE, Docteur, Bruxelles M. Abdelhadi SAOUDI, Directeur de Recherche, Toulouse
<i>Examineur</i>	Mme Sabine SARNACKI, Professeur, Paris
<i>Directeurs de thèse</i>	Mme Maria Cristina CUTURI, Directeur de Recherche, Nantes Mlle Elise CHIFFOLEAU, Chargé de Recherche, Nantes

Unité INSERM 643 – ITERT
Dirigée par le Dr Ignacio Anegon

Liste des abréviations :

ADN	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AICD	"Activation Induced Cell Death"
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BMDC	"Bone-Marrow derived Dendritic Cells"
CD	Cluster de Différenciation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CTLA-4	"Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4"
DC	"Dendritic Cell"
EAE	"Experimental Autoimmun Encephalomyelitis"
Foxp3	"Forkhead box P3"
FSTL1	Follistatin-like 1
HCA112	"Hepatocellular Carcinoma-associated Antigen 112"
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyl Transférase
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
GIC	Graft infiltrating cells
LEW	Lewis
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocytes T
MDSC	"Myeloid Derived Suppressor Cells"
MLR	"Mixed Leucocyte Reaction"
NK	"Natural Killer"
PBL	"Peripheral Blood Lymphocyte"
RT-PCR	Reverse transcription Polymerase Chain Reaction
Slfn3	Schlafen-3
TCR	"T Cell Receptor"
TGF β	"Transforming Growth Factor-beta"
Th	"T helper"
TLR	"Toll-Like receptor"
TNF	"Tumor Necrosis Factor"
TORID	"TOlerance Related and InduceD transcript"
Treg	Cellule T régulatrice
TSD	Transfusion de Sang du Donneur

Sommaire:

INTRODUCTION	8
A- Avant Propos	9
B- Le rejet de greffe.	12
I- Généralités	12
II- La présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).....	14
1- Les cellules dendritiques	14
1.1 <i>La maturation des cellules dendritiques</i>	15
1.2 <i>Le rôle des cellules dendritiques</i>	16
2- La présentation allogénique	18
2.1 <i>La présentation directe</i>	19
2.2 <i>La présentation indirecte</i>	20
2.3 <i>La présentation semi-directe</i>	21
III- La réponse effectrice lors du rejet	22
1- Le rôle des lymphocytes T CD4	22
2- Les cellules effectrices	26
2.1 <i>Les lymphocytes T CD8⁺</i>	26
2.2 <i>Les lymphocytes B</i>	26
2.3 <i>Les cellules NK</i>	27
2.4 <i>Les macrophages</i>	27
C- La tolérance	28
I- La tolérance centrale.....	28
II- La tolérance périphérique	30
1- Les différents types de tolérance.....	30
1.1 <i>La délétion clonale</i>	30
1.2 <i>L'anergie</i>	31
1.3 <i>L'ignorance</i>	31
1.4 <i>La suppression</i>	31
2- Les cellules T régulatrices.....	32
2.1 <i>Les lymphocytes T régulateurs naturelles</i>	32
2.2 <i>Les lymphocytes T régulateurs induits</i>	33
2.3 <i>Les mécanismes de suppression utilisés par les Tregs</i>	35
3- Les cellules myéloïdes régulatrices	39
3.1 <i>Les cellules dendritiques tolérogéniques</i>	39
3.2 <i>Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)</i>	41

D- Recherche de nouvelles molécules impliquées dans la tolérance	
immune	44
RESULTATS & DISCUSSION	45
Partie 1 : CARACTERISATION DE FSTL1 ET TORID, MOLECULES SUREXPRIMEES DANS	
LE MODELE DE TOLERANCE INDUITS PAR TRANSFUSION DE SANG DU DONNEUR.	46
I- Le modèle de tolérance par transfusion de sang du donneur	47
1. Le modèle de greffe	47
2. L'induction de tolérance par transfusion de sang du donneur.....	47
2.1 <i>Infiltrats leucocytaires dans les greffons.</i>	48
2.2 <i>Composants critiques de l'induction de tolérance.</i>	49
II- Caractérisation du rôle de la follistatin-like 1 dans l'induction d'une tolérance	
à une allogreffe cardiaque chez le rat	51
1- La follistatin-like 1.....	51
2- ARTICLE 1: AN IMMUNOMODULATORY ROLE FOR FOLLISTATIN-LIKE 1 IN HEART	
ALLOGRAFT TRANSPLANTATION.....	54
3- Discussion et perspectives :	66
III- Caractérisation du rôle de TORID dans la réponse immune et dans l'induction	
de tolérance	72
1- La molécule TORID / Tmem176b.....	72
2- Résultats obtenus et discussion	75
2.1 <i>Détermination des molécules pouvant interagir avec TORID</i>	75
2.2 <i>Etude de l'expression de TORID et HCA 112 chez la souris</i>	78
2.3 <i>Etude de la régulation et de la fonction de TORID.</i>	79
2.4 <i>Etude de l'expression, de la régulation et de la fonction de TORID dans les</i>	
<i>MDSC</i>	83
IV- Intégration des nouveaux résultats dans le modèle de TSD	91
Partie 2 : CARACTERISATION DE SLFN3 SUREXPRIMEES DANS LE MODELE DE	
TOLERANCE INDUITS PAR ADMINISTRATION DE LF15-0195	94
I- Le modèle de tolérance induit par traitement au LF15-0195	95
II- Caractérisation de l'expression et de la régulation de Schlafen-3	97
1- La famille de molécules, Schlafen	97

2- ARTICLE 2: CHARACTERIZATION OF SCHLAFEN-3 EXPRESSION IN EFFECTOR AND REGULATORY T CELLS.....	99
3- Discussion et perspectives.....	131
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	136
ANNEXE	138
BIBLIOGRAPHIE	150

Liste des figures :

FIGURE 1 : MATURATION TERMINALE DES DC PAR L'INTERMEDIAIRE DE CHIMIOKINES.....	16
FIGURE 2 : LES CELLULES DENDRITIQUES MATURES ET IMMATURES ONT DES FONCTIONS DIFFERENTES.	17
FIGURE 3 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS MODES DE PRESENTATION ALLOGENIQUES.....	19
FIGURE 4 : DIFFERENTES VOIES DE DIFFERENTIATION DES LYMPHOCYTES T CD4⁺ NAÏFS.....	23
FIGURE 5 : LE ROLE DES LYMPHOCYTES T CD4⁺ DANS LE REJET AIGU.	25
FIGURE 6 : LES MECANISMES DE TOLERANCE PERIPHERIQUE.....	30
FIGURE 7 : LES DIFFERENTS MECANISMES DE SUPPRESSION DES TREGS.....	38
FIGURE 8 : LES DIFFERENTS MECANISMES POUVANT CONFERER DES PROPRIETES TOLEROGENES AUX DCs.	41
FIGURE 9 : MODELE DE GREFFE ET D'INDUCTION DE TOLERANCE PAR TSD.....	47
FIGURE 10 : LOCALISATION CHROMOSOMIQUE ET STRUCTURE DU TRANSCRIT CODANT POUR FSTL1.....	51
FIGURE 11 : REPOSE DES CELLULES SPLENIQUES ISSUES DE RECEVEURS TRAITES AVEC L'ADENOVIRUS FSTL1.....	69
FIGURE 12 : PRODUCTION DE CYTOKINES DANS LA RATE DES RECEVEURS TRAITES AVEC L'ADENOVIRUS FSTL1.....	70
FIGURE 13 : MODELE HYPOTHETIQUE D'ACTION DE FSTL1 DANS LES GREFFONS CARDIAQUES TRAITES PAR TSD.....	71
FIGURE 14 : LOCALISATION CHROMOSOMIQUE ET STRUCTURE DU TRANSCRIT CODANT POUR TORID CHEZ LA SOURIS.....	72
FIGURE 15 : DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE TORID SUITE A LA MATURATION DES CELLULES MYELOÏDES CHEZ LE RAT.....	73
FIGURE 16 : LA SUREXPRESSION DE TORID BLOQUE LES CELLULES DENDRITIQUES DANS UN ETAT IMMATURE.....	74
FIGURE 17 : REPRESENTATION DU SYSTEME DE DOUBLE HYBRIDE.....	75
FIGURE 18 : TEST DE DEPENDANCE A TORID DES DIFFERENTS CLONES ISSUS DU CRIBLAGE DE LA LIBRAIRIE PAR LA TECHNIQUE DE DOUBLE HYBRIDE.....	77
FIGURE 19 : EXPRESSION DE TORID (TMEM176B) ET HCA 112 (TMEM176A) DANS DES CELLULES IMMUNITAIRE NAIVES CHEZ LA SOURIS.....	78
FIGURE 20 : REGULATION DE L'EXPRESSION DE TORID (TMEM176B) ET HCA112 (TMEM176A) DANS LES CELLULES DENDRITIQUES CHEZ LA SOURIS.....	80
FIGURE 21 : CONSTRUCTION UTILISE POUR LA GENERATION DES SOURIS KO-TORID.	81
FIGURE 22 : REPOSE IMMUNE DES ANIMAUX DEFICIENTS POUR TORID VIS-A-VIS D'UNE IMMUNISATION A L'AIDE D'UNE PROTEINE EXOGENES.....	81
FIGURE 23 : PHENOTYPE, SECRETION D'IL12P70 ET CAPACITE STIMULATRICE DES BMDCS DERIVEES DES ANIMAUX DEFICIENTS POUR TORID.	83
FIGURE 24 : EXPRESSION DE TORID PAR LES MDSC.....	85
FIGURE 25 : MODELE HYPOTHETIQUE D'INTERACTION DE TORID AVEC LES ENZYMES IMMUNOSUPPRESSIVES DANS LES MDSC.....	87
FIGURE 26 : SURVIE DES GREFFES DE PEAUX CHEZ DES ANIMAUX DEFICIENTS POUR TORID.	88
FIGURE 26 : ACTIVITE SUPPRESSIVE DES MDSC DERIVEES D'ANIMAUX KO POUR TORID.....	89

FIGURE 27 : CROISSANCE TUMORALE DANS DEUX MODELES DE TUMEURS TRANSPLANTABLE INJECTES A DES SOURIS DEFICIENTES POUR TORID.	90
FIGURE 28 : MODELE HYPOTHETIQUE DES MECANISMES D'INDUCTION DE TOLERANCE A L'ALLOGREFFE PAR TSD.	93
FIGURE 29 : REPRESENTATION SCHEMATIQUES DES DIFFERENTS MEMBRES DE LA FAMILLE SCHLAFEN.	97
FIGURE 30 : LOCALISATION CHROMOSOMIQUE ET STRUCTURE DU TRANSCRIPT CODANT POUR SLFN3.	98
FIGURE 30 : EXPRESSION DE SLFN3 DANS LES CELLULES DENDRITIQUES CHEZ LE RAT.	133
FIGURE 31 : EXPRESSION ET LOCALISATION PROTEÏQUE DE SLFN3 DANS DES BMDCs.	134
FIGURE 32 : EXPRESSION DE SLFN3 DANS L'APPAREIL DE GOLGI DANS DES BMDCs AU REPOS.	134

INTRODUCTION

A- Avant Propos

La transplantation d'organes dans le but de remplacer des organes vitaux défaillants est actuellement un traitement de choix dans de nombreuses pathologies humaines touchant différents organes comme les reins, le cœur, les poumons, le foie ou le pancréas. Depuis plus de cinquante ans, l'essentiel des échecs restait attribué à la survenue du rejet du greffon par le système immunitaire de l'hôte et ce malgré un acte chirurgical parfaitement maîtrisé. Chirurgiens et immunologistes se sont attachés à réduire l'intensité de cette réaction en utilisant des drogues immunosuppressives ou des préparations d'anticorps dirigés contre les cellules immunitaires. A l'heure actuelle, l'inhibition non spécifique de l'ensemble du système immunitaire par l'intermédiaire de drogues immunosuppressives reste la seule façon de diminuer l'incidence du rejet de greffe. Le grand succès de ces traitements sur la survie des allogreffes se heurte pourtant à de graves problèmes. Outre leur toxicité propre, les drogues provoquent des effets secondaires tels que des infections opportunistes virales, bactériennes, ou fongiques, et surtout des cancers viro-induits dont l'incidence est significativement augmentée après transplantation d'organe (Dantal and Souillou 2005). Ces effets sont directement consécutifs à l'absence de spécificité de l'immunosuppression. De plus, le patient doit le plus souvent garder une administration à vie de ces drogues puisqu'un arrêt ou une diminution trop brutale pourrait conduire le système immunitaire à recouvrer ses capacités d'induction du rejet. Par ailleurs, même si ces traitements immunosuppresseurs ont permis de maîtriser le rejet aigu des greffons, ils ne préviennent pas le développement du rejet chronique dont l'incidence ne diminue pas (Libby and Pober 2001). Le rejet chronique est d'un processus lent mesuré en mois voire en années dont l'origine est mal connue et qui se manifeste par une détérioration fonctionnelle progressive du tissu greffé. Enfin, la pénurie d'organe qui fait suite au succès grandissant de la transplantation réduit de façon drastique le choix et la disponibilité des greffons. Dès lors, chaque organe devenant très précieux, leur fonctionnalité et leur acceptation par le receveur doivent être maintenues le plus longtemps possible.

Afin de trouver une alternative à ces traitements immunosuppresseurs, l'étude des mécanismes d'induction d'une tolérance en allotransplantation reste un axe de recherche majeur en transplantation d'organes. La tolérance immunologique se définit comme une absence de réaction vis à vis de certains antigènes (Les allo-antigènes dans le cas d'une greffe), en l'absence d'immunosuppression, alors que la réponse immunitaire est maintenue contre les autres antigènes. Cet état idéal d'*immunosuppression spécifique du donneur* a été atteint dans de nombreux modèles animaux d'allogreffe mais n'a été atteint chez l'homme que dans très peu de cas. Cependant, une récente étude publiée par T. Kawai et

collaborateurs a montré qu'une greffe rénale couplée à une greffe de moelle et un traitement immunosuppresseur (traitement arrêté 1 an après la greffe), a permis d'induire une tolérance spécifique du greffon chez 4 des 5 patients traités (Kawai et al. 2008). Plusieurs groupes ont d'ailleurs aussi décrit des états de tolérance chez des patients suite à l'arrêt des traitements immunosuppresseurs (Ashton-Chess et al. 2007; Alexander et al. 2008; Scandling et al. 2008). Dans la plupart de ces études, les auteurs ont pu observer l'établissement, dans certains cas seulement temporaire, d'un chimérisme des cellules hématopoiétiques (Alexander et al. 2008; Kawai et al. 2008; Scandling et al. 2008). Dans les expériences princeps de Medawar, Brent et Billingham sur des souriceaux, l'injection d'allo-antigènes durant la période néonatale permettait d'induire une tolérance spécifique à une allogreffe de peau (Billingham et al. 1953). L'exposition préalable à la greffe aux allo-antigènes du donneur, dont l'importance était alors déjà suggérée, a permis l'émergence de modèles de tolérance aux allogreffes. Ainsi, chez l'animal adulte, une ou plusieurs transfusions de sang spécifiques du donneur (TSD) avant la greffe, dans certaines souches de souris et de rats (Fabre and Morris 1972; Soullou et al. 1984) et chez certains gros animaux (chien, singes) (Halasz et al. 1964; van Es et al. 1977), peuvent induire une tolérance à une allogreffe ultérieure, cardiaque, rénale ou cutanée. Au cours des années 70, l'observation inattendue de l'effet positif des transfusions sanguines sur la survie des greffons rénaux chez l'homme a contribué au développement d'une politique de transfusions délibérées dans les centres de transplantation. Néanmoins, l'apparition en 1983 de la Ciclosporine A, un immunosuppresseur puissant, ainsi que les risques permanents de transmission d'agents infectieux (VIH, Hépatite C) et de sensibilisation ont entraîné l'abandon progressif de cette approche. Les mécanismes immunologiques qui sont responsables de cet effet transfusionnel restent à ce jour mal compris. L'étude des modèles animaux peut ainsi permettre de les élucider.

L'objectif de cette thèse est d'**identifier et de caractériser de nouvelles molécules jouant un rôle dans le processus de tolérance à une allogreffe chez l'animal adulte**. Une partie de mon travail a tout d'abord consisté en l'étude de la fonction de deux molécules que notre équipe a identifiées comme étant surexprimées lors de l'induction de tolérance par transfusion de sang du donneur chez le rat : la Follistatin-Like 1 (FSTL1) et la molécule TORID (TOLerance Related and Induced transcript). Enfin, la dernière partie de ce travail a consisté en l'étude de l'expression et de la régulation de la molécule Schlafen 3 (Slfn3) que nous avons identifiée comme fortement exprimée par les cellules lymphocytaires T régulatrices.

L'introduction de ce travail sera consacrée à l'exposé des mécanismes de rejet d'allogreffe et d'induction de tolérance chez l'animal adulte. Cette introduction se conclura par la description du modèle de tolérance chez le rat sur lequel ce travail a porté et par l'exposé des connaissances précédemment obtenues dans l'équipe sur les molécules identifiées comme surexprimées dans ce modèle. Le chapitre Résultats consistera dans une première partie en l'étude du rôle de FSTL1 dans le processus d'induction de tolérance. La seconde partie portera sur l'étude de l'expression et de la fonction de la molécule TORID dans le système immunitaire et plus particulièrement dans la biologie des cellules dendritiques. Ensuite la troisième partie consistera en l'étude de l'expression et de la régulation de la molécule Slfn3 dans les cellules lymphocytaires T. Ces parties réuniront à chaque fois une description du modèle animal, une description des résultats antérieurs obtenus dans notre modèle, les résultats de l'étude de la molécule présentés (Pour FSTL1 et SLFN3, sous la forme d'articles), et des résultats additionnels accompagnés d'une discussion.

B- Le rejet de greffe.

I- Généralités

La transplantation d'organes ou de cellules permet, à l'heure actuelle, de traiter de nombreuses pathologies humaines en remplaçant l'organe défaillant (le cœur, le poumon, le foie, le rein...). Suivant le contexte génétique du donneur et du receveur, le degré de la réponse immunitaire varie. Dans le cas d'une greffe syngénique, Le donneur et le receveur sont génétiquement identiques, le système immunitaire du receveur ne reconnaîtra pas le greffon comme étranger et la greffe sera donc acceptée. Chez l'homme, cette situation existe sous 2 formes :

- Les autogreffes qui correspondent au transfert d'un tissu du receveur d'un point de l'organisme à un autre
- les isogreffes qui correspondent à une greffe de tissu ou de cellules entre deux jumeaux génétiquement identiques.

Le type de greffe le plus fréquent chez l'homme est l'allogreffe qui correspond à une greffe entre deux individus d'une même espèce mais génétiquement différents. En l'absence de traitements lors de ce type de greffes, le système immunitaire du receveur reconnaîtra le greffon comme étranger à l'organisme et s'emploiera à le détruire. Le dernier type de greffes est la xéno greffe qui correspond à une greffe entre deux individus d'espèces différentes (par exemple une greffe de tissus porcine chez un homme). Ce dernier type de greffe engendre une réponse très forte et immédiate du système immunitaire du receveur du fait de la grande disparité génétique entre le donneur et le receveur.

Un des rôles majeurs du système immunitaire est de distinguer le "soi" qui doit rester toléré, du "non-soi" qui doit être reconnu et éliminé (Janeway 1992). Dans le contexte d'une allogreffe, le donneur et le receveur diffèrent entre autres pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'importance de ces molécules dans le contexte de la transplantation a été largement décrite tout au long des découvertes sur l'immunologie du rejet de greffe. Le complexe majeur d'histocompatibilité (HLA, H-2 et RT-1 chez l'homme, la souris et le rat respectivement) se compose en trois groupes. Les molécules du CMH de classe I sont exprimées de façon ubiquitaire à des degrés variés et ont pour rôle de présenter des peptides endogènes aux cellules lymphocytaires T CD8⁺. D'autres part, les molécules du CMH de classe II ont, elles, une expression restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et présentent des peptides exogènes aux cellules lymphocytaires T CD4⁺. Une troisième classe de CMH dit "non-classique" a été identifiée et les molécules de cette classe présentent des fonctions immunologiques importantes (composants du système du complément, molécules impliquées dans l'inflammation...) mais

contrairement aux molécules du CMH dite "classique" n'interviennent pas dans la présentation des antigènes aux cellules lymphocytaires T. En ce qui concerne la xénotransplantation, l'obstacle majeur reste la présence d'anticorps naturels préformés anti-donneurs. En effet, l'homme exprime des anticorps naturels dirigés contre un motif saccharidique (Gal α 1-3 Gal β 1-4 Glc Nac, épitope gal) présent chez tous les mammifères (Galili 1993).

La réponse immune vis à vis de la greffe entraîne un rejet qui peut être de trois types : Le rejet hyper aigu, le rejet aigu et le rejet chronique. Les mécanismes variés par lesquels l'allogreffe est rejetée dépendent notamment du statut du immunitaire du receveur. En effet, le système immunitaire peut contourner l'inhibition d'une de ses facettes en développant d'autres voies menant au rejet.

Le rejet hyper aigu : Il apparaît dans les minutes ou les heures suivant la greffe et résulte de la présence d'anticorps préformés du receveur, spécifiques des molécules du système ABO ou du CMH du donneur. Ces anticorps vont se fixer très rapidement sur les cellules endothéliales du greffon et induire la lyse de ce dernier par l'intermédiaire de la voie classique du complément. Ce type de rejet a été totalement maîtrisé en allogreffes par les tests de cross-matching (optimisation de la compatibilité du CMH entre le donneur et le receveur), précédant une transplantation, mais surviennent toujours dans le cas de xéno-greffes du fait de la présence des anticorps naturels anti-Gal (Sandrin and McKenzie 1994). Dans ce type de rejet, seul la réponse humorale intervient.

Le rejet aigu : Il survient dans les premiers jours suivant la greffe et résulte d'une réponse cellulaire principalement due aux lymphocytes T. Ces lymphocytes peuvent reconnaître les alloantigènes présentés par les CPA du donneur ou par celles du receveur. Ces différentes voies de présentation correspondent respectivement à la présentation directe et indirecte (Lechler and Batchelor 1982) que nous détaillerons plus tard. . Néanmoins, la composante humorale peut aussi être importante (Sayegh and Colvin 2003). En effet, il a été montré chez la souris que les anticorps spécifiques des Ags du donneur pouvaient jouer un rôle dans le rejet d'allogreffe (Brandle et al. 1998), ainsi que le complément (Pratt et al. 2002). Le rejet aigu fait aussi intervenir d'autres types cellulaires que les cellules T comme les macrophages ou les cellules NK. Nous détaillerons plus tard leur part respective dans le processus de rejet.

Le rejet chronique : Il ne se manifeste que dans les années suivant la greffe et consiste en une perte fonctionnelle progressive du greffon. Il est notamment associé à une artériosclérose des vaisseaux sanguins du greffon et une fibrose du parenchyme (Libby and Pober 2001; Vadivel et al. 2007). Les mécanismes immunologiques ou non, impliqués dans ce type de rejet, sont à l'heure actuelle, encore mal connus. Les traitements immunosuppresseurs actuels sont capables de bloquer le rejet aigu mais pas le rejet

chronique. Ce dernier est alors l'une des causes majeures de la perte du greffon 5 à 10 ans après la transplantation.

II- La présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

La réponse immune menant au rejet du greffon est principalement due à l'existence chez les mammifères de gènes polymorphiques largement exprimés par les cellules de l'organisme (Krensky et al. 1990). Si le donneur et le receveur diffèrent pour l'un de ces loci, la protéine codée par l'allèle différent sera reconnue comme étrangère, et une réponse T se développera. Les gènes polymorphiques les plus importants se trouvent dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), appelé HLA, H2 ou RT1 respectivement chez l'homme, la souris ou le rat. La compatibilité des molécules du CMH représentent alors l'un des facteurs les plus importants pour le succès de la greffe, même si cela ne suffit pas à prévenir complètement le rejet en raison de l'expression d'autres polymorphismes génétiques (Ags mineurs d'histocompatibilité). La réponse immune est alors absente seulement si le donneur et le receveur sont des vrais jumeaux.

Les CPA, et plus particulièrement les cellules dendritiques, ont pour fonction la capture des antigènes, leur dégradation et leur chargement sur les molécules du CMH. Ces fonctions sont classiquement regroupées sous le terme de présentation antigénique.

1- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des régulateurs clés du devenir de la réponse immunitaire, capables à la fois d'induire ou d'inhiber les réponses T selon les circonstances. Cette caractéristique des cellules dendritiques est liée à leur aptitude à intégrer de nombreux signaux, et à diriger ensuite une réponse T appropriée. Le rôle des cellules dendritiques a été longtemps considéré uniquement du point de vue de l'activation du système immunitaire. Cependant, il apparaît dorénavant clairement que les cellules dendritiques peuvent également induire non pas l'immunité, mais la tolérance envers les antigènes qu'elles présentent.

Les cellules dendritiques sont capables d'initier à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative (Banchereau et al. 2000; Lanzavecchia and Sallusto 2001; Mellman and Steinman 2001). Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes très puissantes, qui, en plus de leur aptitude à stimuler des réponses immunitaires secondaires, possèdent la capacité unique d'induire des réponses immunitaires primaires. Les précurseurs immatures des cellules dendritiques présents dans la moelle osseuse circulent dans le sang pour atteindre les tissus cibles, et prennent résidence sur ces sites potentiels d'entrée de pathogènes.

Dans les tissus, les cellules dendritiques sont présentes dans un état physiologique immature spécialisé pour la capture des antigènes (Steinman 1991). Après capture de l'antigène par phagocytose, par macropinocytose, ou par endocytose (Sallusto et al. 1995; Albert et al. 1998; Guermonprez et al. 2002), les antigènes sont découpés en peptides et présentés sur les molécules du CMH.

Après avoir reçu des signaux de maturation, soit directement par des pathogènes ou par l'intermédiaire de stimuli inflammatoires, les cellules dendritiques modifient leur expression de récepteurs de chimiokines (en particulier, augmentation de l'expression de CCR7), ce qui leur permet de quitter les tissus périphériques pour migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (Randolph et al. 2008). Une fois dans les zones T des organes lymphoïdes, les cellules dendritiques peuvent induire l'activation et la prolifération des cellules T CD8⁺ et de cellules T CD4⁺, via la présentation des peptides sur les molécules du CMH de classe I et de classe II, respectivement. En sus de leur rôle dans la protection contre les pathogènes, les cellules dendritiques ont également un rôle centrale dans les réponses immunitaires anti-tumorales (Palucka et al. 2007; Dhodapkar et al. 2008).

1.1 La maturation des cellules dendritiques

In vivo, la maturation des cellules dendritiques est étroitement liée à leur migration des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques drainants. Cette maturation est associée à de nombreux événements coordonnés incluant la perte des récepteurs d'endocytose et/ou de phagocytose, des changements dans l'expression des récepteurs de chimiokines, la sécrétion de cytokines polarisant la réponse T et l'augmentation de l'expression des molécules de CMH et des molécules de costimulation, telles que CD40, CD80 et CD86 (B7.1 et B7.2 respectivement). Lors d'infections, la maturation des cellules dendritiques est induite généralement via les récepteurs "Toll-like" (TLR), les récepteurs "NOD-like" (NLR) ou bien certaines molécules de la famille des lectines de type-C. Les récepteurs TLR reconnaissent des motifs associés aux pathogènes, tels que les peptidoglycans (TLR2), l'ARN double brin (TLR3), le lipopolysaccharide (LPS) (TLR4), la flagelline (TLR5), l'ARN bactérien (TLR7/8) ou l'ADN bactérien (TLR9) (Medzhitov 2001) et certaines molécules endogènes sécrétées lors de l'inflammation (ADN, ARNm, Heat shock protein...) (Rifkin et al. 2005). L'activation des cellules dendritiques est aussi induite par des cytokines proinflammatoires, et en particulier par des membres de la superfamille du TNF, comme le TNF- α , CD40L ou Trance (Cella et al. 1996; Koch et al. 1996; Bachmann et al. 1999; Wong et al. 1999). Récemment, il a été montré que des signaux via les récepteurs de chimiokines pouvaient également induire la maturation des cellules dendritiques, tels que des ligands de CCR1 (Trifilo and Lane 2004), de CCR5 (Aliberti et al. 2000; Aliberti et al. 2003) ou de CCR7 (Marsland et al. 2005). Plus récemment, il a été proposé par certains auteurs le schéma

d'évolution suivante : les chimiokines conduisent à la maturation finale des cellules dendritiques pendant leur migration après la maturation initiale induite par les ligands de TLR (Figure 1).

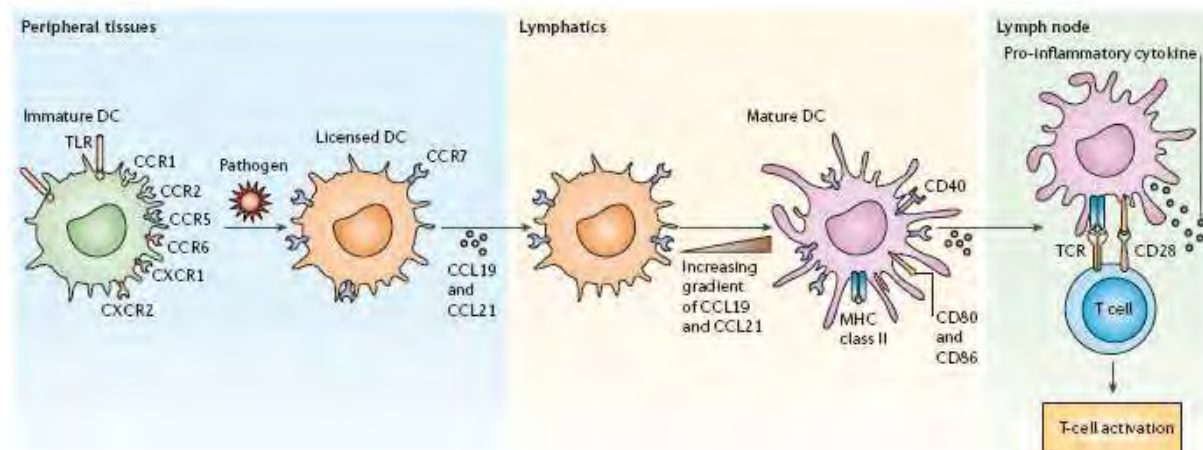


Figure 1 : Maturation terminale des DC par l'intermédiaire de chimiokines. D'après Bachmann et Al. (Bachmann et al. 2006).

1.2 Le rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques matures et immatures ont des fonctions différentes. Les cellules dendritiques immatures induisent la tolérance (Figure 2a). Les cellules dendritiques des tissus testent continuellement leur environnement, captent des antigènes et migrent en petite quantité vers les ganglions lymphatiques drainants. En l'absence d'inflammation, les cellules dendritiques restent dans un état immature, et les antigènes sont présentés aux cellules T dans les ganglions en l'absence de costimulation, ce qui induit soit la délétion des cellules T, soit la génération de cellules Treg induites. Nous détaillerons plus loin dans notre exposé les propriétés tolérogéniques de ces cellules. Les cellules dendritiques matures induisent l'immunité (Figure 2b). Cependant, la corrélation cellules immatures / fonction tolérogène et cellules matures / fonction immunogène n'est pas totalement exacte. A l'appui de cette remarque, il a été montré que certaines cellules dendritiques matures exprimant l'enzymeIDO avaient des propriétés tolérogéniques (Mellor and Munn 2004). L'inflammation des tissus induit la maturation des cellules dendritiques et leur migration en grande quantité vers les ganglions lymphatiques drainants. Les cellules dendritiques matures expriment à leur surface cellulaire des complexes CMH/peptide et des molécules de costimulation. Cela permet la stimulation des cellules T CD4+ auxiliaires et des cellules T CD8+ cytotoxiques (CTL), l'activation des cellules B et l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques se différencient principalement des autres cellules présentatrices d'antigènes par leur capacité unique à activer un lymphocyte T naïf.

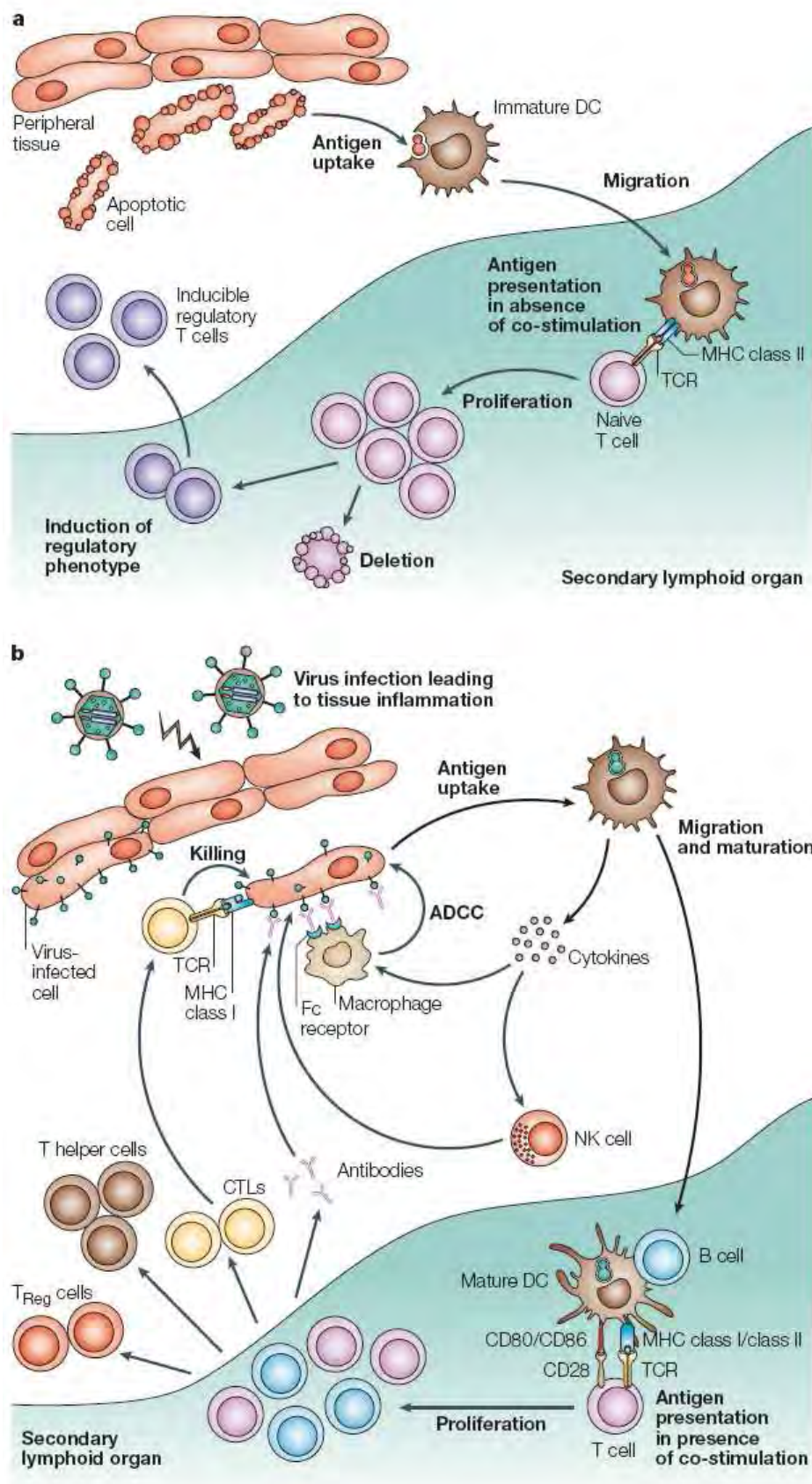


Figure 2 : Les cellules dendritiques matures et immatures ont des fonctions différentes. D'après Banchereau et al. (Banchereau and Palucka 2005).

2- La présentation allogénique

La reconnaissance antigénique fait intervenir deux acteurs : la cellule présentatrice d'antigène et la cellule T. Au niveau moléculaire, cette reconnaissance est basée sur l'interaction entre le complexe formé par un peptide et une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules présentatrices d'antigène et le récepteur des cellules T (TCR). D'une manière générale, les peptides exogènes sont présentés sur les molécules du CMH de classe II aux cellules T CD4+, alors que les peptides endogènes sont présentés sur les molécules du CMH de classe I aux cellules T CD8+. Cependant, les molécules de CMH de classe II peuvent également présenter des peptides endogènes aux cellules T CD4+ (Weiss and Bogen 1991) et les molécules de CMH de classe I peuvent présenter des peptides exogènes aux cellules T CD8+ (Jondal et al. 1996) : ce type de présentation correspond à la "présentation croisée". Les mécanismes permettant à un peptide dérivé d'un antigène exogène d'être apprêté sur les molécules de CMH de classe I ne sont pas encore clairement définis. Il apparaîtrait que les cellules dendritiques et les macrophages (cellules ayant la capacité de réaliser la présentation croisée) présenteraient la capacité d'amener les antigènes exogènes phagocytés dans le réticulum endoplasmique où ils pourront être digérés et chargés sur les molécules du CMH de classe I (Cresswell et al. 2005). Une étude récente propose un nouveau mécanisme impliquant le transfert direct des peptides du cytoplasme d'une cellule au cytoplasme d'une cellule voisine par l'intermédiaire de jonctions membranaires gap (Neijssen et al. 2005; Afzali et al. 2007a; Handel et al. 2007).

Dans le contexte d'une allogreffe, les lymphocytes T du receveur peuvent reconnaître directement les complexes allogéniques CMH/peptide présents à la surface des cellules allogéniques du greffon (présentation directe) (Figure 3a) , mais aussi les peptides allogéniques présentés par les CPA du receveur (présentation indirecte) (figure 3b). Un troisième type de présentation a récemment été décrit et correspond à la présentation de complexe CMH/ peptide du donneur par les CPA du receveur (présentation semi-directe) (figure 3c).

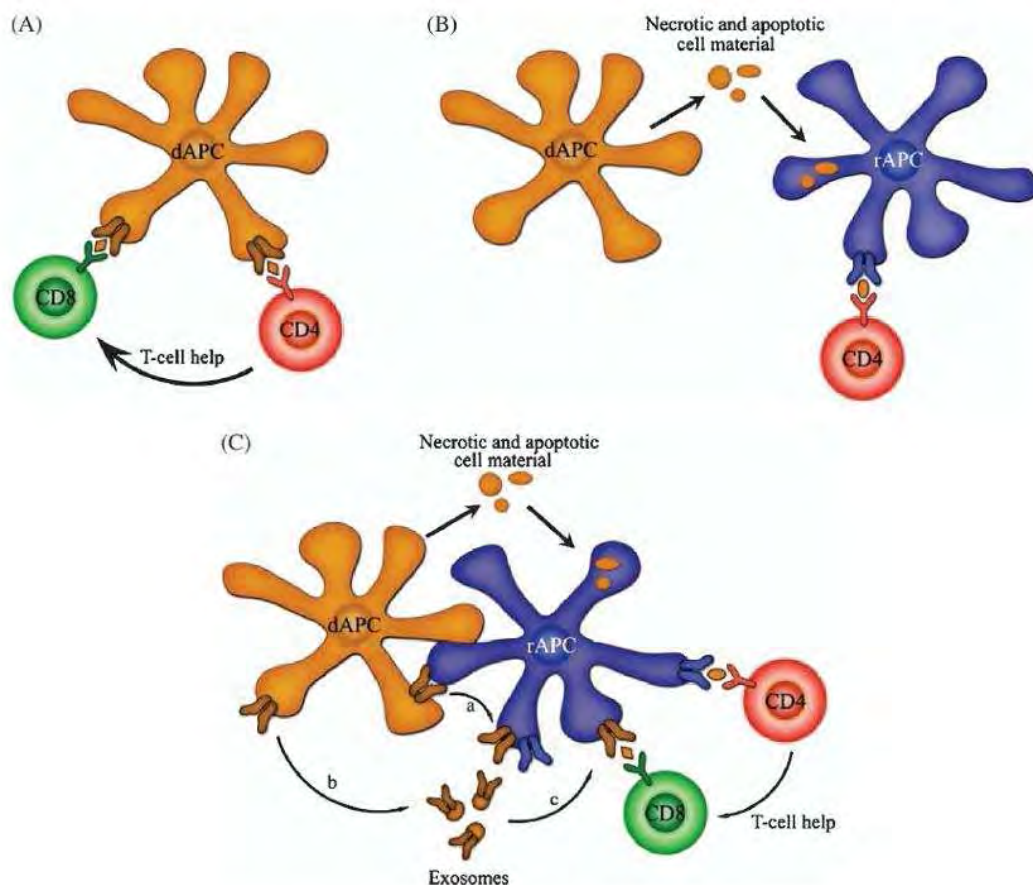


Figure 3 : Représentation des différents modes de présentation allogénique. D'après Afzali et Al. (Afzali et al. 2007a).

2.1 La présentation directe

La cellule T CD8⁺ ou CD4⁺ du receveur peut reconnaître directement la molécule du CMH de classe I ou de classe II allogénique exprimée par une CPA du donneur (Lechler et al. 1990). Les cellules alloréactives peuvent ainsi constituer jusqu'à 20% du pool des lymphocytes T (Lindahl and Wilson 1977; Suchin et al. 2001). 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 collaborateurs ont démontré chez le rat que la transplantation d'un greffon rénal toléré, et ainsi dépourvu de ses leucocytes, à un second receveur non-traité ne conduit pas au rejet de la greffe. La réinjection de cellules dendritiques du donneur induit le rejet ce qui démontre que, dans ce modèle, la réponse directe joue un rôle primordial dans le processus de rejet (Lechler and Batchelor 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 donneurs d'organes déficients en molécules du CMH aboutissent aux mêmes conclusions :

Une allogreffe d'îlots de pancréas issus de souris dépourvues de molécules du CMH de classe I est définitivement acceptée (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). Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris, avec des receveurs dépourvus de lymphocytes T (RAG-1^{-/-}) et de molécules du CMH de classe II, le transfert de lymphocytes T CD4⁺ de souris naïves a été décrit comme étant nécessaire et suffisant pour rejeter le greffon. La réponse indirecte étant inexistante, ces résultats démontrent bien que dans ce modèle, la réponse directe est suffisante pour rejeter la greffe (Pietra et al. 2000).

Matzinger et collaborateurs ont proposé que les complexes CMH allogénique/peptide possédant une structure similaire aux complexes CMH syngénique/peptide sont capables de déclencher l'activation des lymphocytes T par un mécanisme de mimétisme moléculaire (Matzinger and Bevan 1977). Mais les TCR peuvent également directement interagir avec les résidus polymorphes des molécules du CMH allogéniques indépendamment du peptide présenté. Ainsi la force de reconnaissance allogénique dépend des similarités et/ou des différences de séquences entre les molécules du CMH du donneur et celles du receveur au niveau du site de liaison avec le TCR. Lorsque, au niveau du site de liaison avec le TCR, la molécule du CMH allogénique est proche de celle syngénique, le lymphocyte T reconnaît et réagit surtout avec le peptide endogène présenté (liaison peptidique dominante). Par contre, lorsqu'il y a trop de différences entre la molécule du CMH allogénique et celle syngénique, le lymphocyte T va surtout réagir avec le CMH allogénique et ce, indépendamment du peptide présenté (liaison au CMH dominante) (Lechler et al. 1990).

La reconnaissance directe n'est cependant pas l'unique mécanisme qui peut entraîner le rejet d'allogreffe. En effet, la reconnaissance indirecte a été démontrée comme étant suffisante et/ou nécessaire pour initier un rejet dans différents modèles d'allogreffe.

2.2 La présentation indirecte

Les cellules T du receveur peuvent reconnaître les peptides issus des molécules du CMH du donneur présentés par les CPA du receveur (Benichou et al. 1992). Les alloantigènes du donneur sont internalisés et dégradés par les CPA du receveur puis présentés aux lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺ (présentation croisée) sous forme de peptides associés respectivement aux molécules du CMH de classe II et de classe I. La réponse indirecte permet ainsi la coopération des lymphocytes T CD4⁺ avec les lymphocytes B (Steele et al. 1996) et avec les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxique (Lee et al. 1994; Popov et al. 1995).

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. 1998b; 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).

D'autres travaux suggèrent que la réponse indirecte soit responsable de l'installation du rejet chronique (Sayegh and Krensky 1996; Jiang et al. 2004). Valujskikh et al. ont démontré dans un modèle d'allogreffe de peau chez la souris que la reconnaissance d'un seul peptide allogénique présenté dans le contexte du CMH du soi (présentation indirecte) est suffisante pour induire le rejet dont les lésions sont caractéristiques des lésions observées lors d'un rejet chronique (Valujskikh et al. 1998). D'autre part, une étude a démontré que des patients possédant dans leur sang des cellules T activées par présentation indirecte développent de nombreux signes de rejet chronique (Ciubotariu et al. 1998). L'immunisation avec des peptides synthétiques de la chaîne $\alpha 1$ de la molécule du CMH de classe I accélère le rejet d'une allogreffe chez le porc, et est associée au développement d'une vasculopathie importante (atteinte des vaisseaux). Ces travaux démontrent un lien étroit entre la présentation indirecte des peptides du CMH de classe I et le développement de lésions caractéristiques du rejet chronique.

2.3 La présentation semi-directe

Par ailleurs, il a été décrit que la génération de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques avait besoin de lymphocytes T CD4⁺ activés par la même APC pour être efficace (Ridge et al. 1998). Plusieurs études ayant montré que des lymphocytes T CD4⁺ de spécificité indirecte pouvaient amplifier la réponse effectrice de lymphocytes T CD8⁺ de spécificité directe (Lee et al. 1994), l'hypothèse d'un troisième mode de présentation est apparu : La présentation semi-directe. En effet, il a été décrit récemment que les cellules dendritiques ont la capacité d'acquiescer des complexes CMH de classe I et II/peptide provenant d'autres cellules dendritiques ou de cellules endothéliales (Herrera et al. 2004) et d'activer efficacement des lymphocytes T (Thery et al. 2002). Le modèle de présentation semi-directe consiste donc en une présentation simultanée par les cellules dendritiques du donneur de complexes CMH de classe I/peptide à des lymphocytes T CD8⁺ de spécificité directe et de complexes CMH de classe II/peptide à des lymphocytes T CD4⁺ de spécificité indirecte (Jiang et al. 2004).

En résumé, l'implication des trois 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 et al. 1993; Shirwan et al. 1997; Jiang et al. 2004). Cependant, le rôle de la présentation semi-directe dans le processus de rejet reste, à l'heure actuelle, inconnu (Afzali et al. 2007a). Le groupe de R. Lechler a récemment proposé que ce dernier mode de présentation puisse permettre de maintenir la réponse des lymphocytes T de spécificité directe après la disparition des APC du donneur (Gokmen et al. 2008).

III- La réponse effectrice lors du rejet

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. 2002a; Kreisel et al. 2002b). Cependant, les CPA les plus efficaces restent les cellules dendritiques. Dans le cadre d'une allogreffe cardiaque, les cellules dendritiques du donneur vont être activées par les phénomènes d'ischémie / reperfusion, elles vont ensuite rapidement migrer dans la rate et vont rejoindre les zones T ou elles vont principalement interagir avec les lymphocytes T CD4⁺ (Larsen et al. 1990; Le Moine et al. 2002). Les cellules dendritiques du receveur vont migrer dans le transplant sous l'effet combiné des chimiokines sécrétées par le greffon et de l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales du greffon. Les cellules dendritiques du donneur vont alors capturer les alloantigènes et vont recirculer vers les organes lymphoïdes ou elles présenteront les alloantigènes aux lymphocytes T (Lechler et al. 2001b). L'importance des organes lymphoïdes secondaires a d'ailleurs été démontrée puisqu'un receveur dépourvu d'organes lymphoïdes secondaires accepte spontanément une allogreffe (Lakkis et al. 2000).

1- Le rôle des lymphocytes T CD4

Les DCs fournissent deux signaux aux cellules T alloréactives naïves pour initier la cascade de signalisation intracellulaire menant à leur activation (Janeway and Bottomly 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 and Thompson 2002), mais les mieux caractérisées sont B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) qui lient le CD28 (Linsley and Ledbetter 1993). Une fois activée, les cellules T expriment CTLA4 (CD152) qui lie les molécules B7 avec une 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 (CD154) (Larsen and Pearson

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 alloréactives mène à leur production d'IL2 (considérée comme le signal 3) qui favorise leur prolifération et l'amplification du pool alloréactif.

Selon le phénotype des DCs, l'environnement cytokinique, et la reconnaissance TCR/CMH, les précurseurs alloréactifs CD4 (Th0) ont la possibilité de se différencier selon quatre voies : Th1, Th2, Th17 ou iTreg (lymphocytes T régulateurs induit incluant les cellules Th3, Tr1...) (Zhu and Paul 2008) (Figure 4). Cette dernière voie de différenciation sera traitée un peu plus tard dans le chapitre "Tolérance périphérique". 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.

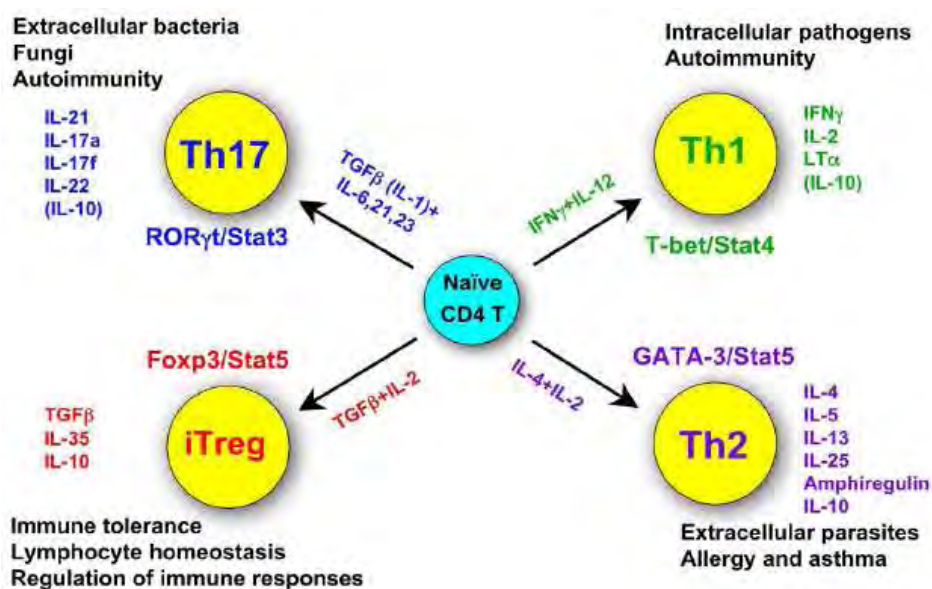


Figure 4 : Différentes voies de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. D'après Zhu et Al. (Zhu and Paul 2008).

Dans l'initiation de la réponse Th1, Les cellules dendritiques activées jouent un rôle primordial. En effet, ces cellules sont responsables de la production d'une importante quantité d'IL12 qui va promouvoir la différenciation de type Th1 en jouant directement sur les cellules NK et les lymphocytes T CD4⁺. Les cellules NK activées vont produire l'interféron-γ (IFNγ) qui va engendrer, de concert avec l'IL12, la différenciation des lymphocytes CD4⁺ vers la voie Th1 (Murphy and Reiner 2002). Ces cellules de type Th1 activées vont alors sécrétées d'importante quantité d'IFNγ, d'interleukine-2 (IL2) et de lymphotoxine-α (LTα). Les cellules CD4⁺ de type Th1 ont été largement décrites comme médiateurs de la réponse

immune dirigée contre des pathogènes intracellulaires (Mosmann and Coffman 1989; Paul and Seder 1994).

La différenciation de type Th2 est induite principalement par deux cytokines : l'IL2 et l'IL4 (Le Gros et al. 1990; Swain et al. 1990). Les cellules CD4⁺ de type Th2 activées vont alors sécréter de nombreuses cytokines dont l'IL4, l'IL5, l'IL9, l'IL10 et l'IL13. Ces cellules jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire vis-à-vis de pathogènes extracellulaires, en agissant sur le "switch" isotypique des immunoglobulines produites par les lymphocytes B, notamment par l'interaction CD40-CD40L (Lumsden et al. 2003), mais aussi en induisant l'activation des éosinophiles.

Le TGF β joue un rôle critique dans la différenciation de type Th17. En présence d'IL6 produite par les cellules de l'immunité innée, le TGF β initie la différenciation de type Th17 et induit la production d'IL21 et l'expression du récepteur à l'IL23 et de ROR γ t (Bettelli et al. 2006; Mangan et al. 2006; Veldhoen et al. 2006). L'IL21 est responsable de l'amplification de la différenciation Th17 mais peut aussi remplacer l'IL6 dans l'initiation de cette différenciation (Korn et al. 2007; Nurieva et al. 2007). Finalement l'IL23, qui avait été proposé initialement comme facteur de différenciation pour les cellules Th17, joue en réalité un rôle dans le maintien de la fonction et de la survie des cellules Th17 différenciées (Veldhoen et al. 2006). Ces cellules CD4⁺ de type Th17 produisent de l'IL17A, de l'IL17F, de l'IL21 et de l'IL22. Il a été démontré que ces cellules jouent un rôle dans la réponse vis-à-vis de bactérie extracellulaire et de champignon (Weaver et al. 2006). Les cellules Th17 jouent aussi un rôle important dans le développement de maladie auto-immunes comme la sclérose en plaque ou la polyarthrite rhumatoïde (Bettelli et al. 2007; Bettelli et al. 2008). Enfin, ces cellules ont aussi été montrés comme jouant un rôle dans le rejet aigu d'allogreffes (Afzali et al. 2007b). En effet, une augmentation de l'expression de l'IL17 a été observée lors de la phase de rejet aigu d'une allogreffe chez l'homme (Loong et al. 2002; Vanaudenaerde et al. 2006) et l'inhibition de l'IL17 (injection d'une molécule de fusion IL17R-immunoglobuline) dans un modèle d'allogreffes cardiaque chez le rat permet de retarder le développement du rejet aigu (Antonysamy et al. 1999).

Très récemment, une nouvelle population de lymphocytes T CD4⁺ a été décrite. En effet, les groupes de V. Kuchroo et B. Stockinger ont décrit une population de cellules T CD4⁺ de type Th9 caractérisés par leur forte production d'IL10 et d'IL9 (Dardalhon et al. 2008; Veldhoen et al. 2008). Ces cellules sont générées en présence de TGF β et d'IL4, cette dernière cytokine bloquant la différenciation en Tregs. Ces cellules ne présentent pas de capacité régulatrice *in vitro* et *in vivo*, malgré leur forte production d'IL10. En effet, l'injection de ces cellules à des souris RAG déficientes induit l'apparition de colite et de neurite montrant leur capacité à promouvoir l'inflammation.

Après leur activation, leur différenciation et leur amplification dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules T CD4⁺ migrent vers le greffon, et produisent des cytokines qui activent différents types cellulaires responsables de la destruction du greffon : activation des macrophages, activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, différenciation des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'anticorps, activation des cellules NK et attraction des leucocytes (Figure 5). De plus, les cellules T CD4⁺ peuvent également exercer une activité cytotoxique par les systèmes perforine/granzyme ou Fas/Fas-L (Appay et al. 2002; van de Berg et al. 2008). Une fois activé, les cellules T CD4⁺ vont produire un grand nombre de cytokines et orienter la réponse immunitaire. Un phénomène de balance va alors se mettre en place entre les différents cellules de type Th1, Th2, Th17, Th9 et les Tregs. Suivant quelles cellules prendront le dessus, effectrices ou régulatrices, le système immunitaire s'orientera vers un rejet du greffon ou une tolérance de ce dernier.

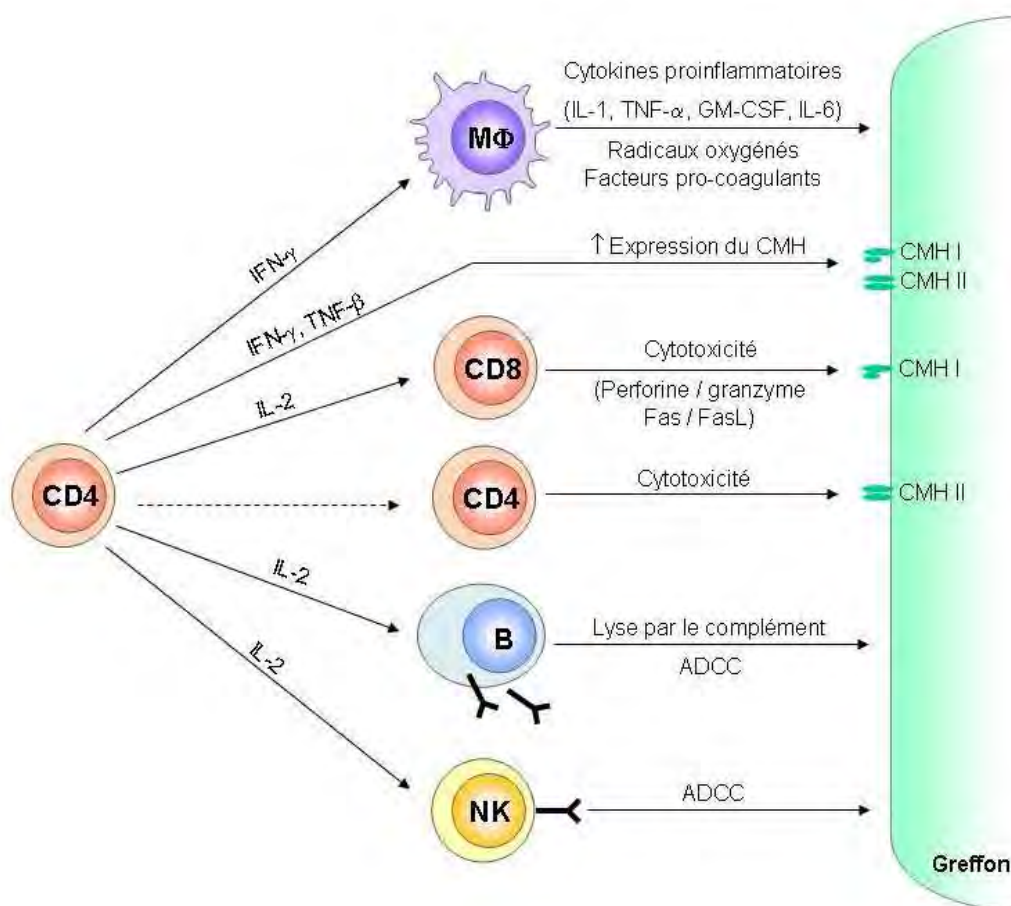


Figure 5 : Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans le rejet aigu.

2- Les cellules effectrices

2.1 Les lymphocytes T CD8⁺

La reconnaissance des alloantigènes présentés sur les molécules de CMH de classe I ainsi que la présence d'IL2 sécrété par les lymphocytes T CD4⁺ activés permet la différenciation et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ en cellules cytotoxiques (Lafferty et al. 1980).

-Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent tuer les cellules cibles par deux voies distinctes : Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent sécréter des granules cytoplasmiques contenant de la perforine et des granzymes. La perforine provoque la formation de pores dans les membranes des cellules cibles permettant aux granzymes d'entrer dans la cellule et induisent la lyse par apoptose des cellules cibles (Kagi et al. 1994; Trapani and Smyth 2002).

- Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent également tuer leurs cibles par le système Fas-Ligand (Fas-L) porté par les lymphocytes T CD8⁺ et Fas porté par les cellules cibles (Kagi et al. 1994).

Certains travaux démontrent une activité cytotoxique importante et une expression importante des granzymes B et des perforines lors de rejet aigu (Lipman et al. 1994). Mais une activité cytotoxique importante a aussi été retrouvée dans des modèles d'induction de tolérance, ce qui démontre qu'elle n'est pas toujours associée au rejet (Armstrong et al. 1987; Dallman et al. 1987; Bugeon et al. 1992; Bugeon et al. 1993; Heslan et al. 2006). De plus, des animaux déficients pour les perforines ou pour Fas sont capables de rejeter une allogreffe (Selvaggi et al. 1996). L'activité cytotoxique n'est donc pas forcément associée et nécessaire au rejet de greffe.

2.2 Les lymphocytes B

Avec l'aide des lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes B vont s'activer et se différencier en cellules productrices d'anticorps anti-donneurs (Parker 1993). Les anticorps produits vont alors se fixer sur les cellules cibles et induire leur lyse suite à l'activation par le complément ou bien par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). La production d'anticorps anti-donneurs est une composante importante lors du processus de rejet (Lordon et al. 1984). En effet, dans un modèle de tolérance à une allogreffe cardiaque par transfusion de sang du donneur, l'injection d'anticorps anti-donneurs issus de receveurs non-traités est suffisante pour rompre la tolérance et entraîner le rejet rapide de la greffe (Cuturi et al. 1994).

2.3 Les cellules NK

Les cellules NK sont des cellules dites « tueuses naturelles ». En effet, la lyse est non spécifique de l'antigène. Ces cellules vont être activées par l'IL2 produit par les lymphocytes T CD4⁺. Les cellules NK ne semblent pas jouer un rôle primordial lors du rejet aigu (Heidecke et al. 1985; Markus et al. 1991; Oertel et al. 2001). Toutefois, ils permettent de renforcer la réponse immunitaire. En effet, les cellules NK du receveur, infiltrant le greffon dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, présentent une plus grande capacité à lyser les cellules du donneur *in vitro* (Petersson et al. 1997). De plus, une autre étude a démontré que l'inhibition des cellules NK associée à un blocage de la molécule de costimulation CD28 permettaient d'induire une tolérance définitive d'une allogreffe cardiaque chez la souris alors que l'inhibition de CD28 seule ne le permettait pas (Maier et al. 2001). Enfin, Les cellules NK jouent un rôle dans la réponse inflammatoire après transplantation, principalement en sécrétant des chimiokines tel que MIP1 α (Kondo et al. 2000). Les cellules NK auraient donc pour rôle d'activer ou d'apporter leur soutien aux cellules effectrices mais leur implication exacte dans le rejet aigu d'allogreffe reste à déterminer (Kitchens et al. 2006). Au contraire, leur rôle est nettement plus clair dans le rejet de xéno greffe (Manilay and Sykes 1998). Les récepteurs inhibiteurs (KIR...) ont en effet moins de chance de reconnaître les molécules du CMH xénogéniques qu'allogéniques.

2.4 Les macrophages

L'IFN γ permet l'activation des macrophages. Les macrophages vont sécréter des cytokines inflammatoires telles que l'IL1, l'IL6, l'IL12, l'IL18, le TNF α , l'IFN γ , des radicaux oxygénés et des facteurs pro-coagulants. Les macrophages sont des cellules effectrices qui jouent un rôle important lors du rejet aigu d'allogreffe (MacPherson and Christmas 1984; Wyburn et al. 2005). Tout d'abord, les macrophages représentent une proportion importante des cellules qui infiltrent la greffe. Dans un modèle d'allogreffe incompatible pour les molécules de CMH de classe I et II chez le rat, les macrophages représentent 60% de l'infiltrat (Josien et al. 1995). Dans un autre modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, les macrophages représentent 53% de l'infiltrat (Hancock et al. 1990). La présence de nombreux macrophages est également retrouvée dans des allogreffes rénales rejetées et a été considérée comme étant un marqueur diagnostique du rejet (Bogman et al. 1989; Ozdemir et al. 2002). Une étude menée sur des biopsies d'allogreffes cardiaques humaines a démontré une corrélation entre l'augmentation du nombre, l'état d'activation des macrophages, et la gravité du rejet (Gassel et al. 1990).

C- La tolérance

La tolérance immunitaire spécifique se définit comme une absence de réaction vis-à-vis de certains antigènes, en l'absence d'immunosuppression, tout en maintenant la réponse immunitaire contre d'autres antigènes. L'induction d'une tolérance immunitaire spécifique serait donc une avancée majeure dans le domaine de la transplantation mais aussi dans le domaine de la thérapie génique pour bloquer la réponse immune vis à vis des vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gènes. La très grande majorité des données actuelles provient de l'étude de modèles animaux, principalement chez les rongeurs, pour lesquels de nombreux protocoles d'induction de tolérance existent.

I- La tolérance centrale

Les lymphocytes T se développent dans le thymus à partir de précurseur provenant de la moelle osseuse. Le réarrangement des gènes de leur TCR se produit lors de ce développement, puis le répertoire lymphocytaire est défini par l'intermédiaire de la sélection positive puis négative. Lors de ces étapes plus de 95% des thymocytes sont éliminés.

La sélection positive permet de conserver les thymocytes capables de reconnaître via leur TCR un peptide associé à une molécule du CMH du soi (Fink and Bevan 1978). Au cours de ce processus, Les cellules épithéliales du cortex thymique présentent aux cellules T des complexes CMH/peptide, et fournissent un signal de survie aux cellules capables d'interagir avec les molécules du CMH du soi (Benoist and Mathis 1989). Les cellules T qui reconnaissent les molécules du CMH du soi de manière trop faible meurent par apoptose dans le cortex.

La sélection négative joue un rôle primordial dans l'établissement de la tolérance aux antigènes du soi en éliminant la plupart des lymphocytes autoréactifs. Cette sélection peut être effectuée par les cellules épithéliales médullaires mais ce sont les cellules dendritiques présentes dans le thymus qui apparaissent comme les principaux acteurs de cette sélection (Anderson et al. 1998). Récemment, il a été montré que le répertoire des peptides du soi présentés dans le thymus est étonnamment large, car incluant aussi des antigènes exclusivement exprimés dans certains tissus comme l'insuline, un antigène spécifique des îlots pancréatiques (Kyewski et al. 2002; Gotter et al. 2004). A l'heure actuelle, seule une molécule, le facteur de transcription AIRE ("Autoimmune regulator"), a été identifiée comme étant responsable d'une dérégulation transcriptionnelle menant à l'expression de nombreux antigènes par les cellules épithéliales de la médulla thymique (Anderson et al. 2002; Liston et al. 2003). Un défaut d'expression du gène *aire* va être responsable de maladies auto-

immunes spécifiques d'organes appelées APECED (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)(Nagamine et al. 1997; Aaltonen and Bjorses 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; 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 permettent 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 est transférable par des cellules régulatrices spécifiques des antigènes des cellules du donneur (Salaun et al. 1990; Modigliani et al. 1995; Modigliani et al. 1996). De même, 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. Une étude a montré chez la souris que des DCs thymiques du donneur injectées en intraveineuse, après la déplétion partielle des cellules T, migraient vers le thymus du receveur et permettaient une prolongation de survie de l'allogreffe (Duncan et al. 2002). Ce résultat suggère alors la possibilité de contrôler la tolérance centrale de façon plus accessible.

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 allo-antigènes.

II- La tolérance périphérique

Quatre mécanismes principaux de tolérance périphérique, mutuellement non exclusifs, ont été décrits : la délétion, l'anergie, l'ignorance immunologique, et la suppression (Figure 6).

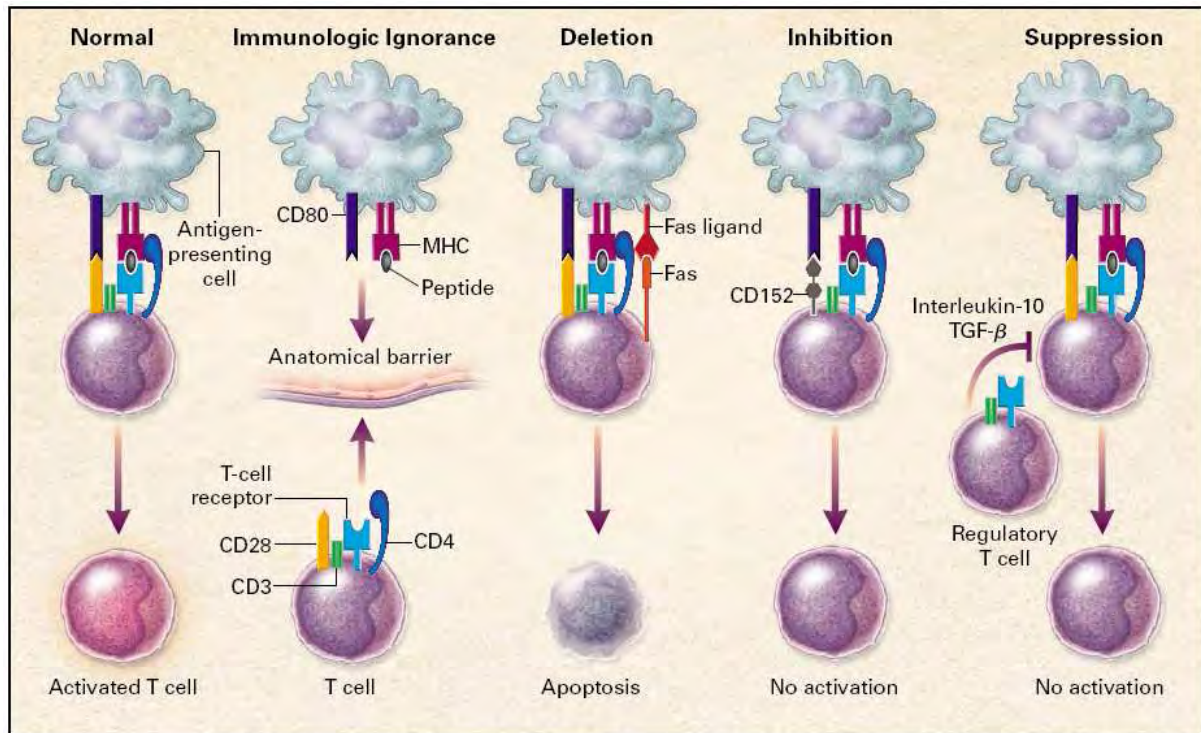


Figure 6 : Les mécanismes de tolérance périphérique. D'après Kamradt et Al. (Kamradt and Mitchison 2001)

1- Les différents types de tolérance

1.1 La délétion clonale

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'IL2 (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).

1.2 L'anergie

L'anergie est un état d'inactivation fonctionnelle de la cellule T, qui devient réfractaire à toute restimulation par l'antigène (Lechler et al. 2001a; Schwartz 2003). Elle peut être induite *in vitro* par une forte stimulation des cellules T via leur TCR en l'absence de second signal de costimulation. L'état anergique se caractérise par une incapacité des cellules T à proliférer et à produire de l'IL2, et il peut être levé par l'addition d'IL2 (Essery et al. 1988). Plus récemment, il a été décrit que de faibles stimulation en présence de costimulation pouvait aussi engendrer un état d'anergie mais uniquement sur des cellules T mémoires (Mirshahidi et al. 2001). Ces cellules anergiques peuvent, de plus, jouer un rôle immunosuppresseur ("Tolérance infectieuse") en inhibant la prolifération de cellules T naïves (Chai et al. 1999) ou en inhibant la capacité des DCs (nécessité de contact) à stimuler des lymphocytes T naïfs (Vendetti et al. 2000; Salcido-Ochoa and Lechler 2002). En transplantation, le rôle fondamental des molécules de costimulation dans la réponse allogénique a été largement prouvé (Turka et al. 1992). En effet, le blocage de l'interaction B7/CD28 par la molécule de fusion CTLA-4-Ig qui se lie fortement à B7 et empêche ainsi le contact avec CD28, permet d'induire une prolongation de la survie d'allogreffe (Levisetti et al. 1997; Olthoff et al. 1998).

1.3 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). Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de ce phénomène d'ignorance. Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris en absence d'organes lymphoïdes secondaires, la rencontre entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques ne se fait pas, ce qui conduit à l'établissement d'une ignorance immunologique et favorise la tolérance à l'allogreffe (Lakkis et al. 2000). De plus, l'ignorance peut résulter de la séquestration de l'antigène dans des sites dits "privilegiés", non accessibles aux cellules T réactives, tels que l'œil ou le système nerveux central (Barker and Billingham 1977) ou d'une absence de présentation par les cellules présentatrices d'antigène. Elle peut aussi être due à une faible concentration des antigènes, qui les rend invisibles aux cellules T (Kurts et al. 1999).

1.4 La 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⁺ dérivant d'animaux tolérants (Hall et al. 1985), fournissant ainsi la première démonstration du caractère actif (ou dominant) 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 des 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). De plus, les cellules dendritiques sont fortement impliquées dans la tolérance et dans l'induction des cellules régulatrices.

2- Les cellules T régulatrices

Le concept de lymphocytes T régulateurs (Treg), capable d'inhiber une réponse immunitaire, est apparu dans les années 1970. Le groupe de Gershon et Kondo a, en effet, montré que certains lymphocytes T, différent des lymphocytes "helpers", pouvaient diminuer l'intensité de la réponse immune (Gershon and Kondo 1970; 1971). De plus, ce concept a été renforcé par des études montrant que le transfert de cellules T était capable de prévenir le développement de maladies auto-immunes, telles que la thyroïdite (Penhale et al. 1976), l'oophorite (Sakaguchi et al. 1982), ou le diabète (Boitard et al. 1989). Cependant, l'incapacité à identifier un marqueur de surface pour ces cellules ou des médiateurs solubles associés à leur fonction a conduit à l'essoufflement des recherches dans ce domaine, et la contestation de l'existence des cellules T suppressives (Green and Webb 1993).

Dans le milieu des années 90, les travaux de Sakaguchi et de ses collaborateurs ont donné un regain d'intérêt à ce concept, en décrivant pour la première fois le phénotype d'une population de cellules T CD4⁺ suppressives, définies par l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL2 (CD25), qui étaient cruciales pour le contrôle des cellules T *in vivo* (Sakaguchi et al. 1995; Asano et al. 1996).

2.1 Les lymphocytes T régulateurs naturelles

Les cellules Treg naturelles, ou "innées" sont présentes de façon naturelle dans les individus sains, et exercent une activité non spécifique d'antigène. Un des problèmes majeurs a été et continue d'être l'identification d'un marqueur spécifique de ces cellules. En plus du CD25 (aussi exprimée par les lymphocytes T activés mais à un niveau moindre), de nombreux marqueurs ont été proposés pour définir cette population de cellules dont entres autres le CD152 (CTLA-4), le CD45RB ou GITR (Wood and Sakaguchi 2003). Plus récemment, Le facteur de transcription Foxp3 (forkhead box P3), un nouveau membre de la

famille des régulateurs transcriptionnels forkhead/winged helix, a été identifié comme un facteur de transcription majeur pour le contrôle du développement et de la fonction des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003a). En effet, l'expression ectopique de Foxp3 dans des cellules CD4⁺CD25⁻ leur confère un phénotype et une activité suppressive. Les souris ou les individus n'exprimant pas ou exprimant une protéine mutée de Foxp3 développent de grave syndrome lymphoprolifératif (syndrome IPEX chez l'homme) (Bennett et al. 2001; Brunkow et al. 2001; Wildin et al. 2001). Cependant, sa localisation intracellulaire ne permet pas son utilisation pour identifier Les Tregs et il a été décrit récemment qu'il pouvait être exprimé par les lymphocytes activés chez l'homme (Morgan et al. 2005; Ziegler 2007). Cependant, Il a été montré que l'utilisation du CD127 couplée au CD25 (CD127^{lo} / CD25^{Hi}) permettait une meilleure discrimination des cellules régulatrices par rapport aux cellules activées (Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006).

Ces cellules sont produites dans le thymus lors de la sélection thymique et représente entre 5 et 10% de la population CD4⁺ totale en périphérie. Ces cellules sont présentes principalement dans les ganglions lymphatiques empêchant le développement de réponses autoimmunes (Samy et al. 2005) et ont la capacité de migrer dans les sites d'inflammation ou au niveau des tumeurs (Belkaid et al. 2002). L'IL2 est essentielle à la prolifération physiologique des cellules CD4⁺CD25⁺ en périphérie. Elle est également requise pour leur activation *in vitro* et *in vivo*, et pour le maintien de l'expression du CD25 et de Foxp3 (Furtado et al. 2002; Thornton et al. 2004; Shevach 2006). Une fois activées par leur TCR, elles sont capables d'inhiber la prolifération et la production de cytokines des cellules T effectrices, et ce de façon non spécifique d'antigène (Thornton and Shevach 2000).

Récemment, une population de cellules Treg a été décrite dans le compartiment CD8⁺ chez le rat (Xystrakis et al. 2004). Ces cellules sont CD45RC^{lo} et leur activité régulatrice a été confirmée *in vivo* dans un modèle de GVHD chez le rat mais aussi dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Guillonnet et al. 2007).

2.2 Les lymphocytes T régulateurs induits

Par opposition aux cellules Treg naturelles, des cellules T dont l'activité régulatrice est induite, ou acquise, ont été identifiées. Ces cellules, appelées Treg induites, sont induites par un antigène, et leur capacité suppressive est spécifique de cet antigène. Parmi les cellules CD4⁺, nous pouvons distinguer trois populations de Treg induites : les cellules CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, les cellules Tr1 productrices d'IL10 (Groux et al. 1997) et les cellules Th3 productrice de TGFβ (Chen et al. 1994; Weiner 2001). Parmi les cellules CD8⁺, les principales cellules, décrites à l'heure actuelle, présentent le phénotype CD8⁺CD28⁻.

a. Les cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Il a été démontré que des cellules régulatrices ayant le même phénotype et les mêmes propriétés que les Tregs naturelles pouvaient être générées en périphérie par différents mécanismes (Shevach 2006). D'une part, de nombreuses études ont montré que le TGFβ pouvait induire la conversion de cellules T CD4⁺CD25⁻ en cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ *in vitro* et *in vivo* (Yamagiwa et al. 2001; Chen et al. 2003b; Fantini et al. 2004). Des études ont suggéré que certains protocoles d'induction de tolérance à une allogreffe *in vivo* pouvaient induire des Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Induction dépendante du TGF) (Cobbold et al. 2004; Ochoa et al. 2006). D'autre part, l'utilisation de peptides agonistes dans des conditions faiblement immunogènes (faible dose et/ou absence de costimulation) peut convertir des cellules T naïves en cellules Treg (Apostolou and von Boehmer 2004). Cette conversion est réalisée dans des conditions permettant d'exclure la possibilité d'une prolifération de cellules Treg préexistantes, ou l'éducation par des cellules T CD25⁻.

b. Les cellules Tr1

Les cellules Tr1 ont été décrites par le groupe de M.G. Roncarolo qui a montré que des cellules T CD4⁺ murines activées en présence d'IL10 se différencient en cellules régulatrices produisant de forts taux d'IL10, capables d'inhiber la colite auto-immune (Groux et al. 1997). Les cellules Tr1 sont caractérisées par un profil de sécrétion de cytokines particulier, différent des profils Th1 et Th2 : les cellules Tr1 produisent de grandes quantités d'IL10, de l'IL5, du TGFβ, de l'IFNγ, et de faibles quantités d'IL4 et d'IL2 (Groux et al. 1997). Il est également possible de générer ces cellules à partir de cellules T CD4⁺ humaines, en utilisant de l'IFNα en combinaison avec l'IL10 (Levings et al. 2001). L'IL10 est une cytokine cruciale pour les cellules Tr1, à la fois pour leur génération et pour leur fonction. L'ajout d'anticorps anti-IL10 bloque l'activité suppressive des cellules Tr1 (Groux et al. 1997).

c. Les Cellules Th3

Les cellules Treg induites Th3 ont été découvertes chez des souris protégées du développement de l'EAE par administration orale de MBP et PLP (Chen et al. 1994). Elles sont caractérisées par leur forte production de TGFβ, leur faible production d'IL10 et d'IL4 et leur absence de sécrétion d'IL2 et d'IFNγ suite à l'engagement de leur TCR (Chen et al. 1994; Fukaura et al. 1996). La différenciation des cellules Th3 est favorisée en présence de TGFβ, IL4 et IL10, et est inhibée par l'IL12 (Weiner 2001). Les cellules Th3 sont capables de réguler les cellules Th1, et favorisent la production d'IgA par les cellules B (Weiner 2001). Plus récemment, le groupe de H. Weiner a démontré que ces cellules avaient la capacité d'induire la différenciation de cellules T en Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Carrier et al. 2007). Des cellules CD8⁺ sécrétant de forte quantité de TGFβ, similaire aux cellules Th3, ont été montrées

comme ayant un rôle très important dans un modèle d'induction de tolérance à une allogreffe cardiaque chez le rat induit par transfusion de sang du donneur (Josien et al. 1998a).

d. Les cellules CD8⁺ CD28⁻

Une population de cellules Treg CD8⁺CD28⁻ spécifiques d'antigène a été décrite chez l'homme par le groupe de N. Suci-Foca. Ces cellules peuvent être générées *in vitro* à partir de cellules du sang (PBMC) stimulées de façon répétées par des cellules présentatrices d'antigène allogéniques (Liu et al. 1998), xénogéniques (Ciubotariu et al. 1998; Colovai et al. 2000), ou syngéniques pulsées avec des peptides synthétiques (Jiang et al. 1998). Des cellules CD8⁺CD28⁻ ont été retrouvées en grande proportion chez des patients greffés rénaux, hépatiques ou cardiaques, ne présentant pas de signe de rejet, par comparaison avec des individus sains (Cortesini et al. 2002; Colovai et al. 2003). Contrairement aux cellules Th3 et Tr1, pour lesquelles l'activité suppressive est fortement dépendante de la production de cytokines suppressives, les cellules T CD8⁺CD28⁻ agissent principalement par contact cellulaire avec la cellule présentatrice d'antigène

2.3 Les mécanismes de suppression utilisés par les Tregs

Le ou les mécanismes moléculaires précis par lequel les cellules régulatrices inhibent l'activation et la prolifération d'autres cellules T est souvent controversé et est actuellement en cours d'investigation. Plusieurs mécanismes ont, à l'heure actuelle, été décrits : Suppression par l'intermédiaire des cytokines, Suppression par interaction entre la cellule régulatrice et les cellules effectrices, Lyse des cellules effectrices par les Tregs et enfin la modulation des APC par les Tregs (Figure 7) (Vignali et al. 2008).

a. Les cytokines immunosuppressives

Les principales cytokines décrites comme ayant des propriétés immunosuppressives (Figure 7a) sont l'IL10 et le TGFβ (Vignali et al. 2008) ainsi que plus récemment l'IL35 qui est nécessaire pour que les Tregs puissent exercer une suppression maximale. De plus, l'IL35 est suffisante pour supprimer la prolifération de lymphocytes T effecteurs (Collison et al. 2007). De façon intéressante, l'IL35 inhibe la différenciation des cellules T CD4⁺ de type Th17 et atténue la sévérité de l'arthrite dans un modèle murin en diminuant la production d'IL17 (Niedbala et al. 2007). Contrairement à ces résultats obtenus chez la souris, une récente étude, chez l'homme, a montré que les Tregs humaines n'exprimeraient pas l'IL35 de façon constitutive (Bardel et al. 2008).

Le rôle de l'IL10 secrété par les Tregs a été montré dans de nombreux modèles de tolérance à une allogreffe ou à différents types de maladies autoimmunes (Asseman et al. 1999; Suri-Payer and Cantor 2001; Kingsley et al. 2002; Hori et al. 2003b). A contrario, Une

récente étude a montré que la délétion spécifique de la production d'IL10 par les Tregs ne provoquait pas l'apparition de maladies auto-immunes systémiques mais résultait en des pathologies du colon et du poumon plus importantes chez la souris. Ces récents résultats laissent penser que l'IL10 secrétée par les Tregs aurait un rôle plus important dans le contrôle des réponses inflammatoires vis-à-vis de pathogènes extracellulaires (Rubtsov et al. 2008). Cependant, cette cytokine a un rôle crucial dans la génération et la fonction des cellules de type Tr1 (Roncarolo et al. 2001). Son rôle dans la suppression médiée par les Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reste encore très controversé.

Tout comme pour l'IL10, la contribution du TGFβ à la suppression par les cellules Treg est controversée. Le rôle du TGFβ dans le contrôle de la colite chez la souris a été fermement établi. En effet, le contrôle de la colite par les cellules CD4⁺CD45RC^{lo} ou CD4⁺CD25⁺ est totalement abrogé lorsque les souris sont traitées avec un anticorps anti-TGFβ (Powrie et al. 1996; Liu et al. 2003). De plus, dans le modèle de protection du diabète chez la souris NOD par traitement avec anti-CD3, un traitement avec un anticorps anti-TGFβ abroge la protection (Belghith et al. 2003). Cependant, ces études ne permettent pas de déterminer si la signalisation par le TGFβ implique les cellules Treg ou les cellules répondeuses. Certaines études ont suggéré que les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ activées exprimaient à leur surface une forme membranaire du TGFβ, et qu'elles pourraient ainsi délivrer du TGFβ aux cellules répondeuses directement par contact cellulaire (Nakamura et al. 2001). A l'inverse, Piccirillo et collaborateurs ont montré que le TGFβ n'était pas requis pour la fonction suppressive *in vitro* (Piccirillo et al. 2002). Cependant, *in vivo*, la signalisation par le TGF-β dans les cellules répondeuses semble être essentielle à leur contrôle par les cellules Treg. Dans un modèle de diabète de type 1 médié par les cellules T CD8⁺ chez la souris, l'expression d'un récepteur au TGFβ fonctionnel sur les cellules CD8⁺ anti-îlots est essentielle au contrôle par les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ (Green et al. 2003b). De même, l'équipe de POWRIE a montré récemment dans le modèle de colite que les cellules effectrices insensibles au TGFβ échappent au contrôle par les Treg CD4⁺CD25⁺ *in vivo* (Fahlen et al. 2005). Dans cette étude, les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ issues de souris déficientes pour le TGFβ sont capables de contrôler la colite, mais la suppression est inhibée par un anticorps anti-TGFβ. Pris collectivement, ces résultats suggèrent que la production de TGFβ par des cellules autres que les Treg (par exemple les cellules présentatrices d'antigène ou les cellules T) semble être impliqué dans la régulation.

En résumé, l'importance de l'IL10 et le TGFβ a été démontré dans la suppression exercée par les cellules Tr1 et Th3 respectivement (Roncarolo et al. 2001; Weiner 2001). Les Tregs naturels ont depuis longtemps été décrits comme exerçant leur fonction suppressive par contact cellulaire et non par l'intermédiaire de l'IL10 et du TGFβ (Takahashi

et al. 1998; Thornton and Shevach 1998). Cependant, un rôle de ces cytokines ne peut être totalement exclu (Vignali et al. 2008).

b. La suppression par contact cellulaire

Certaines études suggèrent que la suppression pourrait être exercée par une interaction directe entre la cellule Treg et la cellule T effectrice (figure 7c), notamment par l'intermédiaire de CTLA-4. La molécule CTLA-4 est connue pour être un important régulateur négatif de la fonction T, mais il a également été impliqué dans les mécanismes d'action des cellules régulatrices. Contrairement aux cellules T naïves, les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ expriment constitutivement la molécule CTLA-4. Le blocage de CTLA-4 par l'administration d'un anticorps anti-CTLA-4 bloquant induit chez la souris naïves des maladies auto-immunes similaires à celles produites lors de la déplétion des cellules T CD4⁺CD25⁺, et ce sans réduire leur nombre (Takahashi et al. 2000). Les ligands de CTLA-4 sont les molécules B7, connues pour être exprimées par les cellules présentatrices d'antigène, mais également par les cellules T activées. Ces molécules sont essentielles pour la suppression exercée par les cellules Treg, car leur absence sur les cellules T effectrices réduit leur susceptibilité à être contrôlées par les cellules CD4⁺CD25⁺ (Paust et al. 2004). Le transfert d'AMP cyclique (second messenger potentiellement inhibiteur) par des jonctions gap représente un autre mécanisme par lequel les Tregs pourraient médier leur suppression (Bopp et al. 2007). Enfin, la déprivation d'IL2 (fortement consommée par les Tregs) jouerait aussi un rôle dans les mécanismes de suppression en induisant l'apoptose des cellules effectrices due à l'absence d'IL2 (Pandiyan et al. 2007).

c. La cytotoxicité des Tregs

Des données récentes suggèrent que l'un des mécanismes d'action des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ pourrait être la lyse des cellules cibles par cytotoxicité (Figure 7b). Plusieurs mécanismes de cytotoxicité ont été impliqués : la voie Fas/FasL (Watanabe et al. 2002) ou la voie granzyme/perforine, certaines études montrant un rôle pour granzyme-A et la perforine (Grossman et al. 2004a; Grossman et al. 2004b), et d'autres étant en faveur d'un mécanisme dépendant de granzyme-B, et indépendant de la perforine (Gondek et al. 2005). En revanche, ni les cellules Treg CD8⁺CD45RC^{lo}, ni les cellules CD8⁺CD28⁻ ne semblent utiliser la cytotoxicité pour exercer leur activité régulatrice (Liu et al. 1998; Xystrakis et al. 2004). Plus récemment, deux autres molécules ont été décrites comme jouant un rôle dans la cytotoxicité médiée par les Tregs, Galectin-1 et TRAIL (Garin et al. 2007; Ren et al. 2007).

d. La modulation des DCs.

En plus de l'effet direct des Tregs sur la fonction des cellules T effectrices, Ces cellules peuvent aussi interagir et moduler la maturation et la fonction des DCs (Figure 7d) (Tadokoro et al. 2006; Tang et al. 2006). Une telle modulation de la cellule dendritique peut impliquer divers mécanismes, tels que la diminution de l'expression des molécules de CMH et de costimulation (Cederbom et al. 2000) ou encore l'induction de molécules inhibitrices tel B7-H4 (Kryczek et al. 2006). L'interaction entre les Tregs et les DCs pourrait être médié par la molécule CTLA-4, qui est constitutivement exprimée par les Tregs. En effet, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-CTLA-4 ou l'utilisation de Tregs déficientes pour CTLA-4 montrent qu'en l'absence de CTLA-4 les Tregs présentent une activité régulatrice via les DCs diminuée (Serra et al. 2003; Oderup et al. 2006). De façon intéressante, il a aussi été montré que l'interaction CTLA-4 / B7 pourrait induire les DCs à exprimer l'enzyme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase), une molécule régulatrice intervenant dans le catabolisme du tryptophane (Fallarino et al. 2003; Mellor and Munn 2004). L'interaction de LAG-3 (exprimé par les Tregs) avec les molécules du CMH de classe II (présents sur les DCs) a récemment été montrée comme pouvant induire le blocage de la maturation des DCs (Liang et al. 2008).

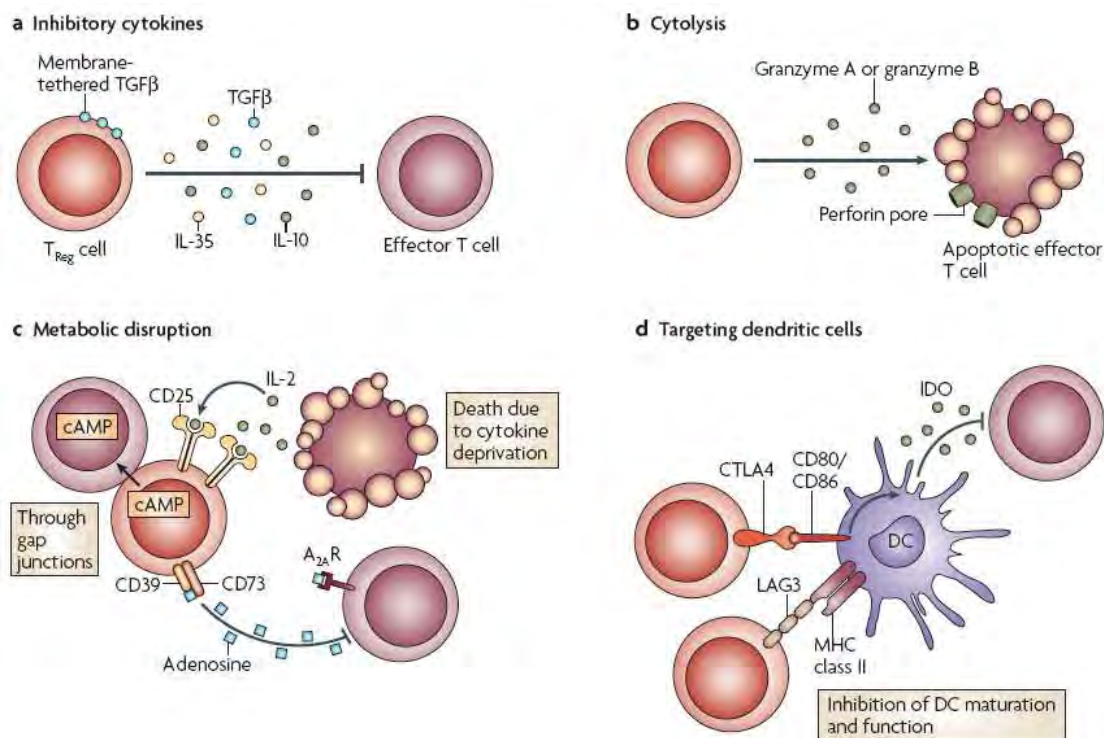


Figure 7 : Les différents mécanismes de suppression des Tregs. D'après Vignali et Al (Vignali et al. 2008).

3- Les cellules myéloïdes régulatrices

Les cellules myéloïdes regroupent plusieurs types de cellules tel que les cellules dendritiques, les monocytes / macrophages, les cellules myéloïdes suppressives... Ces différents types de cellules ont été montrés comme pouvant participer de façon active dans le contrôle de la réponse immune. Cependant, les cellules myéloïdes, ayant été le plus étudiées dans le contrôle de la réponse immune, sont les cellules dendritiques pouvant dans certaines conditions inhiber la réponse immunitaire et non l'initier.

3.1 Les cellules dendritiques tolérogéniques

Les cellules dendritiques sont des régulateurs clés du devenir de la réponse immunitaire, capables à la fois d'induire ou d'inhiber les réponses T selon les circonstances. L'état de maturation des cellules dendritiques n'est pas le seul critère déterminant le devenir de la réponse immunitaire. En effet, la décision d'induire l'immunité ou la tolérance résulte de l'intégration complexe par les cellules dendritiques de différents signaux.

a. la terminologie des DCs tolérogènes

Il a été montré à de nombreuses reprises que les DCs immatures auraient des propriétés tolérogènes et pourraient permettre le contrôle, en périphérie, des lymphocytes T autoréactifs qui ont échappés à la sélection négative lors de leur développement dans le thymus (Steinman and Nussenzweig 2002; Steinman et al. 2003). Un nouveau concept est alors apparu : La fonction des DCs serait dépendante de leur état de maturation. En effet, le groupe de Nussenzweig et Steinman a démontré que des protéines de fusion ciblées vers les cellules dendritiques immatures menaient à l'induction de tolérance spécifique d'antigène (Bonifaz et al. 2002). Cependant, la maturation des DCs ainsi que la forte expression des molécules de co-stimulation a été montrée comme nécessaire pour l'induction de la tolérance dans certains modèles (Albert et al. 2001; Menges et al. 2002). Il a donc été proposé un état de maturation intermédiaire désignant ce nouveau groupe comme "semi-mature", état pouvant être induits par différents stimuli comme le TNF α (Lutz and Schuler 2002; Menges et al. 2002). De plus, les cellules dendritiques matures peuvent également contribuer à la tolérance périphérique en induisant l'expansion clonale de cellules Treg naturelles (Yamazaki et al. 2003). A l'heure actuelle, les marqueurs de maturation ne permettent donc pas de différencier la fonction des DCs et leurs fonctions restent donc le seul moyen de les différencier (Reis e Sousa 2006).

b. Les mécanismes d'actions des DCs tolérogènes

De nombreuses études suggèrent qu'en l'absence de maturation, les DCs capturent des antigènes et migrent continuellement des tissus vers les ganglions sous la forme de

cellules dendritiques immatures ou semi-matures et induisent la tolérance envers ces antigènes en induisant l'anergie ou la délétion clonale des lymphocytes T réactifs (Steinman et al. 2000; Steinman et al. 2003). De plus, l'apport ciblé d'antigènes aux cellules dendritiques conduit à une prolifération des lymphocytes T qui deviennent anergiques à toute restimulation (Bonifaz et al. 2002). L'utilisation de souris transgéniques inducible (transgène exprimée uniquement dans les DCs immatures) a permis d'obtenir les mêmes résultats (Probst et al. 2003). Dans cette étude, les cellules T CD8⁺ spécifique de l'antigène prolifèrent et deviennent anergiques mais uniquement en présence d'anticorps anti-CD40 agoniste.

Les cellules dendritiques peuvent aussi induire la tolérance en induisant la conversion de cellules T naïves ou le maintien et/ou la prolifération de Tregs. Les DCs immatures ont été décrites comme pouvant induire des cellules T régulatrices spécifique de peptides exogènes (Dhodapkar et al. 2001; Dhodapkar and Steinman 2002) ou des Tregs CD4⁺ spécifique d'alloantigènes (Jonuleit et al. 2000; Levings et al. 2005). Un sous-type spécifique de DCs chez la souris a été identifié comme ayant la capacité d'induire des cellules Tr1 (Wakkach et al. 2003). Dans cette étude, Wakkach et al ont montré qu'il était possible de générer à partir de la moelle osseuse des DCs CD11c^{lo} CD45RB⁺, en présence d'IL10 et de TNF α induisant la différenciation de cellules T naïves en lymphocytes Tr1. Les mêmes capacités d'induction de Tregs productrice d'IL10 ont été décrites pour les DCs matures (Verhasselt et al. 2004; Lundqvist et al. 2005). De plus, Yamazaki et al, ainsi que d'autres groupes, ont montré que les DCs matures avaient la capacité d'expandre les Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Yamazaki et al. 2003; Kretschmer et al. 2005; Banerjee et al. 2006). Plus récemment, il a été décrit que les DCs plasmacytoïdes (pDCs) possédaient aussi la capacité d'induire des Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Ochando et al. 2006) ainsi que d'expandre ces cellules in vitro (Ouabed et al. 2008).

Les DCs ont aussi été montrés comme induisant la tolérance via l'expression de l'enzymeIDO (Munn et al. 2002; Mellor and Munn 2004).IDO est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane et a été décrit comme ayant la capacité d'inhiber la réponse des cellules T (Munn et al. 1998). Plus récemment, un nouveau mécanisme d'induction de tolérance périphérique par les DCs a été décrit et implique l'induction de l'expression du CD5 (Hawiger et al. 2004). L'induction de l'expression du CD5 sur des cellules T les conduits à une absence de prolifération en réponse à une restimulation antigéniques.

c. L'induction d'une fonction tolérogène

De nombreux mécanismes peuvent conférer des propriétés tolérogéniques aux DCs (figure 8). L'interaction de DCs avec des Tregs conduits à l'engagement du CTLA-4 porté par

les Tregs avec les molécules B7 porté par les DCs et induit l'expression d'IDO qui leur confère des propriétés tolérogènes (Fallarino et al. 2003; Mellor et al. 2003). Les DCs peuvent aussi être rendu tolérogènes par interaction avec les Tregs CD8+CD28-, qui induit l'expression de récepteurs inhibiteur tels qu'ILT3 ou ILT4 et la diminution de l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 (Chang et al. 2002). Enfin, les DCs peuvent acquérir des propriétés tolérogènes en les cultivant in vitro en présence d'IL10, de TGF β , de vitamines D3 ou de corticostéroïdes (O'Neill et al. 2004).

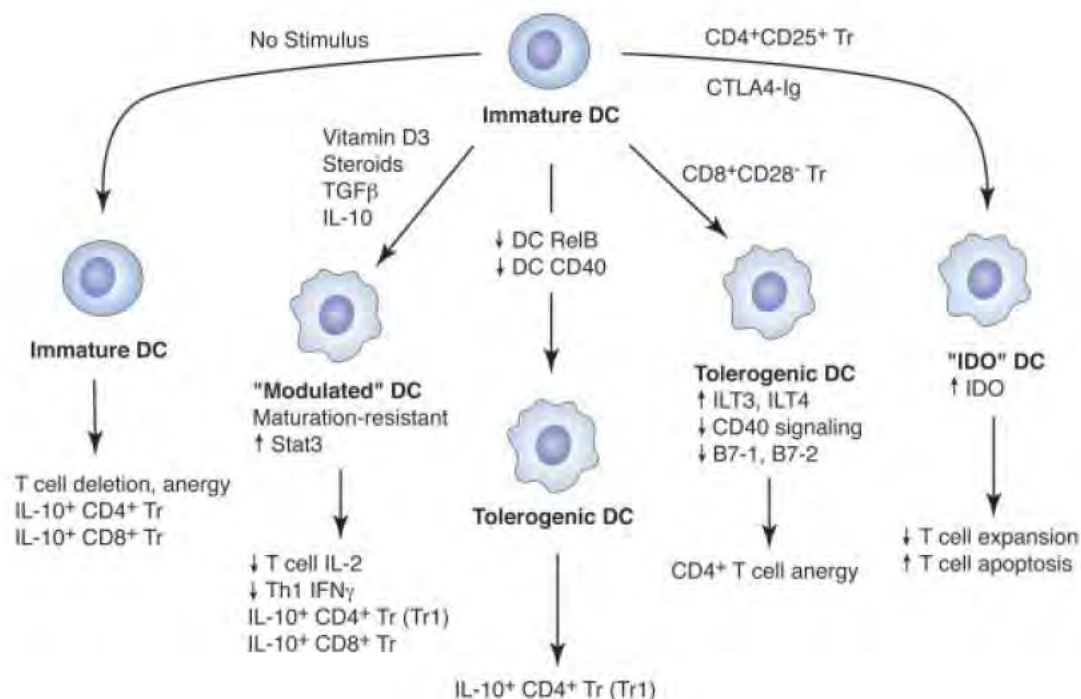


Figure 8 : les différents mécanismes pouvant conférer des propriétés tolérogènes aux DCs.

D'après O'Neill et Al (O'Neill et al. 2004).

3.2 Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

a. Caractéristique des MDSC

Le groupe de H. Schreiber a décrit pour la première fois qu'une augmentation du nombre de cellules myéloïdes dans des souris porteuses de tumeurs pouvait altérer la réponse immunitaire anti-tumorale (Pekarek et al. 1995; Seung et al. 1995). En effet, Ils ont décrit que l'administration d'un anticorps anti-Gr1 dépletant induisait un ralentissement de la poussée tumorale. La molécule Gr1 étant un marqueur de la population granulocytaire, il a, tout d'abord, été proposé que cette effet sur la croissance tumorale était du à l'élimination des granulocytes. Depuis il a été décrit que l'administration d'anticorps anti-Gr1 conduisait à la déplétion de différentes cellules de la lignée myéloïdes. Ces cellules, caractérisées par

leur pouvoir immunosuppresseurs, on été récemment regroupées sous le terme de MDSC (Myeloïd derived suppressor cells) afin d'éviter toutes confusions possibles avec les MSC (Mesenchymal Stem cells) (Gabrilovich et al. 2007). Ces cellules représentent une population de cellules myéloïdes très hétérogènes caractérisée par l'expression du CD11b et de Gr1 et par l'absence de marqueurs de cellules matures (Serafini et al. 2006). Plusieurs autres marqueurs ont été proposés comme le CD124 (chaîne α du récepteur à l'IL4) (Gallina et al. 2006), le CD115 (récepteur au M-CSF) (Huang et al. 2006) ou encore le CD31 (PECAM-1) (Bronte et al. 2000). Chez l'homme, les MDSC présentes chez des patients cancéreux sont bien moins caractérisés. Cependant, il a été montré que ces cellules pouvaient exprimer des marqueurs de cellules immatures tels que le CD34 ou le CD33 et n'exprimaient pas les molécules associées à la maturité comme le CD14 (Monocytes), le CD11c (DCs) ou les molécules du CMH de classe II (Almand et al. 2001). Le groupe de V. Bronte a récemment proposé que, chez la souris, la population CD11b+ / Gr1+ pourrait être séparé en deux sous-groupe : une partie de type monocytaire, exprimant le CD124 et possédant des propriétés immunosuppressives et une deuxième partie de type granulocytaire, n'exprimant pas le CD124 et n'ayant pas la capacité d'inhiber une réponse lymphocytaire T (Gallina et al. 2006).

b. L'accumulation des MDSC

Les MDSC ont été initialement découvertes dans des modèles murins de tumeurs. Ces cellules ont maintenant été identifiées comme étant aussi induits lors de certaines infections (Goni et al. 2002; Mencacci et al. 2002), de chimiothérapies (Angulo et al. 2000; Pelaez et al. 2001), de stress immun (Bronte et al. 1998), de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Bobe et al. 1999) ou encore dans des modèles de tolérance à une allogreffe (Dugast et al. 2008; De Wilde et al. 2008 Submitted). Ces cellules sont présentes dans la moelle osseuse et la rate de souris naïves et peuvent se différencier en cellules myéloïdes matures lors de condition normal (Kusmartsev and Gabrilovich 2003). L'accumulation des MDSC dans des souris porteuses de tumeurs résulterait, probablement, de facteurs produits par la tumeur elle-même. En effet, la sécrétion d'IL10, de TGF β , d'IL6, de VEGF ou de PGE2 a été montrée comme pouvant être responsable de l'accumulation des MDSC ou de leur maturation vers un phénotype immunosuppresseurs (Serafini et al. 2006). A contrario, les MDSC ont, comme les DCs, une certaine plasticité et le groupe de V. Bronte a montré qu'il été possible de les différencier en APCs mature, in vitro, en les cultivant en présence de GM-CSF et d'IL4 (Bronte et al. 1999).

c. Les mécanismes d'action des MDSC

Ces cellules ont été décrites comme ayant la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T en réponse à une stimulation antigénique. Cette suppression nécessite un contact cellulaire indépendant des molécules du CMH mais dépendant de la molécule CD80 (Bronte et al. 1998; Bronte et al. 1999; Yang et al. 2006). Une importante partie de la suppression médiée par les MDSC a été associée à l'activité de deux enzymes impliquées dans le métabolisme de l'arginine : iNOS (inducible NO synthase) et l'arginase-1 (Marigo et al. 2008). Ces deux enzymes partagent le même substrat, l'arginine, et la métabolise en NO et L-citrulline (Pour l'enzyme iNOS) ou en urée et L-ornithine (pour l'enzyme arginase-1) (Bogdan 2001).

L'arginase-1 va dépriver le milieu en arginine et par conséquent altérer l'expression de la chaîne ζ du CD3 et la transduction du signal du TCR. Cette fonction a été prouvée *in vitro* et *in vivo* par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique (Rodriguez et al. 2003; Rodriguez et al. 2004). De plus, l'absence d'arginine dans le milieu a été montrée comme pouvant entraîner l'arrêt du cycle cellulaire des cellules T (Rodriguez et al. 2007). L'enzyme iNOS a aussi été décrite comme pouvant agir sur la signalisation du TCR en interférant sur la cascade de signalisation du récepteur à l'IL2 et ainsi bloquer la synthèse d'IL2 (Bingisser et al. 1998; Fischer et al. 2001). De plus, ces deux enzymes pourraient agir de concert. En effet, la déplétion d'arginine par l'arginase-1, conduit à la production de superoxyde (O_2^-) et de NO par ces deux enzymes, qui vont se combiner rapidement pour former des peroxy-nitrites et d'autres dérivées comme le peroxyde d'hydrogène (Xia and Zweier 1997; Bronte et al. 2003; Marigo et al. 2008). Le groupe de Gabrilovich a récemment montré que les MDSC pouvaient entraîner la nitration du TCR et par conséquent, bloquer l'interaction TCR avec les complexes CMH-peptide présents à la surface des APCs (Nagaraj et al. 2007).

Les MDSC ont aussi la capacité d'inhiber la cytotoxicité des cellules NK, *in vitro* et *in vivo*, de façon contact dépendante (Liu et al. 2007). De plus, il a aussi été montré que l'interaction des MDSC avec les macrophages conduisait à l'augmentation de la sécrétion d'IL10 par les MDSC et la diminution de la production d'IL12 par les macrophages (Sinha et al. 2007). Enfin, il a aussi été décrit que les MDSC ont la capacité d'induire et d'expandre les Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Huang et al. 2006).

D- Recherche de nouvelles molécules impliquées dans la tolérance immune

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'identification de ces nouveaux médiateurs moléculaires pourrait conduire à une meilleure compréhension des différents mécanismes impliqués dans un contexte particulier.

Notre équipe a donc voulu identifier des gènes exprimés spécifiquement dans les greffons tolérés dans de modèle différents, un induit par transfusion de sang du donneur et un induit par traitement avec du LF15-0195, un analogue de la déoxyspergualine. Pour cela, la technique d'hybridation soustractive suppressive a été utilisée.

En ce qui concerne le modèle de DST, 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. Parmi les molécules identifiées, mon travail a consisté à caractériser la fonction ainsi que le rôle, dans ce modèle, des molécules FSTL1 (Follistatin-Like 1) et TORID (Tolerance Related and Induced transcript).

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 gréffés, rendus tolérants par traitement au LF15-0195 et d'animaux naïfs non gréffés, stimulés avec des CPA irradiées (du type du donneur). Nous avons donc pu identifier la molécule Slfn3 (Schlafen-3), et avons voulu caractériser son expression ainsi que sa régulation afin d'essayer de déterminer la fonction de cette molécule.

RESULTATS & DISCUSSION

**Partie 1 : CARACTERISATION DE FSTL1 ET TORID,
MOLECULES SUREXPRIMEES DANS LE MODELE DE
TOLERANCE INDUITS PAR TRANSFUSION DE SANG DU
DONNEUR.**

I- Le modèle de tolérance par transfusion de sang du donneur

1. Le modèle de greffe

Le modèle animal 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 (Soullillou et al. 1984; Gill et al. 1987). 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.

Ce système constitue un modèle de rejet d'allogreffe lorsque les animaux receveurs ne sont pas traités. Comme cela est représenté dans la figure 9, dans cette combinaison LEW.1W sur LEW.1A, l'allogreffe cardiaque est normalement rejetée en 6 ± 0.6 jours (Figure 9) (Soullillou et al. 1984; Josien et al. 1995). Les donneurs et receveurs sont toujours des mâles âgés de 8 à 12 semaines. La greffe de cœur est réalisée selon la technique décrite par Ono et Lindsey (Ono and Lindsey 1969). Le greffon est placé chez le receveur en position hétérotopique intra-abdominale et transversale en dessous des pédicules rénaux. 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.

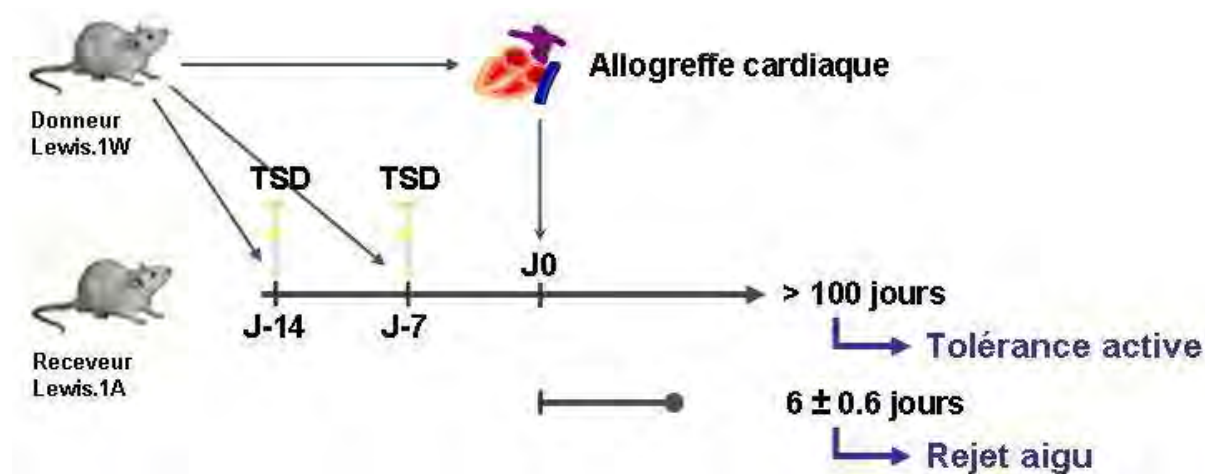


Figure 9 : Modèle de greffe et d'induction de tolérance par TSD.

2. L'induction de tolérance par transfusion de sang du donneur

Dans la même combinaison, il est possible d'induire une tolérance par deux transfusions du sang spécifique du donneur (TSD) au receveur de la greffe, 14 et 7 jours

avant la transplantation (figure 9) (Souillou 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.

Alors qu'une greffe 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 et al. 1984). L'effet transfusionnel est spécifique du donneur puisque des transfusions d'une souche autre que LEW.1W ne prolonge pas la survie de l'allogreffe dans cette combinaison (Souillou 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 spécifiques 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 et al. 1998b). Cependant, il a été montré que, dans ce modèle, des signes de rejet chronique apparaissent dans les mois suivant la greffe (Pirenne et al. 2005). On peut donc parler de tolérance opérationnelle. On ne peut donc parler de "vraie" tolérance immune mais plutôt d'une tolérance opérationnelle.

2.1 Infiltrats leucocytaires dans les greffons.

Une particularité des modèles de tolérance induite par TSD est la présence d'un important infiltrat leucocytaire dans les greffons tolérés. En effet, cet infiltrat est quantitativement équivalent à celui retrouvé dans les greffons des animaux non traités, et apparaît même plus précocement (Armstrong et al. 1987; Josien et al. 1995). L'infiltrat persiste dans les greffons tolérés pendant environ un mois, puis décroît lentement. L'importance et la précocité de cet infiltrat leucocytaire est alors l'un des premiers arguments en faveur d'un processus actif de la suppression du rejet induit par les TSD.

Le phénotype de l'infiltrat a été étudié dans notre modèle (Josien et al. 1995) ainsi que dans des modèles équivalents (Armstrong et al. 1987). Au 5^{ème} jour après la greffe, 60 à 70% des cellules infiltrant la greffe (CIG) sont des monocytes/macrophages/DCs. Les lymphocytes T ne représentent qu'environ 20%, sans différence significative entre les greffons rejetés et tolérés. Les seules différences observées sont une diminution significative du pourcentage de cellules CD8 α^+ (lymphocytes T CD8 $^+$ et cellules NK) et de cellules CD45RC $^+$ (lymphocytes B, cellules NK, une partie des lymphocytes T CD4 périphérique, associés au type Th1, et la majorité des lymphocytes T CD8 $^+$ périphériques) dans les greffons des animaux transfusés par rapport aux contrôles. Au 7^{ème} jour après la greffe, l'infiltrat reste majoritairement de type myéloïde (70%), et le pourcentage de cellules CD8 α^+

est deux fois moins important dans les greffons tolérés que dans les contrôles. Cette différence dans les pourcentages de cellules CD8 α^+ aux jours 5 et 7 est également retrouvée par Armstrong et ses collaborateurs (Armstrong et al. 1987) dans un modèle de tolérance à une allogreffe rénale induite par TSD, mais, au 3^{ème} jour, ces cellules sont plus nombreuses dans les greffons tolérés que dans les contrôles.

2.2 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 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 comme un événement essentiel de l'induction et de la maintenance de la tolérance. De façon intéressante, seules deux cytokines ont été trouvées surexprimées 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. 1998a). 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 messenger. Le TGF β 1 est impliqué de façon 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 alors que des cellules produisant du TGF β 1 soient impliquées dans la suppression du rejet, attestant à nouveau le caractère actif du processus d'induction de 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 requise (Josien et al. 1998b). Dans cette étude, Josien et ses collaborateurs ont démontré que la déplétion des cellules passagères du greffon (passenger leukocytes) 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 crucial de la reconnaissance et de la tolérance des alloantigènes du donneur chez les receveurs transfusés.

La mise en évidence de l'expansion spécifique d'un clone T CD8⁺ suggérait un rôle des cellules T CD8⁺ dans la tolérance par TSD. Cette hypothèse a été vérifiée et confirmée puisque la déplétion des cellules T CD8⁺ des receveurs avant la greffe abroge la tolérance (Douillard et al. 1999). Bien que la fonction précise de ces cellules reste encore obscure, il existe très probablement un lien entre les lymphocytes T CD8⁺ infiltrant les greffon des animaux tolérants et la production de TGFβ, également requise pour la tolérance (Josien et al. 1998a).

On peut alors émettre l'hypothèse que les TSD induisent des cellules régulatrices T CD8⁺ spécifiques du donneur infiltrant le greffon, reconnaissant les antigènes par le TCR portant le réarrangement Vβ18, et produisent de fortes quantités de TGFβ. 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 produisent du TGFβ à la suite de leur interaction avec ces APC du donneur, dans le greffon et/ou dans la rate.

II- Caractérisation du rôle de la follistatin-like 1 dans l'induction d'une tolérance à une allogreffe cardiaque chez le rat

1- La follistatin-like 1

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 (TGF β 1-stimulated clone-36), FRP (follistatin-related protein), Flik (follistatin like), ou occ1. Le gène codant pour FSTL1 chez le rat est localisé sur le chromosome 11. Ce gène est composé de 9 exons et 8 introns, et le transcrite correspondant est formée de 2283 pb (paires de bases) dont 918 pb (Figure 10). La protéine correspondante est donc composée de 306 AA et son poids moléculaire est estimé à 34,622 KDa (Estimation du poids moléculaire à l'aide du logiciel ProtParam : <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

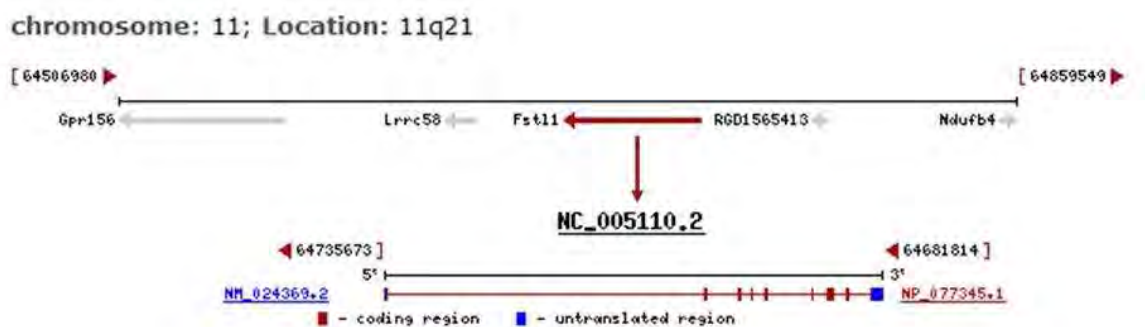


Figure 10 : Localisation chromosomique et structure du transcrite codant pour FSTL1.

FSTL1 est une glycoprotéine (N-glycosilation) 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 and Sage 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 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 antiprolifératif 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 et al. 1996; Okabayashi 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 proche de 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 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). De plus, Le groupe de K. Walsh a très récemment décrit que FSTL1 pourrait être sécrété par les cellules musculaires cardiaques et aurait des propriétés anti-apoptotiques (Oshima et al. 2008). Ce groupe a, en effet, montré que la surexpression de FSTL1 conduisait à l'augmentation de la survie des myocytes en augmentant les voies de signalisation de deux molécules : Akt et ERK. Ils ont aussi montré que FSTL1 avait la capacité d'augmenté les fonctions de migration et de survie des cellules endothéliales et ainsi stimuler la revascularisation en réponse à une ischémie (Ouchi et al. 2008).

L'accumulation de FSTL1 et de son inducteur, le TGF β , au cours du développement de l'arthrite (Thornton et al. 2002; Kawabata 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. 1998b; 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). De la même manière, FSTL1 pourrait avoir un rôle double et dans certaines conditions jouer un rôle pro inflammatoire. Une étude plus récente a montré que la surexpression de FSTL1 dans un modèle d'AR induite par injection de collagène augmente la sévérité de la maladie (Miyamae et al. 2006). Dans ce modèle, les auteurs montrent que cette surexpression conduit à une aggravation de la sévérité de la maladie associée à une augmentation de la production de cytokines pro inflammatoires telles que l'IL1 β ou l'IL6... Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par des conditions expérimentales, des modèles animaux et/ou des contextes différents.

2- ARTICLE 1: AN IMMUNOMODULATORY ROLE FOR FOLLISTATIN-LIKE 1 IN HEART ALLOGRAFT TRANSPLANTATION

Jean Benoît Le Ludec*, Thomas Condamine*, Cedric Louvet, Pamela Thebault, Jean-Marie Heslan, Michele Heslan, Elise Chiffolleau, Maria-Cristina Cuturi.

*** les deux premiers auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail.**

Publié dans the American Journal of Transplantation, en 2008.

Résumé de l'article 1 :**FSTL1 joue un rôle immunomodulateur lors d'une allogreffe cardiaque chez le rat.**

La transfusion de sang du donneur, avant la transplantation, permet d'induire, chez le receveur, une tolérance spécifique du greffon en absence de traitements immunosuppresseurs. Cet état de tolérance est caractérisé par un fort infiltrat leucocytaire et nous avons pu démontrer un rôle prédominant du TGF β et des lymphocytes T CD8⁺. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction de cette tolérance pourrait permettre d'établir de nouveaux traitements applicables chez l'homme et par conséquent nous avons cherché à identifier de nouvelles molécules ayant un rôle direct dans ces mécanismes. Parmi les molécules identifiées, nous avons pu montrer que FSTL1 était surexprimée dans les greffons tolérants par rapport aux greffons rejetés ou syngéniques, 5 jours après la greffe mais aussi lors de la phase de maintien de la tolérance.

Dans cette étude, nous avons montré que FSTL1 est surexprimée uniquement dans le greffon et non dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions. Les lymphocytes T CD8⁺ présent dans le greffon sont responsables de la production de cette molécule et nous avons précédemment montré que la déplétion de ces lymphocytes empêchait l'établissement de la tolérance. De façon intéressante, nous avons pu montrer que la surexpression de FSLT1 dans des receveurs naïfs par transfert de gènes est suffisante pour induire une prolongation significative de la survie de l'allogreffe cardiaque. Enfin, la surexpression de FSTL1 n'engendre pas de modification de l'infiltrat de l'allogreffe mais est associé à une diminution de la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL6, l'IFN γ ou l'IL17. L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que FSTL1 pourrait jouer un rôle immunomodulateur lors d'une allogreffe cardiaque.

An Immunomodulatory Role for Follistatin-Like 1 in Heart Allograft Transplantation

J. B. Le Luduec^{a,b}, T. Condamine^a, C. Louvet^{a,c},
P. Thebault^a, J.-M. Heslan^a, M. Heslan^a,
E. Chiffoleau^a and M.-C. Cuturi^{a,*}

^aINSERM, U643, Nantes, France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

^bINSERM, U851, Lyon, France

^cDiabetes Center, Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA

*Corresponding author: Maria Cristina Cuturi, Maria-Cristina.Cuturi@univ-nantes.fr

Donor-specific tolerance to heart allografts in the rat can be achieved by donor-specific blood transfusions (DST) before transplantation. We have previously reported that this tolerance is associated with strong leukocyte infiltration, and that host CD8⁺ T cells and TGF β are required. In order to identify new molecules involved in the induction phase of tolerance, we compared tolerated and rejected heart allografts (suppressive subtractive hybridization) 5 days after transplantation. We identified overexpression of Follistatin-like 1 (FSTL1) transcript in tolerated allografts compared to rejected allografts or syngeneic grafts. We show that FSTL1 is overexpressed during both the induction and maintenance phase of tolerance, and appears to be specific to the tolerance model induced by DST. Analysis of graft-infiltrating cells revealed predominant expression of FSTL1 in CD8⁺ T cells from tolerated grafts, and depletion of these cells prior to transplantation abrogated FSTL1 expression and heart allograft survival. Moreover, overexpression of FSTL1 by adenovirus gene transfer *in vivo* significantly prolonged allograft survival in association with inhibition of the proinflammatory cytokines, IL6, IL17 A and IFN γ . Taken together, these results suggest that FSTL1 could be an active component of the mechanisms mediating heart allograft tolerance.

Key words: FSTL1, T cells, tolerance, transplantation

Abbreviation: FSTL1, Follistatin-like 1; GIC, graft-infiltrating cells; PBL, peripheral blood lymphocytes; DST, donor-specific transfusion.

Received 8 April 2008, revised 18 July 2008 and accepted for publication 28 July 2008

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 (1). Tolerance induction in this model is an active phenomenon since tolerated allografts are rapidly infiltrated by numerous leukocytes that lack expression of either Th1- or Th2-related cytokines, but express high levels of the immunosuppressive cytokine TGF β , which is required for tolerance (2,3). The presence of passenger leucocytes in the graft is necessary for induction of tolerance (4). 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 (5,6). In order to identify new genes associated with this state of tolerance and further understand the immunological mechanisms underlying tolerance induction, we utilized suppressive subtractive hybridization (SSH) and observed overexpression of Follistatin-like 1 (FSTL1) in tolerated allografts 5 days posttransplantation.

FSTL1, also named TSC-36 (TGF- β 1-stimulated clone 36) or FRP (follistatin-related protein), is a secreted glycoprotein that shares the follistatin-like domain with several proteins, including Follistatin, Follistatin-related gene protein (FLRG), BM-40/SPARC/osteonectin and SC1/hevin. FSTL1 was initially cloned as a transforming growth factor-beta1-inducible protein (TSC-36) from a mouse osteoblastic cell line (7), and has been suggested to negatively regulate cell migration and proliferation (8,9). FSTL1 was identified as an autoantigen of synovium in rheumatoid arthritis (10), and injections of recombinant FSTL1 protein in a mouse model of arthritis demonstrated significant improvement in arthritis severity (11). In contrast, FSTL1 overexpression has been shown to exacerbate arthritis in a collagen-induced mouse model (12). In this study, we show that FSTL1 is specifically expressed by graft-infiltrating CD8⁺ T cells in a model of heart allograft tolerance induced by DST, and that overexpression of FSTL1 by gene transfer results in prolongation of allograft survival in association with inhibition of IL6 and IL17 production.

Le Luduec et al.

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) and maintained in an animal facility under standard conditions according to our institutional guidelines.

LEW.1 W (RT1.u) or LEW.1 A (RT1. a) rats were used as blood or heart donors, and LEW.1 A rats were used as allograft recipients. Heterotopic heart transplantations were performed using the Ono and Lindsey technique (13). Graft function was monitored daily by palpation through the abdominal wall.

In the DST model, which was used to induce tolerance, allograft recipients were transfused with 1 mL of fresh donor blood 14 and 7 days prior to transplantation, as previously described (1). For long-term allograft survival models, tolerance was induced using an adenoviral vector encoding the extracellular portion of mouse CTLA4 or CD40 fused to the coding sequences of the constant domains of human IgG1 (Ad.CTLA4lg (14) and Ad.CD40lg (15)) or by a 20-day treatment with LF15–0195, an analog of deoxyspergualin (16).

Suppressive subtractive hybridization

Subtractive hybridization and differential screening were performed as previously described (17) using mRNAs from tolerated (DST treated) and rejected (untreated) heart allografts harvested 5 days posttransplantation.

Real-time quantitative PCR

Total RNA from tissues or cells was prepared using the TRIzol extraction kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Real-time quantitative PCR was performed as previously described (17) using a GenAmp 7700 Sequence Detection System and SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Applera, Courtaboeuf, France). The oligonucleotides used in this study are described in Table 1. HPRT or 18 S 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 (17, 18), and expressed in arbitrary units.

Antibodies

The following hybridoma anti-rat mAbs were obtained from the European Collection of Animal Cell Culture (Salisbury, UK) and used for cell depletion, in cytofluorometric and cell sorting after coupling if necessary to FITC, biotin, PE and antigen-presenting cell (APC) (BiotAtlantic, Nantes, France) or Alexa-647 (Molecular Probes, Invitrogen): OX6 (MHC class II RT1B), OX35 (CD4), OX8 (CD8 α), OX42 (CD11b/c), R7/3 (TCR $\alpha\beta$), OX62 (integrin 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 G4.18) were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA), and anti-FSTL1 (Goat anti-rat) was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Secondary Abs included biotin-conjugated anti-goat IgG, HRP-conjugated streptavidin and VIP substrate, purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA).

Cell separation

Dendritic cells. Total CD103⁺ DCs were selected using OX62-MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France), as previously described (19, 20).

B cells and NK cells. B cells (TCR⁻ CD4⁻ CD45R⁺) and NK cells (CD8⁺/CD161^{a+high}) were purified from mononuclear spleen cells using a FACSAria flow cytometer, as previously described (21). The resultant purity of the sorted cells was >95%.

Table 1: Oligonucleotides used for real-time quantitative PCR

5's to 3's oligonucleotides sequences		
Rat FSTL1	Forward	GAACAACAACTGCTCAGAGGC
	Reverse	ACCCAGTGTCCACAGGAACAG
Rat HPRT	Forward	CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC
	Reverse	TTCGCTGATGACACAAACATGA
Rat 18 S	Forward	AGTCCGACCATAAACGATGC
	Reverse	CCCTCCGTCATTCTTTAA
Rat IL6	Forward	GCAAGAGACTCCAGCCAGTT
	Reverse	CATCATCGCTGTTACATAACATCA
Rat IFN γ	Forward	TGGATGCTATGGAAGGAAAGA
	Reverse	GATTCTGGTGACAGCTGGTG
Rat TNF α	Forward	CGTAGCAAACCAAGCAG
	Reverse	GAGCACATAGTCGGGCAG
Rat IL17 A	Forward	TGCTGTTGCTGCTACTGAACC
	Reverse	AACTTCCCCTCAGCGTTGAC
Rat IL10	Forward	TGCTATGTTGCTGCTTACTG
	Reverse	TCAAATGCTCCTTGATTTCTGG
Rat iNOS	Forward	GACCAACTGTGTGCCTGGA
	Reverse	TACTCTGAGGGCTGACACAAGG
Rat TGF β	Forward	CTCAACACCTGCACAGCTCC
	Reverse	ACGATCATGTTGGACAACTGCT
Rat Foxp3	Forward	GCTGGGAAGATGGCATTGA
	Reverse	GGAAGAACTCTGGAAAGGTGCT

Monocytes and T cells. Mononuclear blood cells were isolated using a Ficoll density gradient. Monocytes (MHC II⁻ CD103⁻ CD2⁻) and T cells (His42⁻ OX42⁻) were obtained after negative selection with anti-mouse IgG-coated magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway), as previously described (21). The 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 containing 1% FCS for 30 min at 37°C. Ten millimolar EDTA was added for the last 5 min, and the cell suspension was then pipetted up and down several times, gently pressed through a stainless steel mesh, and filtered. Mononuclear cells were then isolated by density gradient centrifugation on a 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), and W3/25 (anti-CD4) or, alternatively, OX8 (anti-CD8) and OX33 (anti-CD45R present on B cells). Cells were then incubated with super paramagnetic beads covalently bound to affinity-purified goat anti-mouse IgG (Dyna, Oslo, Norway), and antibody-bound cells were removed with a magnet.

In vivo CD8⁺ cell depletion

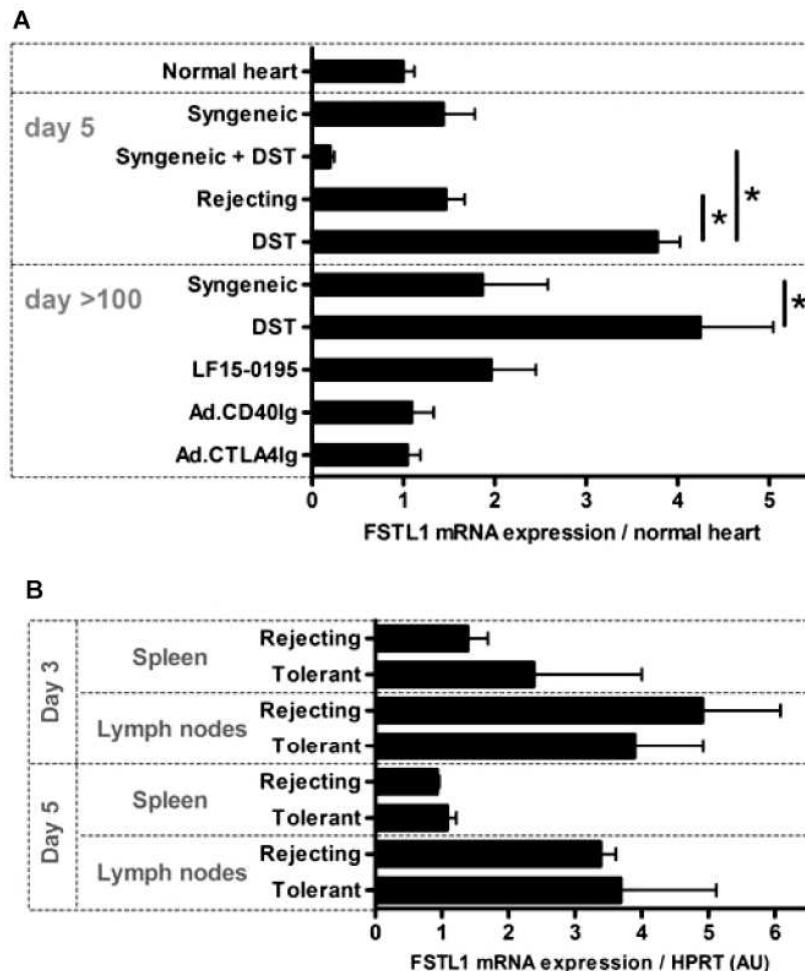
DST-treated recipients were treated with intraperitoneal injections of 1.5 mL of OX8 supernatant (anti-CD8) 16, 9, 3 and 1 day before transplantation, as previously described (5).

Recombinant adenovirus

An adenovirus encoding FSTL1 was constructed using the pAdEasy and pAdTrack-CMV system in 293 cells (22). The cDNA sequence for rat FSTL1 was positioned under control of the human CMV promoter. Empty adenovirus (Ad.Control) was used as a control. Recombinant adenoviruses were purified and titered as previously described (15).

Prolonged Heart Allograft Survival by Overexpression of FSTL1

Figure 1: FSTL1 mRNA expression in heart allografts and lymphoid organs from DST-treated recipients. (A) Syngeneic and allogeneic rejected 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 CD40lg (Ad.CD40lg) or Adenovirus CTLA4lg (Ad.CTLA4lg) (see Materials and Methods). FSTL1 mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR and normalized to 18 S rRNA expression. (B) Spleen and lymph nodes from rejecting (untreated) or tolerated (DST) recipients were harvested at 3 or 5 days after transplantation. FSTL1 mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR and normalized to HPRT mRNA expression. Results are expressed in arbitrary units (AU). Results represent the mean \pm SD of 3 to 5 animals per group. Significant differences are indicated (* $p < 0.05$).



Western blot analysis

Sera were resolved by gradient SDS-PAGE (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). Membranes were then subjected to immunoblot analysis using anti-FSTL1 and anti-goat peroxidase-conjugated secondary antibodies. Bands were revealed by enhanced chemiluminescence (Amersham, LittleChalfont, UK), exposed to Kodak film, and quantified with Kodak Digital Science Image Analysis 1D software.

Quantitative analysis of the cellular infiltrate by immunohistology

Immunohistology was performed on hearts harvested 5 days after transplantation from Ad.control- or Ad.FSTL1-treated rats. Heart fragments were snap-frozen, embedded in Tissue Teck (OCT compound, CA), cut into 12- μ m sections and fixed in acetone. Tissue sections were labeled using a three-step indirect immunoperoxidase technique with OX1/OX30, R7/3 and OX6 as primary antibodies. Tissue sections were then incubated with corresponding biotin-conjugated anti-mouse IgGs, followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin. Sections were then developed with vector VIP. The area of each immunoperoxidase-labeled tissue section infiltrated by cells was determined by quantitative morphometric analysis, as previously described (23).

Statistical analyses

Real-time quantitative PCR data were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney test. The p -values < 0.05 were considered as significant. Allograft survivals were analyzed by the log-rank test.

Results

FSTL1 is overexpressed in tolerated allografts induced by DST

Using SSH, we identified FSTL1 mRNA overexpression in heart allografts from DST-treated recipients compared to untreated rejecting ones 5 days after transplantation. In order to confirm these results, we assessed whole allografts by RT-PCR analysis. As seen in Figure 1A, FSTL1 mRNA was overexpressed in tolerated grafts compared with rejected grafts ($p < 0.05$) or syngeneic grafts 5 days after transplantation. FSTL1 mRNA was not overexpressed in rejected allografts compared to syngeneic grafts, suggesting that FSTL1 is not induced by activation/inflammation in this model. Furthermore, FSTL1 mRNA expression was still elevated 100 days after transplantation in allografts from

Le Luduec et al.

DST-treated recipients compared to syngeneic ones ($p < 0.05$). When we examined FSTL1 expression in syngeneic grafts from DST-treated recipients, overexpression of FSTL1 was not observed, suggesting that DST and the allografts are required for induction of FSTL1 expression (Figure 1A). We then examined FSTL1 mRNA expression in different models of long-term allograft tolerance (LF15–0195, CD40lg or CTLA4lg) (14–16) and did not observe any overexpression of FSTL1 in tolerated allografts (Figure 1). These results demonstrate that FSTL1 mRNA is specifically induced in the DST heart allograft transplantation model and is not related to inflammation/activation mechanisms in allograft rejection. Finally, we analyzed the expression of FSTL1 in spleen and lymph nodes from tolerated (DST-treated) or rejecting (untreated) recipients. We did not observe any difference in FSTL1 mRNA expression in tolerated compared to rejecting recipients (Figure 1B). Therefore, we concluded that FSTL1 overexpression is specific to the graft site and is not induced during T-cell priming in the secondary lymphoid organs.

FSTL1 mRNA is specifically expressed by graft-infiltrating T leukocytes

In order to characterize FSTL1 expression in rats, mRNA expression of FSTL1 was analyzed in various tissues from naïve rats by RT-PCR (Figure 2). Aorta, heart and lung exhibited the highest FSTL1 mRNA expression. FSTL1 was expressed to a lesser extent in testis, kidney, brain, skeletal muscle, colon, spleen and lymph nodes. Very low expression was detected in liver, intestine, bone marrow, thymus and peripheral blood leucocytes. The low expression of FSTL1 in lymphoid organs and very low expression of FSTL1 in blood leukocytes suggest that FSTL1 is not constitutively expressed in leukocytes at a quiescent state. Indeed, very low levels of FSTL1 mRNA were detected in freshly isolated spleen DCs, monocytes, NK, B, or CD4⁺ and CD8⁺ T cells from naïve rats (Figure 3A). In contrast, a high level of expression was observed in graft-infiltrating leukocytes (GICs) isolated from tolerated grafts (Figure 3A). GICs from rejected grafts showed lower levels of expression than tolerated grafts ($p < 0.05$). Notably, this difference (>5 fold) was more pronounced than the difference observed in whole grafts (~2.5-fold). In T-cell-depleted GIC from tolerated grafts, FSTL1 expression was decreased to a level comparable to that of untreated rejecting recipients (Figure 3A). These results suggest that FSTL1 is specifically expressed by T cells infiltrating allografts in tolerated recipients during the induction phase of tolerance.

FSTL1 is specifically expressed by graft-infiltrating CD8⁺ T cells that are required for tolerance induction

In order to determine which T-cell subpopulation expressed FSTL1 in tolerated grafts, enrichment and depletion of CD8⁺ or CD4⁺ populations from the GICs of DST-treated or untreated recipients was performed. As shown in Figure 3B, FSTL1 overexpression was strikingly associated with either CD8⁺ enrichment or CD4⁺ depletion of GICs

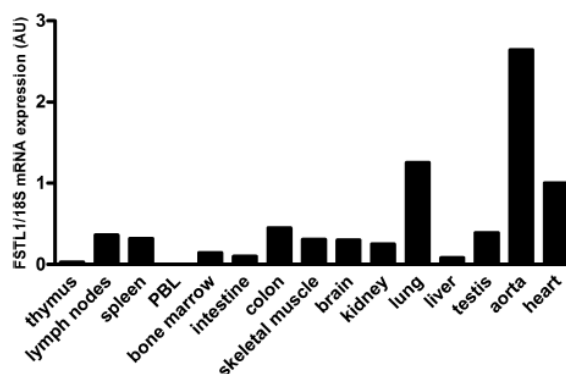


Figure 2: Expression of FSTL1 mRNA in rat tissues and organs. Expression of FSTL1 mRNA in various rat tissues was assessed by real-time quantitative PCR. FSTL1 mRNA levels were normalized to 18 S rRNA and expressed in arbitrary units (AU). PBL = peripheral blood lymphocytes.

from tolerated recipients. Thus, FSTL1 was specifically induced in CD8⁺ T cells infiltrating the grafts of DST-treated animal.

We have previously shown that a DST-induced population of CD8⁺ T cells is required for the induction of tolerance (5,6). Interestingly, when CD8⁺ T cells were depleted in DST-treated recipients, which have been shown to abrogate tolerance, FSTL1 mRNA was no longer overexpressed in the graft, but expressed at the same basal level than in rejected ones (Figure 4). Taken together, these results demonstrate that FSTL1 is expressed by graft-infiltrating CD8⁺ T cells, and is strictly associated with the state of tolerance induced by DST.

Downregulation of cytokine production following CD8⁺ T-cell depletion

In order to assess the role of FSTL1-producing CD8⁺ T cells in the induction of tolerance, we analyzed the expression of cytokines in allografts from a model of CD8⁺ T-cell depletion prior to DST, which we have previously shown (5) to induce rejection. We show here that CD8⁺ T-cell depletion was associated with a loss of FSTL1 overexpression (Figure 4). Cytokines mRNA expression were analyzed in rejected (untreated), DST-treated (tolerated) and OX8-DST (CD8⁺ cell depletion prior to DST, rejecting) allografts (Figure 4). We observed strong downregulation of IL6 and IL17 A mRNA expression (13- and 4-fold, respectively, $p < 0.05$) in DST-treated grafts in comparison to rejected grafts. In contrast, TGF β and FSTL1 were upregulated. Interestingly, depletion of CD8⁺ T cells (FSTL1-producing cells) reversed the inhibition of IL6 production. In addition, we observed strong downregulation of TGF β production (~9-fold, $p < 0.05$), even lower than untreated recipients ($p < 0.05$). These data confirm our previous work suggesting (2) that CD8⁺ T cells are the main source of TGF β in the DST model. After CD8⁺ T-cell depletion, the level

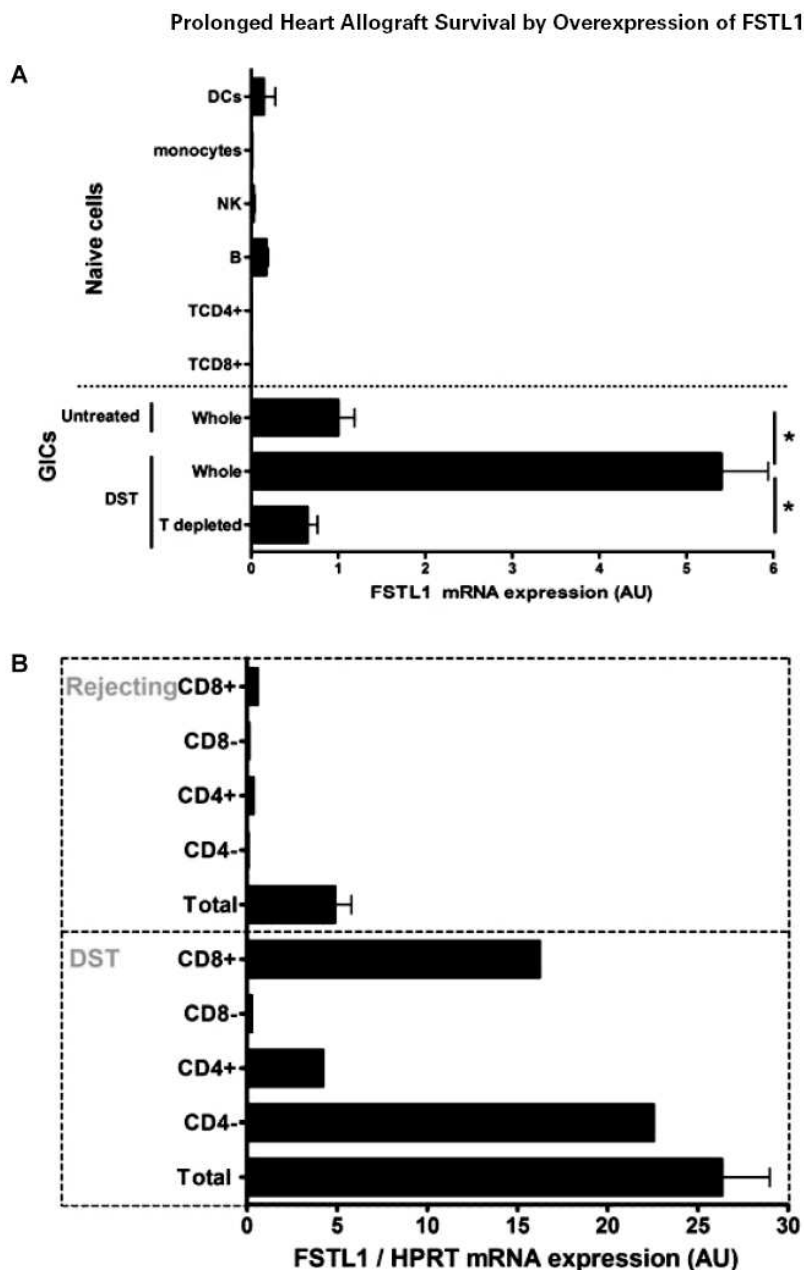


Figure 3: FSTL1 mRNA expression in naive cells and graft-infiltrating cells (GICs). FSTL1 mRNA expression in purified leukocytes was assessed by real-time PCR normalized to HPRT mRNA and expressed in arbitrary units (AU). Results are expressed as the mean \pm SD of AU for each group. Significant differences 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 T-depleted GICs from tolerated allografts ($n = 4$) 5 days after transplantation. (B) FSTL1 mRNA expression in purified T cells from rejecting and tolerated (DST) heart allografts 5 days after transplantation.

of IL17 A expression remained at a low level, similar to that observed in DST-treated recipients. This low level of IL17 A production could be explained by the downregulation of TGF β as it has been described to be critical to TH17 differentiation (24). Taken together, these results suggest that FSTL1- and TGF β -producing CD8 $^+$ T cells could modulate cytokine production in the graft.

FSTL1 overexpression prolongs heart allograft survival

In order to test the hypothesis that FSTL1 has an immunomodulatory role *in vivo*, we examined the effect of

intravenous administration of an adenovirus encoding rat FSTL1 (Ad.FSTL1) on the day of transplantation on allograft survival. Rejection in untreated recipients or control (empty) adenovirus-treated (Ad.CTRL) recipients occurred within 6.8 ± 1.6 days and 7.2 ± 0.5 days, respectively, whereas heart allograft survival was significantly prolonged to 13 ± 3.2 days ($p < 0.05$) in rats receiving FSTL1-encoding adenovirus (Figure 5A).

Furthermore, we assessed total FSTL1 protein accumulation in the serum of injected rats by western blot at different days posttransplantation to determine the efficacy and kinetics of the adenovirus-mediated expression. As

Le Luduec et al.

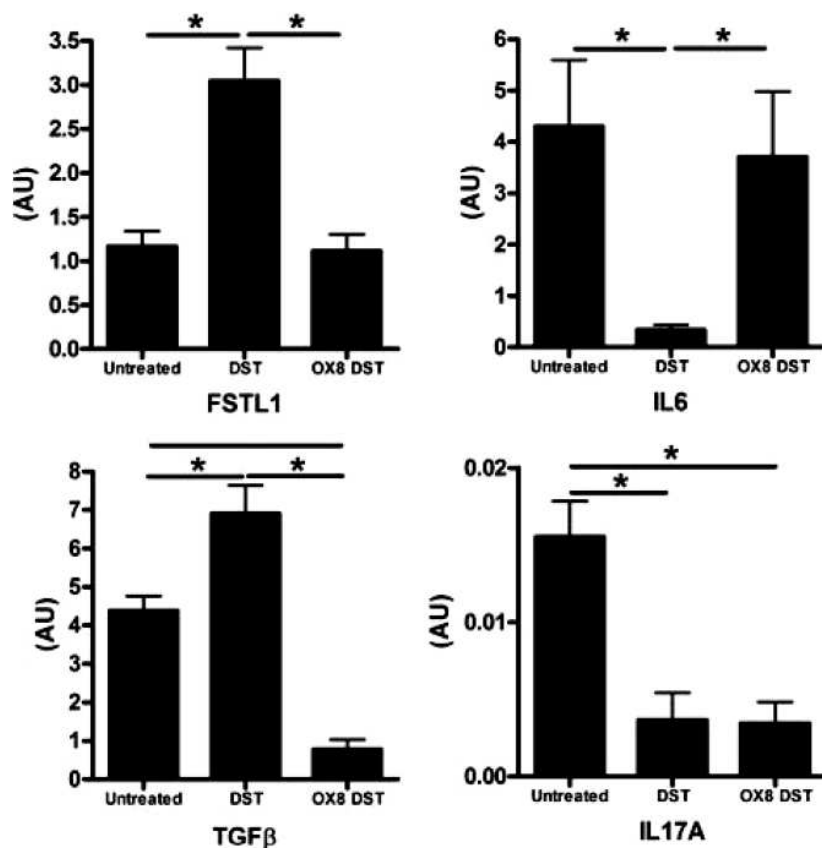


Figure 4: FSTL1 and cytokine mRNA expression in heart allografts from OX8-depleted rats. Allogeneic grafts were harvested 5 days after transplantation from untreated (rejecting), DST-treated (tolerated), and OX8+DST (CD8⁺ T-cell depleted, rejecting) recipients. FSTL1, IL6, TGFβ and IL17 A mRNA expression was assessed by real-time PCR normalized to HPRT mRNA and expressed in arbitrary units (AU). Results represent the mean ± SD of three animals per group. Significant differences are indicated (*p < 0.05).

shown in Figure 5B, FSTL1 protein expression was high 5 days posttransplantation, but markedly decreased on day 12 and no longer detectable on day 16. Thus, FSTL1 appears to be only transiently expressed, suggesting a deleterious immune response against adenovirus-infected cells producing FSTL1.

These results demonstrate an active immunomodulatory function of FSTL1, and suggest that this molecule may play an important role in DST-induced allograft tolerance.

FSTL1 overexpression reduces Th17-related cytokine expression in the allograft

Phenotypic analysis of the cellular infiltrate was performed in allografts from Ad.CTRL-treated or Ad.FSTL1-treated recipients 5 days after transplantation. Tissue cryostat sections were labeled with the anti-leukocyte common antigen CD45, anti-TCRαβ and anti-MHC class II antibodies. We did not observe a difference in total, T or MHC class II⁺ allograft cell infiltration between Ad.CTRL-treated and Ad.FSTL1-treated recipients (Figure 6A), suggesting that overexpression of FSTL1 does not alter the qualitative and quantitative cell infiltration in the allograft.

Cytokine mRNA expression analysis was performed on allografts from Ad.CTRL-treated or Ad.FSTL1-treated recipi-

ents 5 days after transplantation. As shown in Figure 6B, IL17 A mRNA expression was strongly reduced (~30-fold) in allografts from Ad.FSTL1-treated recipients compared to allografts from Ad.CTRL-treated recipients (p < 0.05). Similarly, but to a lesser extent, IL6 and IFNγ mRNA expression levels were significantly decreased (3-fold and 1.3-fold, respectively, p < 0.05). Expression levels of TNFα and iNOS, as well as the immunosuppressive molecules TGFβ and IL10 and the regulatory T-cell transcription factor Foxp3 were not significantly different between the two groups. These results suggest that prolonged allograft survival by FSTL1 overexpression may be due to decreased expression of the proinflammatory cytokines IL17, IL6 and IFNγ, but not by induction of regulatory mechanisms involving TGFβ, IL10 or Foxp3.

Discussion

To better understand the mechanisms involved in DST-induced tolerance, we employed the SSH technique and identified overexpression of FSTL1 in tolerated allografts compared to rejected ones.

By quantitative RT-PCR, we demonstrated that FSTL1 mRNA expression is induced during the first week after

Prolonged Heart Allograft Survival by Overexpression of FSTL1

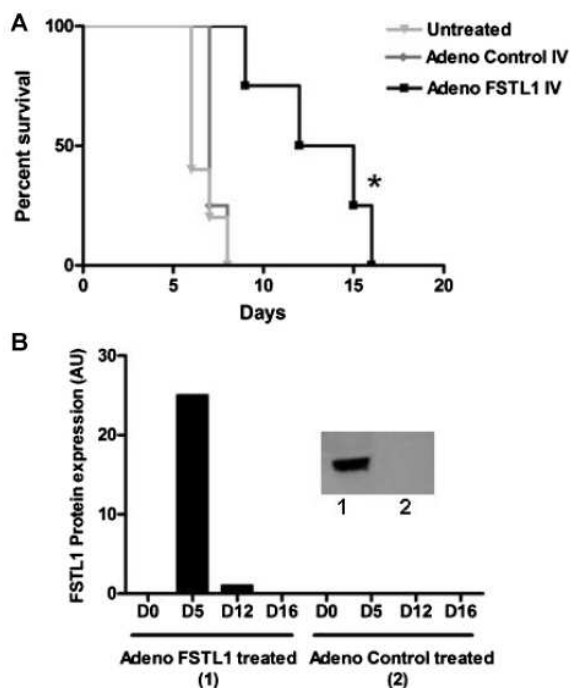


Figure 5: Allograft survival in Ad.FSTL1-treated animals and FSTL1 protein expression in the serum of peripheral blood. LEW.1 A rats received allogeneic LEW.1 W hearts and were treated intravenously on the same day with either control (n = 5) or FSTL1 (n = 4) adenovirus (2.5×10^{10} infectious particles). (A) Graft survival was monitored daily by abdominal palpation. Rejection was defined when beating of the transplanted heart could no longer be detected (*p < 0.05 Ad.FSTL1 vs. Ad.Control). (B) FSTL1 protein expression in the serum of transplanted rats was assessed by western blot 0, 5, 12 and 16 days after injection with Ad.FSTL1 (1) or Ad.Control (2) (Western blot image shows samples at day 5). These data are representative of three independent experiments.

transplantation in tolerated allografts and remains 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 maintenance of the tolerance state induced by DST treatment.

Interestingly, weak expression of FSTL1 mRNA was observed in lymphoid organs or different subpopulations of freshly isolated leukocytes from naïve rats, but strong mRNA expression was observed specifically in graft-infiltrating CD8⁺ T leukocytes from tolerated allografts, demonstrating that FSTL1 expression can be induced in leukocytes under specific conditions. We were unable to quantify the expression of FSTL1 in tolerated grafts by western blot or immunohistochemistry, suggesting low expression in CD8⁺ T cells infiltrating the allograft or that FSTL1-expressing CD8⁺ T cells represent a very small population.

FSTL1 was initially identified as a TGF β -induced gene in a murine osteoblastic cell line (7). Tolerated allografts express strong quantities of TGF β , and injection of a neutralizing anti-TGF β antibody abrogates tolerance in DST-treated rats (2). Therefore, FSTL1 expression could be induced by TGF β and thereby play a subsequent role in the induction of tolerance in this model. We assessed FSTL1 expression in T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 in the presence of TGF β , but observed no induction of FSTL1 in these experimental conditions (data not shown). T-cell stimulation with TGF β *in vitro* may not be sufficient to induce FSTL1 expression, and may require additional factors. These results suggest that specific mechanisms induced by DST treatment are mandatory to induce the expression of FSTL1 in CD8⁺ T cells infiltrating the allografts, but DST treatment alone is not sufficient to induce FSTL1 expression. Most likely, FSTL1 induction requires both the DST and the graft. We hypothesize that TGF β induced by DST treatment as well as alloantigens are necessary for the induction of FSTL1 and tolerance. FSTL1 was identified as an autoantigen of synovium in rheumatoid arthritis (10), and accumulation of FSTL1 and its inducer (TGF β) have been observed during the development of arthritis (11,25). In this model, injections of recombinant FSTL1 protein have a significant effect on arthritis severity and, notably, decrease the inflammatory symptoms of this disease (11). More recently, FSTL1 has been shown to have an antiapoptotic effect on cardiomyocytes in a model of ischemia/reperfusion (26). Although one study described a proinflammatory role of FSTL1 (12), another study described FSTL1 as an immunomodulator of the inflammatory response (11). The latter is supported by the observation that FSTL1 putatively negatively regulates the migration and proliferation of cells (8,9). Like FSTL1, TGF β has been shown to have opposing roles in inflammation, exhibiting proinflammatory (27–29) or anti-inflammatory effects (30–32). Here, we show that FSTL1, like TGF β , could play an important role in the immunoregulatory alloresponse.

We previously showed that CD8⁺ depletion before DST and transplantation abrogates allograft tolerance (5), demonstrating that CD8⁺ T cells are essential for the induction of tolerance in the DST model. Moreover, we previously demonstrated the specific role of the V β 18-D β 1-J β 2.7 CD8⁺ T-cell clone in regulatory mechanisms (5, 6). As we demonstrate in this study that FSTL1 expression is specifically expressed by CD8⁺ T cells in allografts from DST-treated animals, FSTL1 could be expressed by this clone and implicated in the active process of tolerance induction.

Interestingly, IL6 and IL17 A are downregulated in DST-treated recipients, and depletion of FSTL1-producing CD8⁺ T cells restores IL6, but not IL17 A production. These results suggest that FSTL1 affects IL6 production but we cannot exclude a role on IL17 A production because this cytokine production could be abrogated due to the loss of TGF β , a critical factor in Th17 differentiation (24),

Le Luduec et al.

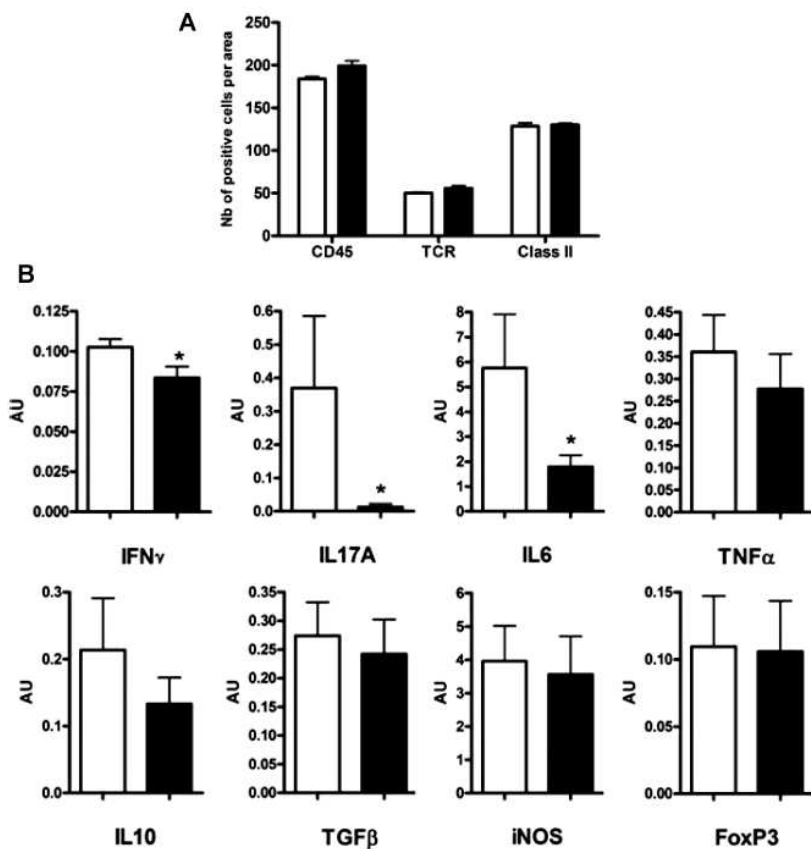


Figure 6: Leukocytes infiltration and cytokine mRNA expression in allografts from Ad.CTRL- and Ad.FSTL1-treated animals. Allografts from Ad.CTRL (□) (n = 5) or Ad.FSTL1 (■) (n = 7)-treated recipients were harvested 5 days after transplantation. (A) Sections were stained with OX1/OX30 (anti-CD45 present on all leukocytes), R7/3 (recognizing TCR $\alpha\beta$) or OX6 (anti-MHC class II expressed by APCs), and quantified as described in the Materials and Methods. Results are expressed as the mean \pm SD of positive cells per infiltrate area from four recipients in each group. (B) Total RNA was extracted as described in the Materials and Methods, and analyzed by quantitative RT-PCR for IFN γ , IL17 A, IL6, TNF α , IL10, TGF β , iNOS and Foxp3 expression. Cytokine mRNA expression was normalized to HPRT mRNA expression and expressed in arbitrary units (AU). Significant differences are indicated (*p < 0.05).

after CD8⁺ T-cell depletion (which produce FSTL1 and TGF β).

Prolonged allograft survival up to 13 days after a single injection of adenovirus encoding FSTL1 recombinant protein and characterized by decreased production of proinflammatory cytokines demonstrates an immunomodulatory role of FSTL1. We showed that the level of FSTL1 secretion decreases rapidly after infection with the adenovirus. We observed normal monocytes/macrophage infiltration into the graft, but a decrease in IL6 mRNA expression. Additionally, the expression of TNF α and iNOS were normal, suggesting that FSTL1 did not inhibit monocytes/macrophage migration and activation, but specifically inhibited IL6 expression. In addition, we observed a strong decrease in IL17 A expression in allografts from Ad.FSTL1-treated animals. Miyamae et al. showed that injection of an adenovirus encoding FSTL1 into mice induces strong overexpression of IL6, IL1 β and TNF α in the liver of Ad.FSTL1-treated animals compared to Ad.CTRL-treated recipients, concordant with a proinflammatory effect of FSTL1 (12). In contrast to this study, we did not observe any increase in the mRNA expression of these cytokines in the liver of treated recipients in our model (data not shown), but decreases in IL17 A, IL6 and IFN γ were observed in the allograft.

As IL6 and TGF β have recently been described as critical cytokines for Th17 cell differentiation (24,33), FSTL1 could act directly on APCs by inhibiting IL6 production and, consequently, inhibiting Th17 differentiation, although we cannot exclude a direct action of FSTL1 on CD4⁺ T cells or, as has been recently reported, on the graft itself (26). Interestingly, Th17 cells and IL17 A transcript accumulation have been recently associated with different autoimmune diseases and acute allograft rejection (34,35). In a model of cardiac allograft transplantation in rodents, inhibition of IL17 using IL17R:Fc was shown to prolong graft survival (36). Taken together, these data suggest that the decrease in Th17 T-cell differentiation in the graft in response to FSTL1 gene transfer could be responsible for the prolonged allograft survival in our model.

In conclusion, we have demonstrated strong FSTL1 expression by graft-infiltrating CD8⁺ T cells in a model of induced allograft tolerance. In this model, TGF β played an important role and FSTL1 administration by gene transfer prolonged allograft survival concordant with inhibition of IL6 production and subsequent regulation of the proinflammatory response. Therefore, FSTL1 may play an immunomodulatory role in the immune response and, in the future, could be used as a therapeutic agent in the clinical setting.

Prolonged Heart Allograft Survival by Overexpression of FSTL1

Acknowledgments

J. B. Le Ludec and T. Condamine contributed equally to this work. This work was supported by a grant from the Juvenile Diabetic Foundation, the 'Fondation pour la recherche Médicale' and INSERM. J. B. L. L. was supported by a fellowship from 'La société francophone de transplantation' and 'La fondation Progreffe'. TC was supported by a fellowship from the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'.

References

- Souillou JP, Blandin F, Gunther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984; 38: 63–67.
- Josien R, Douillard P, Guillot C et al. A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest* 1998; 102: 1920–1926.
- 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: 1131–1139.
- Josien R, Heslan M, Brouard S, Souillou JP, Cuturi MC. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 1998; 92: 4539–4544.
- Douillard P, Vignes C, Josien R et al. Reassessment of the role of CD8+ T cells in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1919–1924.
- 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: 96–101.
- Shibanuma M, Mashimo J, Mita A, Kuroki T, Nose K. 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* 1993; 217: 13–19.
- Liu S, Wang L, Wang W et al. TSC-36/FRP inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 132–140.
- Sumitomo K, Kurisaki A, Yamakawa N et al. Expression of a TGF-beta1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett* 2000; 155: 37–46.
- Tanaka M, Ozaki S, Osakada F, Mori K, Okubo M, Nakao K. Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases. *Int Immunol* 1998; 10: 1305–1314.
- Kawabata D, Tanaka M, Fujii T et al. Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 660–668.
- Miyamae T, Marinov AD, Sowders D et al. Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule. *J Immunol* 2006; 177: 4758–4762.
- Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 57: 225–229.
- Guillot C, Mathieu P, Coathalem H et al. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4lg expression. *J Immunol* 2000; 164: 5258–5268.
- Guillot C, Guillonnet C, Mathieu P et al. 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* 2002; 168: 1600–1609.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. 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* 2002; 2: 745–757.
- Louvet C, Heslan JM, Merieau E, Souillou JP, Cuturi MC, Chiffolleau E. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 2004; 78: 1259–1266.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402–408.
- Hubert FX, 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: 7485–7494.
- Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002; 169: 2284–2291.
- Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M et al. Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIIbeta family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant* 2005; 5: 2143–2153.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2509–2514.
- McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42: 352–358.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179–189.
- Thornton S, Sowders D, Aronow B et al. DNA microarray analysis reveals novel gene expression profiles in collagen-induced arthritis. *Clin Immunol* 2002; 105: 155–168.
- Oshima Y, Ouchi N, Sato K, Izumiya Y, Pimentel DR, Walsh K. Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. *Circulation* 2008; 117: 3099–3108.
- Cheon H, Yu SJ, Yoo DH, Chae IJ, Song GG, Sohn J. Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 547–552.
- Fava RA, Olsen NJ, Postlethwaite AE et al. 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* 1991; 173: 1121–1132.
- Wahl SM, Allen JB, Costa GL, Wong HL, Dasch JR. Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1993; 177: 225–230.
- Chen S, Bacon KB, Li L et al. In vivo inhibition of CC and CX3CR1 chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med* 1998; 188: 193–198.
- Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL. 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* 1989; 83: 1267–1276.

Le Luduec et al.

32. Song XY, Gu M, Jin WW, Klinman DM, Wahl SM. Plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 suppresses chronic disease in a streptococcal cell wall-induced arthritis model. *J Clin Invest* 1998; 101: 2615–2621.
33. Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235–238.
34. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32–46.
35. Chen Y, Wood KJ. Interleukin-23 and TH17 cells in transplantation immunity: Does 23+17 equal rejection? *Transplantation* 2007; 84: 1071–1074.
36. Antonyshy MA, Fanslow WC, Fu F et al. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol* 1999; 162: 577–584.

3- 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 comme 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 les mécanismes responsables de l'induction et la maintenance de la tolérance induite par TSD. De manière surprenante, nous avons observé une très faible expression de FSTL1 dans les organes lymphoïdes ainsi que dans les différentes sous-populations leucocytaires d'animaux naïfs. A contrario, nous avons observés 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 aussi pu montrer que cette induction de FSTL1 avait uniquement lieu dans le greffon et non dans les organes lymphoïdes secondaire tel que la rate ou les ganglions mésentériques. Ces résultats laissent donc penser que soit cette induction est due à l'environnement immunitaire du greffon, soit les cellules sécrétrices de FSTL1 sont trop peu nombreuses dans les organes lymphoïdes pour pouvoir détecter une augmentation de son expression. Enfin, 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 immunomodulateur de FSTL1. Cette prolongation de survie a pu être associée à une diminution de la production des cytokines IL6, IL17A et IFN γ sans modification qualitative ou quantitative de l'infiltrat cellulaire du greffon.

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 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 CD8⁺ Vb18-Db1-Jb2.7 suggère une fonction régulatrice de ce clone (Douillard 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 et al. 1998a). 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 TSDrompt la tolérance (Josien et al. 1998a). Par conséquent, FSTL1 pourrait, dans notre modèle, être induit par le TGF β et joué un rôle dans l'établissement de la tolérance. Cependant, l'activation de lymphocytes via une stimulation polyclonale (Stimulation à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28) en présence ou non de TGF β ne permet pas d'induire l'expression de FSTL1 à un niveau comparable à celui des cellules T CD8⁺ infiltrant les greffons tolérants. Nous n'avons donc pas pu montrer un rôle du TGF β dans l'induction de FSTL1 in vitro. Ces faits suggèrent que d'autres facteurs (cytokines, interactions cellulaires...), produits localement dans la greffe, sont nécessaires à l'induction de FSTL1 en plus du TGF β puisque l'augmentation de l'expression de FSTL1 n'apparaît qu'au niveau de la greffe chez les animaux traités par TSD. Il serait intéressant d'essayer d'induire l'expression en présence d'APCs allogéniques qui pourrait permettre l'apport de facteurs nécessaire à l'induction de FSTL1. Une autre hypothèse serait que l'induction de FSTL1 ne soit possible qu'uniquement dans les cellules T mémoires. En effet, Les cellules CD8⁺ productrice de FSTL1 sont induites par les transfusions de sang qui ont lieu 14 et 7 jours avant la greffe. Il semble donc raisonnable de penser que ces cellules soit des cellules mémoires et que lors de l'aggreffe, la production de FSTL1 soit induite par l'intermédiaire du TGF β .

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 et al. 2004). Bien que certaines études aient décrit un rôle pro inflammatoire de FSTL1 (Miyamae et al. 2006), FSTL1 pourrait aussi jouer un rôle immunorégulateur de la réponse inflammatoire (Kawabata 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 proinflammatoire 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. 1998a; 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 très prometteuse. 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 and Muruve 2005). Le rejet de la greffe apparaissant à peu près en même temps que la disparition de FSTL1, il se pourrait que ce soit la conséquence de la disparition de FSTL1. 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 peut retarder la réponse immune contre l'allogreffe et prévenir le rejet. Cependant, nous n'avons pas encore pu établir si notre protéine recombinante conserve son activité biologique suite aux processus de production et de purification. Une autre solution serait d'utiliser un AAV (Adeno-Associated Virus) codant pour FSTL1, qui est moins immunogène que l'adénovirus. Enfin, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-FSTL1 permettrait de confirmer l'effet protecteur de FSTL1 vis-à-vis de la greffe.

Nous avons pu montrer que la surexpression de FSTL1 induisait une prolongation de survie de la greffe associée à une diminution de la production des cytokines IL6, IL17A et IFN γ dans le greffon. Du fait de l'absence de modification qualitative ou quantitative de l'infiltrat, ces résultats montrent que FSTL1 pourrait jouer un rôle dans la production de ces cytokines. Afin de déterminer si l'effet de FSTL1 était systémique ou localisé uniquement au niveau de la greffe, nous avons étudié la réponse des cellules de la rate des animaux traités ou non avec l'adénovirus codant pour FSTL1. Nous avons donc prélevé les cellules spléniques de ces animaux 5 jours après la greffe et les avons restimulés *in vitro* en MLR. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 11. Les splénocytes issus de receveurs traités avec l'adénovirus FSTL1 répondent de la même façon que ceux issus de receveurs traités avec l'adénovirus contrôle. Ils prolifèrent suite à une stimulation antigénique vis-à-vis de splénocytes du même haplotype que le donneur à la même intensité que les splénocytes des animaux contrôles (Figure 11A) et ils sécrètent des quantités équivalentes d'IFN γ (Figure 11B). Il ne semble donc pas que l'exposition préalable à de forte quantité de FSTL1 puisse inhiber la réponse des lymphocytes T *in vitro*. Cependant, la présence de FSTL1 lors de l'activation de ces cellules pourrait permettre d'observer une inhibition de la réponse lymphocytaire.

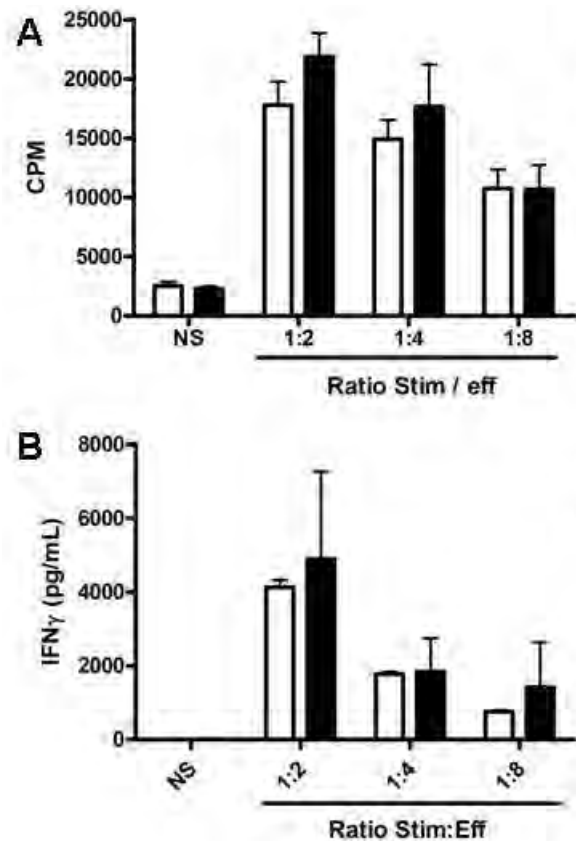


Figure 11 : Réponse des cellules spléniques issues de receveurs traités avec l'adénovirus FSTL1.

Les MLR ont été réalisés avec des splénocytes de receveurs traités avec l'adénovirus FSTL1 (barre noire) ou l'adénovirus contrôle (barre blanche) comme cellules répondeuses et des splénocytes irradiés du donneur comme cellules stimulatrices. **(A)** La prolifération est mesurée par incorporation de thymidine pendant les dernières 8h d'une culture de 5 jours. **(B)** Les surnageant de culture ont été prélevés après les 5 jours de culture et l'expression d'IFN γ a été testé par ELISA. Les barres d'erreurs représentent la moyenne +/- l'écart-type entre 3 animaux.

Par ailleurs, nous avons étudié la sécrétion de cytokines dans la rate des receveurs traités ou non avec l'adénovirus FSTL1. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 12. Nous avons extraits les ARNs des rates des receveurs traités avec l'adénovirus FSTL1 ou l'adénovirus contrôle et comparés l'expression des cytokines IL6, IFN γ et TGF β dans ces organes. L'expression de ces trois cytokines est similaire quelque soit l'adénovirus utilisé pour traités les receveurs ce qui confirme que FSTL1 aurait uniquement une action localisée au niveau de la greffe.

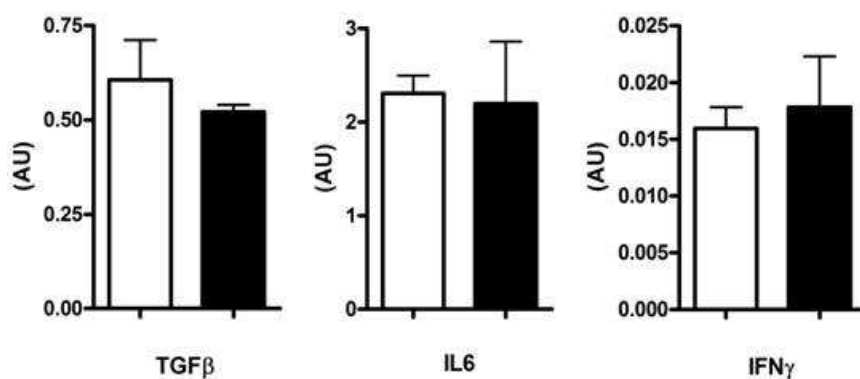


Figure 12 : Production de cytokines dans la rate des receveurs traités avec l'adénovirus FSTL1.

Les rates des receveurs traités avec l'adénovirus FSTL1 (barre noire) ou l'adénovirus contrôle (barre blanche) ont été prélevées 5 jours après la transplantation. Les ARN totaux ont été extraits et analysés par RT-PCR quantitative pour le TGFβ, l'IL6 ou l'IFNγ. l'expression de l'ANRm des différentes cytokines a été normalisée par rapport à l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU).

En conclusion, la prolongation de la survie de l'allogreffe avec la protéine FSTL1, ainsi que les résultats démontrant une diminution de la production des cytokines inflammatoires dans le greffon, suggèrent que dans notre modèle, FSTL1 pourrait avoir un rôle immunorégulateur en inhibant la réponse effectrice. En effet, nous avons précédemment démontré que la TSD induisait une population de lymphocytes T CD8+ probablement régulateurs (Douillard et al. 1999). Notre hypothèse est que ce clone serait responsable de la production de FSTL1, qui pourrait alors agir sur les APCs présentes dans le greffon et inhiberait leurs capacités à produire de l'IL6. Cette cytokine ayant été démontré comme crucial dans la différenciation des lymphocytes TH17 (Bettelli et al. 2006), la diminution d'IL6 dans le greffon pourrait être responsable d'une diminution de la différenciation TH17 et par conséquent de la diminution de production de l'IL17A, principale cytokines sécrétés par les cellules CD4⁺ de type Th17 (Bettelli et al. 2008). Cependant, nous ne pouvons pas exclure une action directe de FSTL1 sur les lymphocytes T effecteurs ou sur le greffon, puisqu'il a récemment été décrit que FSTL1 avait la capacité de promouvoir la survie des myocytes et des cellules endothéliales cardiaques (Oshima et al. 2008; Ouchi et al. 2008). Par conséquent, FSTL1 pourraient induire l'expression d'eNOS dans les cellules endothéliales et ainsi protéger ces cellules et diminuer la production de facteurs proinflammatoires (De Caterina et al. 1995).

D'autre part, il a été largement décrit que l'IL17 et les cellules le produisant les cellules Th17 jouer un rôle primordiale dans la sclérose en plaque (ou dans le modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)) (Aranami and Yamamura 2008). Suite aux résultats que nous avons obtenus sur l'effet de la surexpression de FSTL1 sur la

production d'IL17, il s'avérerait intéressant de tester l'effet de la surexpression de FSTL1 dans un modèle d'induction d'EAE.

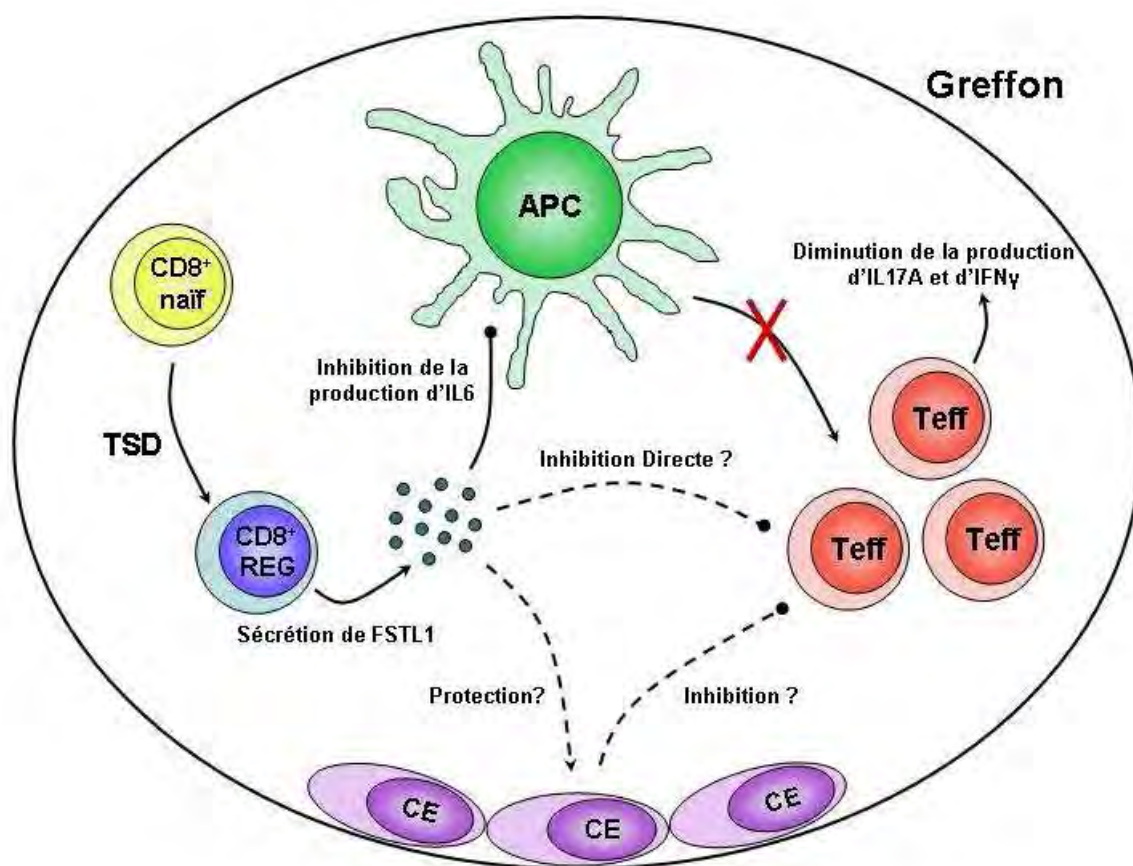


Figure 13 : Modèle hypothétique d'action de FSTL1 dans les greffons cardiaques traités par TSD

III- Caractérisation du rôle de TORID dans la réponse immune et dans l'induction de tolérance

1- La molécule TORID / Tmem176b

Notre équipe a précédemment identifiée la molécule TORID comme étant surexprimée dans le modèle de tolérance à une allogreffe cardiaque chez le rat induit par TSD (Louvet et al. 2005). Les homologues de TORID chez l'homme et chez la souris ont été identifiés préalablement et ont été dénommés respectivement LR8, identifié dans une sous-population fibroblastique pulmonaire (Lurton et al. 1999), et Clast1, identifié comme étant surexprimée dans les lymphocytes B suite à une stimulation avec du CD40 ligand (Maeda et al. 2006). Depuis, TORID a été renommée pour éviter la multiplication des dénominations et porte désormais le nom de Tmem176b. Le Gène codant pour Tmem176b chez le rat est localisé sur le chromosome 4 et chez la souris, sur le chromosome 6. Ce gène est composé de 7 exons et 6 introns, et le transcrite correspondants est formée de 1659 pb. La protéine correspondante est composée de 263 AA et son poids moléculaire est estimé à environ 28 KDa.

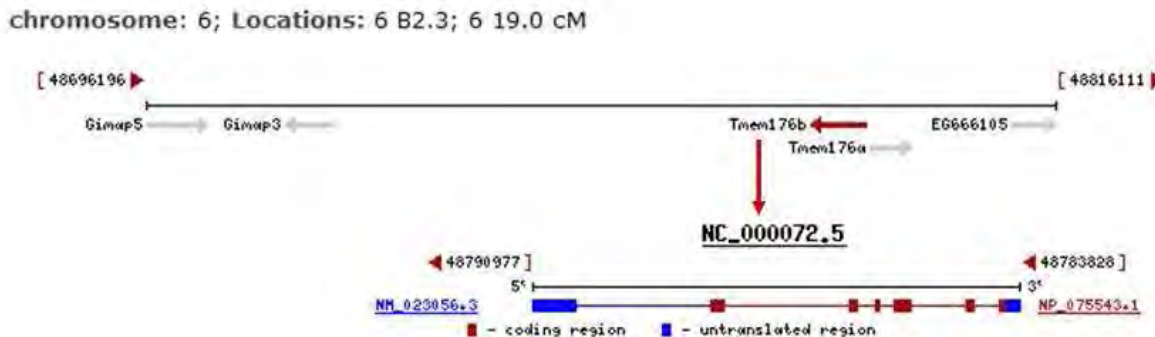


Figure 14 : Localisation chromosomique et structure du transcrit codant pour TORID chez la souris.

A l'origine, suite à l'analyse structurale et protéique de TORID, notre équipe avait rattaché la molécule TORID à la famille MS4A composée d'une vingtaine de molécules dont le CD20 ou la molécule Htm4. Les molécules de cette famille comme TORID, sont composée de quatre domaines transmembranaires. Elles sont exprimées en majorité par les cellules hématopoïétiques et possèdent des localisations et des fonctions diverses. Cependant, la molécule la plus proche de TORID est connue sous les noms de HCA112, GS188 ou plus récemment sous le terme de Tmem176a. Cette molécule a été clonée et

identifiée comme étant un antigène associé au carcinome hépatocellulaire (Wang et al. 2002) et a aussi été identifiée comme surexprimé dans les tubules proximaux de reins protéinuriques (Nakajima et al. 2002). Cependant, aucune fonction n'a été décrite pour cette molécule à l'heure actuelle. Ce gène est localisé sur le même chromosome que TORID, juste à côté de ce dernier en position inversée.

A l'heure actuelle, très peu d'études ont été réalisées pour caractériser la fonction de TORID. Maeda et collaborateurs ont montré que la déficience de TORID engendrait une ataxie sévère chez 65% des animaux et que TORID était impliquée dans le développement des cellules cérébelleuses (Maeda et al. 2006). Ils ont générées leur souris déficiente pour TORID dans le même temps que nous. Ce groupe avait identifié cette molécule comme surexprimée suite à la stimulation des lymphocytes B avec du CD40 ligand, cependant ils n'ont pas observé d'anormalité fonctionnelle dans les lymphocytes B issues des animaux déficients pour TORID.

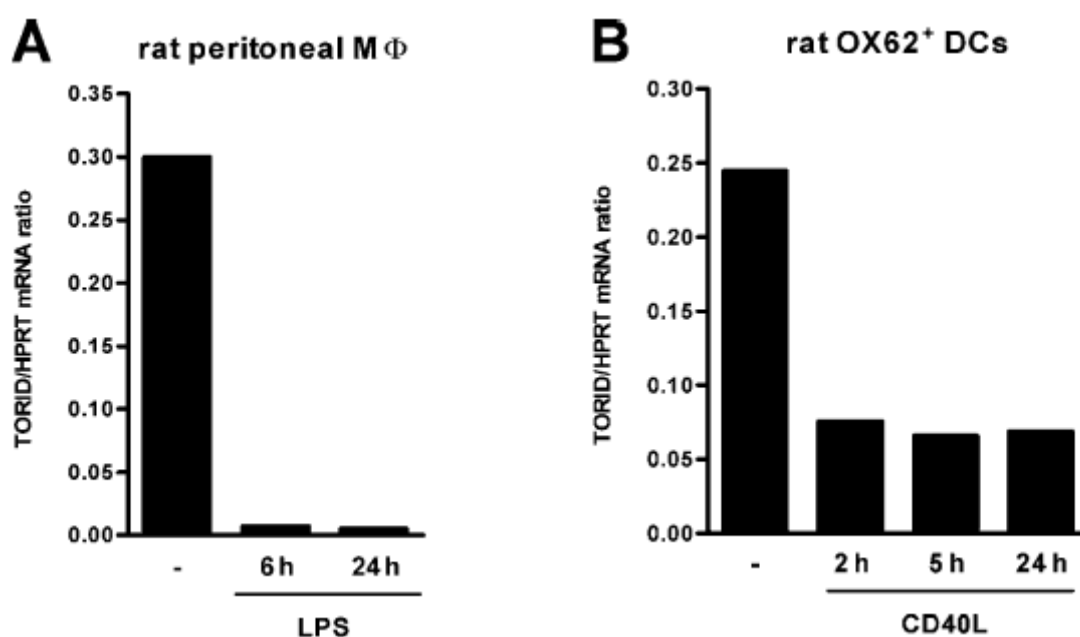


Figure 15 : Diminution de l'expression de TORID suite à la maturation des cellules myéloïdes chez le rat. D'après Louvet et al. (Louvet et al. 2005).

La caractérisation de l'expression de TORID, chez le rat, a permis de rattacher son expression aux cellules myéloïdes (Macrophages et cellules dendritiques) (Louvet et al. 2005). Des analyses par immunofluorescence ont révélé que la protéine TORID semblait localisée à la membrane nucléaire ou, au moins, dans une structure très proche du noyau des cellules myéloïdes, ce qui suggère une fonction intracellulaire. De façon intéressante,

notre équipe a pu montrer que l'expression de l'ARNm de cette molécule était drastiquement régulée suite à la maturation de ces cellules par différents stimulus (LPS, CD40L, TNF α + polyI:C...) et cela chez le rat (Figure 15) mais aussi chez l'homme. L'infection de cellules dendritiques, avec un adénovirus codant pour TORID et la GFP, a, de plus, permis de démontrer que la surexpression forcée de TORID bloque les cellules dans un état immature (pas d'augmentation des molécules de costimulation suite à une stimulation par le LPS et diminution de la production d'IL12p70) (Figure 16). Ces derniers résultats laisse fortement penser que TORID pourrait jouer un rôle dans la tolérance immunitaire puisque les cellules dendritiques immatures ont été décrites de nombreuses fois dans la littérature comme ayant des propriétés tolérogènes (Lutz and Schuler 2002).

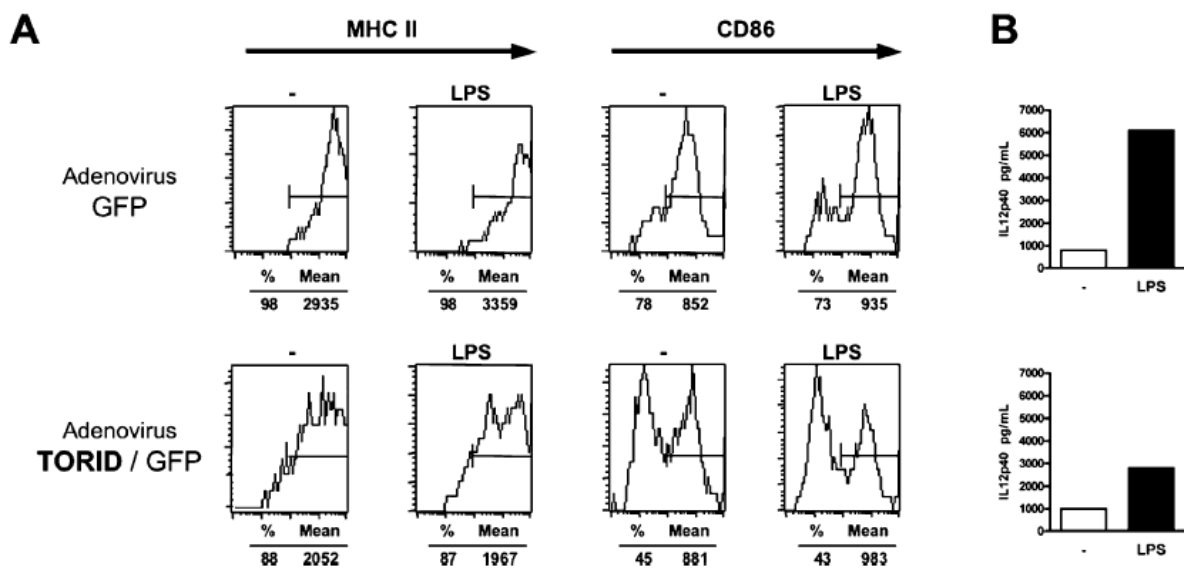


Figure 16 : La surexpression de TORID bloque les cellules dendritiques dans un état immature. D'après Louvet et al. (Louvet et al. 2005).

2- Résultats obtenus et discussion

Nos précédents résultats ont montré que TORID pouvait être une nouvelle molécule impliquée dans les mécanismes régulateurs du système immunitaire faisant intervenir de nombreux types cellulaires (Tregs, les DCs tolérogéniques, les MDSC...). Afin de mieux comprendre dans quelles mesures TORID pouvait être impliquées dans ces mécanismes régulateurs nous avons poursuivi l'étude de cette molécule, chez la souris, espèce dans laquelle beaucoup plus d'outils sont disponibles. Lors de cette étude, nous avons donc essayé de déterminer avec quelles molécules TORID pouvait interagir, nous nous sommes de plus attachés à caractériser l'expression et la régulation de cette molécule chez la souris, et enfin nous avons étudié la fonction de TORID dans les cellules dendritiques et les MDSC, ainsi, que son implication dans deux modèles *in vivo*, un de tolérance à une greffe de peaux et un de développement tumorale à l'aide des souris déficientes pour TORID.

2.1 Détermination des molécules pouvant interagir avec TORID

Afin de déterminer quelles molécules peuvent interagir avec TORID, nous avons réalisé une analyse utilisant le système de double hybride en collaboration avec le groupe de H. Waldmann à Oxford. Cette technique consiste à générer des molécules de fusion, un appât représentant la molécule d'intérêt fusionné au domaine Cub de l'ubiquitine et au facteur de transcription LexA et une proie représentant la possible molécule interagissant fusionnée au domaine Nub de l'ubiquitine.

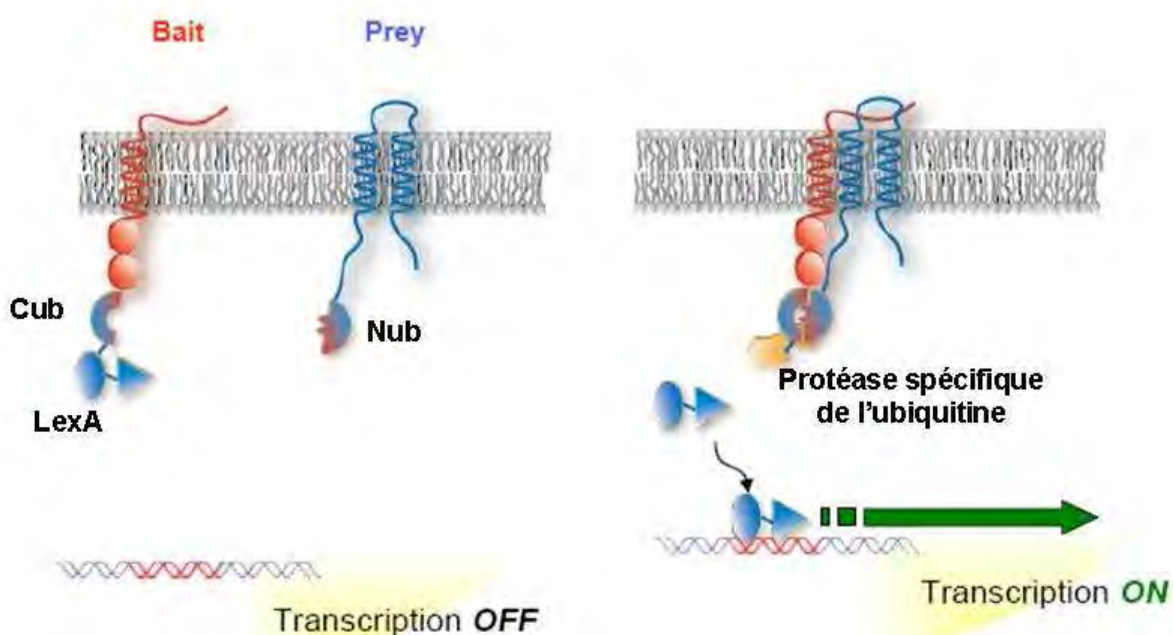


Figure 17 : Représentation du système de double hybride.

L'interaction de la proie et de l'appât permet de réassembler les domaines Cub et Nub de l'ubiquitine qui va pouvoir être clivé par des protéases spécifiques de cette dernière et ainsi libérer le facteur de transcription LexA (Figure 17). Afin de tester de nombreuses molécules, une banque de proie est réalisée. Lors de nos expériences, nous avons utilisé une banque générée à partir de cDNA de cellules régulatrice murines. Suite à au criblage de la banque, nous avons obtenu environ 200 clones qui ont été séquencés et analysés à l'aide du logiciel NCBI nBlast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Parmi ces 200 clones positifs, nous avons identifiés en particulier, TORID lui-même (4 clones codant pour TORID), suggérant que TORID pourrait former des homodimères, HCA112/Tmem176a (39 clones codants pour HCA112), une molécule très proche de TORID appartenant à la même famille qui pourrait former des hétérodimères avec TORID, ainsi que d'autres molécules telles que la β 2-microglobuline (15 clones), le facteur de transcription IRF3 (1 clone), la protéine LAT (1 clone) (linker for activation T cells)... Nous avons donc essayé confirmer certaines de ces interactions à l'aide d'un test de dépendance à l'appât (Figure 18).

Seules les interactions de TORID avec lui-même et avec HCA112 ont pu être confirmées. La β 2-microglobuline apparaît, par contre, comme un faux positif issu du criblage de la librairie. Ces résultats nous permettent donc de conclure que TORID peut interagir avec la molécule HCA112, molécules de la même famille situé juste à coté sur le chromosome 6, mais aussi avec lui-même. Nous pouvons donc penser que ces molécules réalisent des multimères et exercent ainsi leurs effets biologiques. Plusieurs hypothèses sont à envisager. La première serait que TORID forment des homomultimères et exerce ses effets biologiques par lui seul, dans ce cas de figure, HCA112 pourrait se lier à TORID et soit augmenter soit inhiber sa fonction. La deuxième hypothèse serait que TORID et HCA112 forment des hétéromultimères et qu'ils aient réciproquement besoin l'un de l'autre pour médié leurs effets biologiques. A l'heure actuelle, nous ne pouvons pas dire quelle hypothèse est la bonne mais l'inhibition de l'expression de ces 2 molécules séparément en utilisant la techniques des SiRNA pourrait nous permettre de déterminer si ces deux molécules ont la même fonction fait qui soutiendrait la deuxième hypothèse ou si une de ces deux molécules régulent la fonction de l'autre, fait qui soutiendrait la première hypothèse.

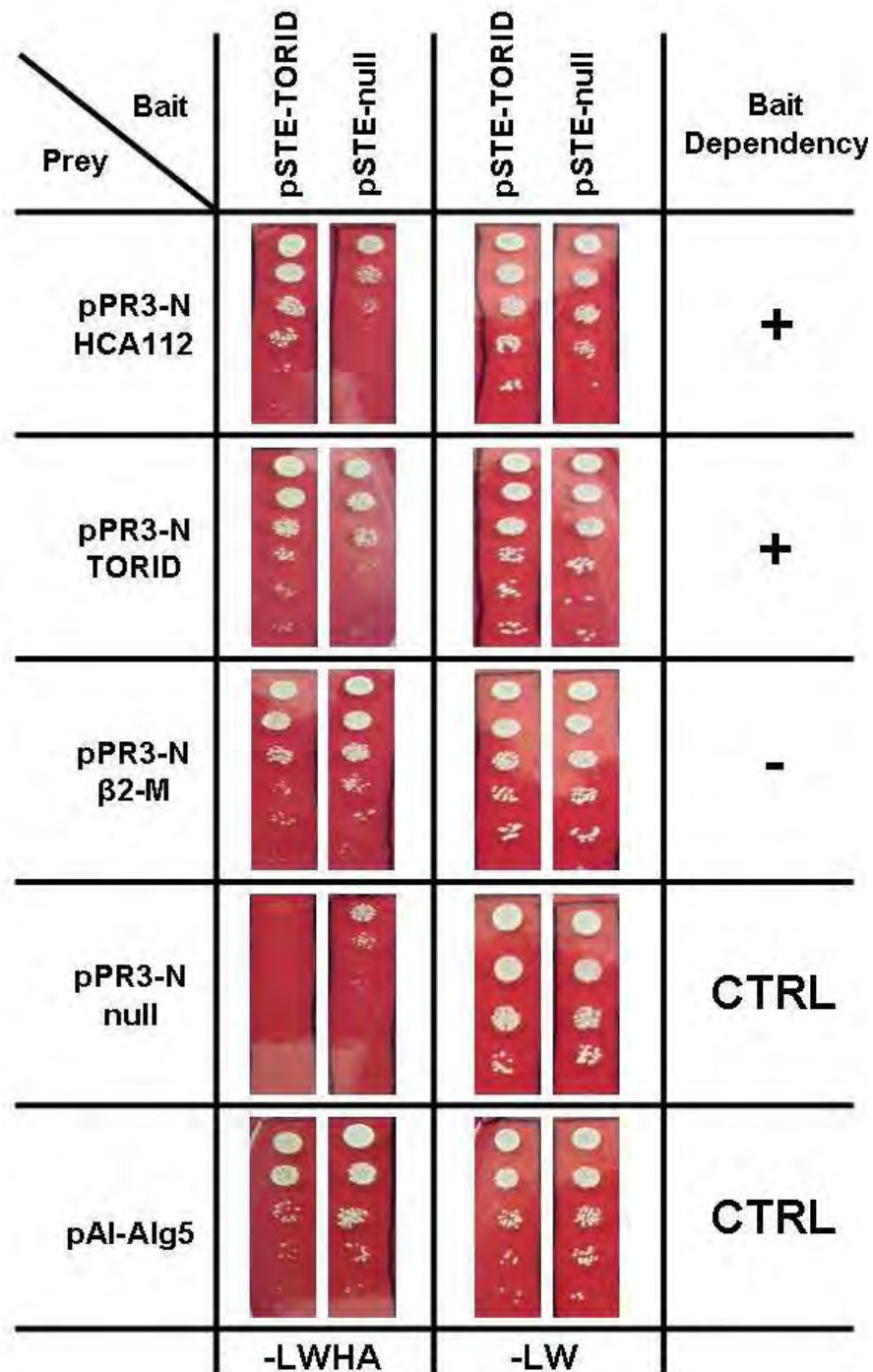


Figure 18 : Test de dépendance à TORID des différents clones issus du criblage de la librairie par la technique de double hybride.

Les plasmides codant pour les molécules de fusion HCA112-Nub, TORID-Nub et β2-microglobuline-Nub ont été co-transformés dans des levures avec le plasmide codant pour la molécule de fusion TORID-Cub-LexA. Ces levures ont ensuite été mises en culture sur des milieux de sélection déplétés en leucine, tryptophane, histidine et adénine (LWHA) ou déplétés en leucine et tryptophane (LW). La résistance à l'absence de leucine et de tryptophane est apportée par les plasmides codant l'appât et la proie respectivement. La résistance à l'absence d'histidine et d'adénine est-elle sous le contrôle du facteur de transcription LexA localisés dans le noyau uniquement lors de l'interaction de la proie avec l'appât qui permet le clivage de l'ubiquitine et la translocation du facteur LexA dans le noyau. Les cultures de levures ont été déposées suivant une gamme de dilution pour permettre de déterminer jusqu'à quel dilution les levures arriver encore à pousser sur le milieu de sélection. La pousse sur

milieu déplétés en LW permet de vérifier la co-transformation des deux plasmides. Les plasmides pPR3-N null et pAI- ALG5 représentent les contrôles d'interaction négatif et positif, respectivement.

2.2 Etude de l'expression de TORID et HCA 112 chez la souris

Nous avons précédemment décrit que TORID est exprimé, chez le rat, principalement par les cellules myéloïdes et que son expression est diminuée suite à la maturation de ces cellules (Louvét et al. 2005). Dans le but d'étudier la fonction de cette molécule chez la souris, il nous a semblé important de commencer par caractériser son expression ainsi que celle de la molécule HCA112 qui pourrait interagir avec TORID. Pour cela, nous avons analysé leur expression par PCR quantitative dans des cellules isolées à partir de splénocytes de souris (Figure 19).

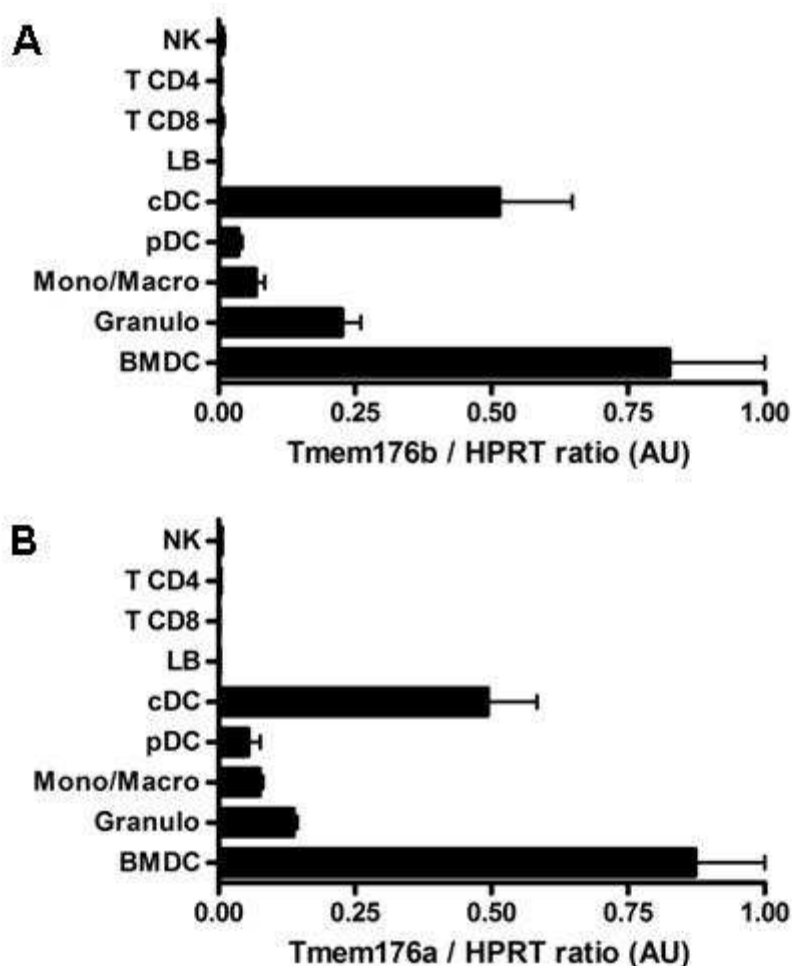


Figure 19 : expression de TORID (*Tmem176b*) et HCA 112 (*Tmem176a*) dans des cellules immunitaires naïves chez la souris.

Les cellules T CD4 (CD3⁺CD4⁺), T CD8 (CD3⁺CD8⁺), NK (DX5⁺), B (B220⁺), les DCs conventionnelles (CD11c^{Hi}), les DCs plasmacytoïdes (CD11c^{Lo}B220⁺), les monocytes/macrophages (CD11b⁺Gr1⁻) et les granulocytes (CD11b⁺Gr1⁺) ont été isolées par cytométrie de flux. Les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) ont été obtenues par culture des cellules de la moelle osseuse en

présence de GM-CSF durant 10 jours. Les ARNs ont ensuite été isolées et analysées par RT-PCR quantitative pour l'expression de TORID (**A**) et HCA112 (**B**). L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU). Ces résultats représentent la moyenne de l'expression de ces molécules dans trois échantillons distincts.

Ces résultats montrent que, comme chez le rat, TORID est exprimée principalement dans les cellules myéloïdes et à des niveaux très faibles dans les cellules lymphoïdes telles que les lymphocytes T, B ou NK. Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) présentent les plus fortes expressions de TORID. De façon très intéressante, nous avons pu montrer que la molécule HCA112 présente le même profil d'expression que celui de TORID dans les cellules naïves du système immunitaire chez la souris.

2.3 Etude de la régulation et de la fonction de TORID

a- régulation de TORID et HCA112 dans les cellules dendritiques

Nous avons précédemment montré que chez le rat la maturation des cellules dendritiques induit une forte diminution de l'expression de TORID. Nous avons donc voulu savoir comment l'expression de ces molécules est régulée suite à la maturation des cellules dendritiques chez la souris. Pour cela, nous avons stimulé des BMDCs avec différents ligands de TLR et analysé l'expression de ces deux molécules (Figure 20). Le LPS induit une diminution de l'expression de TORID alors que le pl:C n'induit pas de modification de son expression.

D'autre part, nous avons essayé d'induire l'expression de TORID en utilisant différentes cytokines décrites comme induisant un phénotype tolérogène des DCs tel que le TGF β et l'IL10 (Morelli and Thomson 2007) mais n'avons pas pu mettre en évidence une induction de TORID dans les cellules dendritiques en les cultivant en présence de ces cytokines. D'autre part, nous souhaiterions analyser l'effet d'autres agents immunomodulateurs tel que la prostaglandine E2, la vitamine D3 ou encore la dexaméthasone. Plusieurs groupes du consortium européen Riset ont analysé l'expression de TORID dans des DCs murines traitées avec de la dexaméthasone et ont montré que ce traitement permet l'induction de TORID (résultats non publiés). Il serait donc intéressant d'analyser l'implication de TORID dans les effets médiés par cet agent.

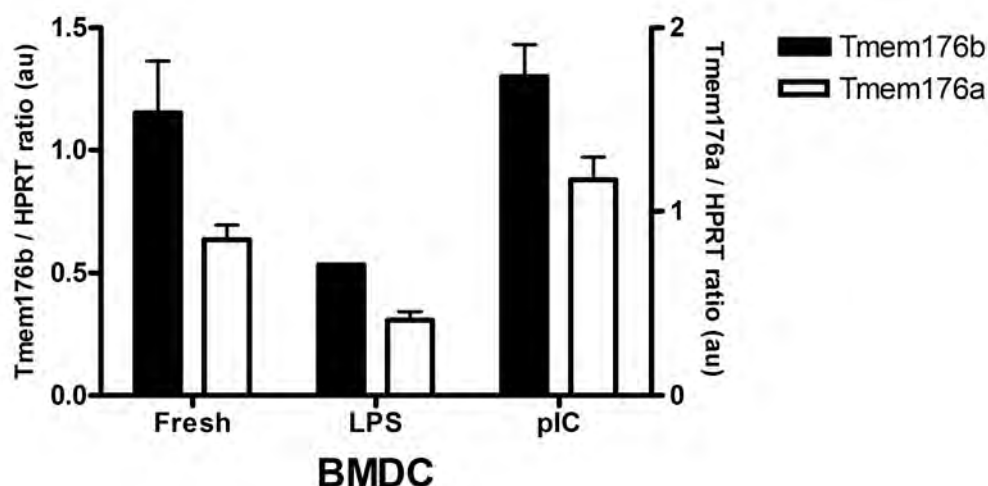


Figure 20 : régulation de l'expression de TORID (*Tmem176b*) et HCA112 (*Tmem176a*) dans les cellules dendritiques chez la souris.

Les BMDCs ont été obtenus par culture des cellules de la moelle osseuse en présence de GM-CSF durant 8 jours. Ces cellules ont ensuite été remis en culture en présence ou non de ligands de TLR (LPS ou pI:C) durant 24h. Les ARNs totaux ont ensuite été isolés et analysés par RT-PCR quantitative pour l'expression de TORID (barre noire) et HCA112 (barre blanche). L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU). Ces résultats représentent la moyenne de l'expression de ces molécules dans trois échantillons distincts.

b- Génération de souris déficientes pour la molécule TORID

Afin de caractériser la fonction de TORID, nous avons généré en collaboration avec la clinique de la souris à Strasbourg des souris déficientes pour le gène TORID (souris KO-TORID). Pour cela, nous avons délété les exons 1 et 2 (l'exon 2 contient le codon initiateur de la traduction) de notre molécule d'intérêt ainsi que 600 pb du en amont de l'exon 1 afin d'éliminer le promoteur minimale de TORID (Figure 21) et ceci dans le but d'éviter la production d'une protéine tronquée. Le groupe de T. Tokuhisa a générés en même temps que nous des souris KO pour TORID mais n'ont pas utilisé la même construction que nous (Maeda et al. 2006). En effet, ils ont uniquement délété l'exon 2 qui comporte le codon initiateur.

Nous avons ensuite analysé le phénotype de ces animaux (50% C57Bl/6 ; 50% Sv129) avant de les avoir ramené sur un fond génétique unique (développement de la lignée C57Bl/6 en cours). Ces animaux ne présentent pas d'altération du développement en ce qui concerne le poids, la taille, le développement des organes. De plus, nous avons réalisé un phénotype des cellules immunitaire de ces animaux. Aucune différence par rapport à des animaux non déficients n'a pu être observée en termes de populations cellulaires (% identiques des différentes populations T, B, NK, monocytes / macrophages, cellules dendritiques...) et d'activations cellulaires. D'autre part, nous n'avons pas observé de développement d'ataxie dans nos souris contrairement aux résultats publiés par maeda et

collaborateurs (Maeda et al. 2006). Cela pour s'expliquer par le fait que nous n'avons pas utilisé la même stratégie pour délété le gène TORID.

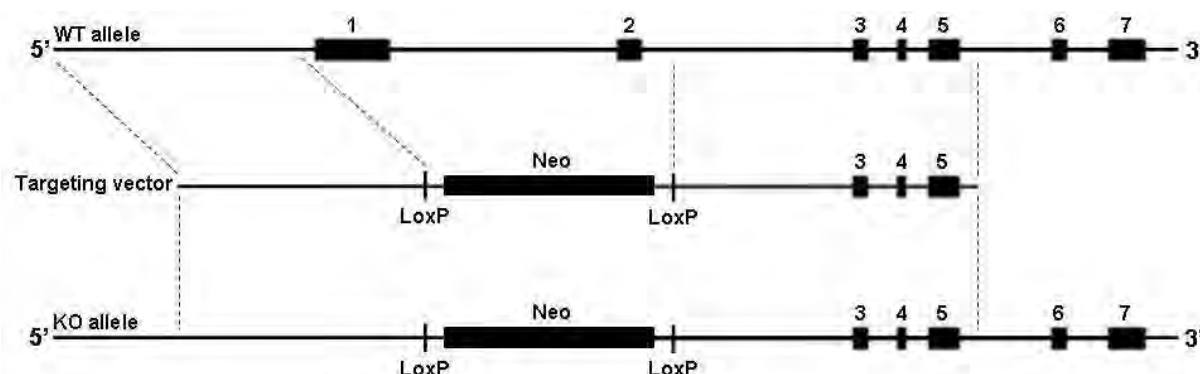


Figure 21 : Construction utilisé pour la génération des souris KO-TORID.

De plus, nous avons analysé la réponse immunitaire de ces animaux face à une immunisation avec une protéine exogènes, la KLH (Keyhole lymphet Hémocyanin). Pour cela, nous avons immunisé des souris avec de la KLH associé à de l'adjuvant complet de freund dans le coussinet plantaire et avons analysé la réponse humorale et la réponse cellulaire secondaire 7 jours après immunisation (Figure 22). Nous avons pu montrer que les animaux déficients pour TORID présentent une réponse cellulaire et une réponse humorale similaire à celle des animaux non déficients. Il semblerait donc que TORID n'intervient pas dans la réponse immunitaire. Notre hypothèse est que TORID jouerait un rôle dans les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire et non durant les phases initiatrice ou effectrice de la réponse immunitaire.

Cependant, cette analyse va être réalisée de nouveau sur les souris ramenées sur un fond génétique unique (C57Bl/6).

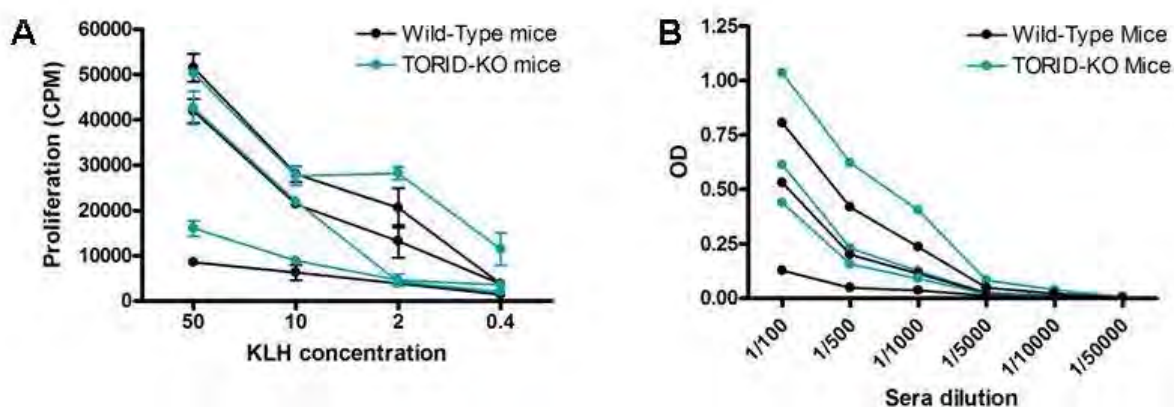


Figure 22 : Réponse immunitaire des animaux déficients pour TORID vis-à-vis d'une immunisation à l'aide d'une protéine exogènes.

7 jours après l'immunisation dans le coussinet plantaire des animaux (n=3 pour chaque groupe) avec de la KLH associé à du CFA, les ganglions drainants ont été prélevés ainsi que le sérum. **(A)** Les cellules ganglionnaires ont été restimulés in vitro avec des doses décroissantes de KLH et la prolifération a été mesurée après 3 jours de culture par incorporation de thymidine tritiée durant les 8 dernières heures de culture. Les résultats sont exprimés en CPM et ont été réalisés en triplicatas. **(B)** Les anticorps anti-KLH ont été dosés directement dans le sérum des animaux par ELISA. Les résultats sont exprimés en densité optique (OD) et chaque mesure à été réalisés en triplicatas.

c- Etude de la fonction de TORID dans les cellules dendritiques

Comme notre équipe avait précédemment démontré que la surexpression de TORID pouvait bloquer les cellules dendritiques dans un état immature et empêcher par conséquent la maturation induite par le LPS (Louvet et al. 2005), nous avons donc voulu analyser les cellules dendritiques issues de ces animaux déficients pour TORID et essayer d'approfondir le rôle de TORID dans ces cellules. Pour cela, nous avons généré des BMDCs issues d'animaux déficients pour TORID ou non déficients en se basant sur la méthode de culture décrites par Lutz et ses collaborateurs (Lutz et al. 1999). Brièvement, les cellules de la moelle osseuse sont prélevées à partir des tibias et fémur des souris et sont ensuite mises en culture, dans des boîtes de bactériologie, pendant 8 jours en présence de GM-CSF en ajoutant du milieu frais supplémenté en GM-CSF aux jours 3 et 6 de culture. Nous avons ensuite remis en culture les cellules durant 24 heures en présence ou non de LPS et avons analysé leur phénotype, leur sécrétion de cytokines ainsi que leur capacité à stimuler des cellules T naïves (Figure 23). Nous avons pu montrer que les DCs déficientes pour TORID présenteraient une expression du CD86 et du CD40 légèrement augmenté par rapport aux cellules non déficientes pour TORID. La même tendance est observée dans les cellules non stimulées ce qui suggère que l'absence de TORID engendrerait un phénotype légèrement plus mature. De la même façon, Les cellules issues des animaux KO pour TORID sécrètent de plus grande quantité d'IL12p70 suite à la stimulation de ces dernières avec du LPS. Cependant, Ces cellules n'induisent pas une prolifération plus élevée de lymphocytes T allogéniques. Les capacités stimulatrices de ces cellules dans ces conditions ne semblent donc pas modifier en comparaison de celle des cellules issues d'animaux non déficients. Les cellules dérivées des animaux KO semblent donc répondre de façon plus importante à une stimulation par le ligand du TLR4 surtout du point de vue de la sécrétion d'IL12p70.

Nous souhaitons maintenant recommencer ces analyses sur les cellules issues des animaux KO ramenés sur un fond génétique unique. De plus, il serait intéressant de tester les capacités d'endocytose et de phagocytose de ces cellules. Les résultats issus de la MLR semblent montrer que l'absence de TORID ne modifie les capacités stimulatrices de ces cellules mais nous aimerions tester leur capacité stimulatrice sur les différentes sous-populations de lymphocytes T. Pour cela, nous incuberons les cellules dendritiques avec de l'OVA et testerons leur capacité à stimuler des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ spécifiques de

cet antigène (Souris transgénique OT1 ou OT2). D'autre part, nous avons observés que de très faible différence dans la maturation des cellules dendritiques. Cependant, notre hypothèse étant que TORID interviendrait dans les propriétés tolérogènes des DCs, nous testerons aussi les capacités des DCs déficientes pour TORID dans des conditions tolérogènes (Traitement à la dexaméthasone, Vitamine D3...). Nous nous sommes, de plus, intéressés à la fonction de TORID dans une population de cellules myéloïdes régulatrices, les MDSC.

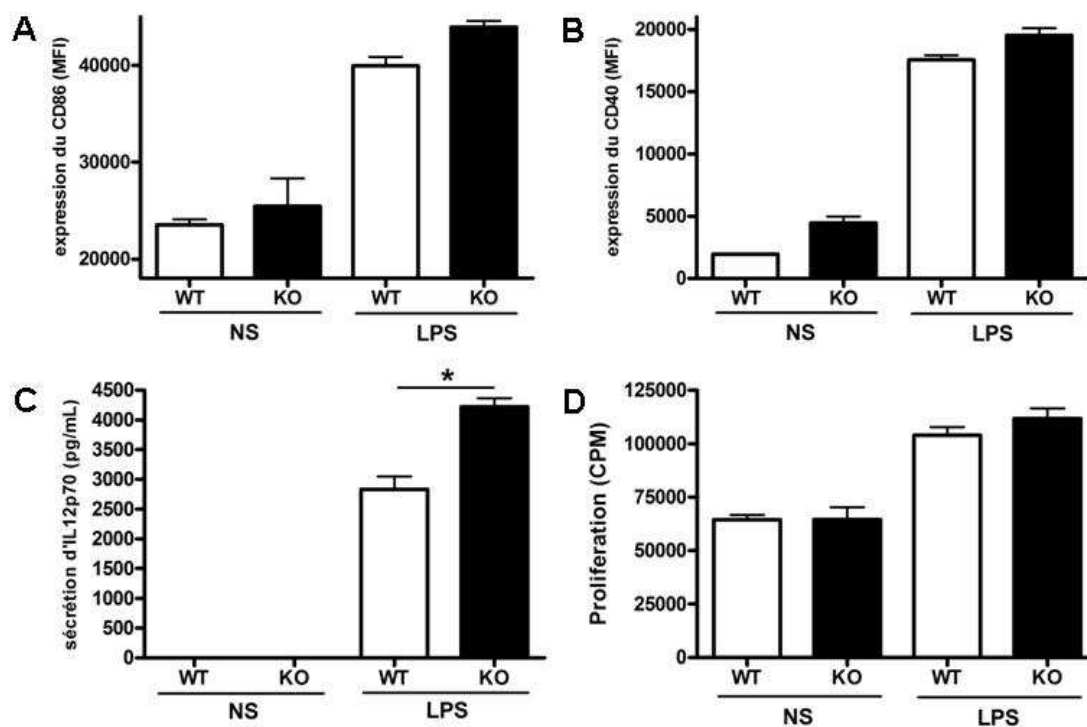


Figure 23 : Phénotype, sécrétion d'IL12p70 et capacité stimulatrice des BMDCs dérivées des animaux déficients pour TORID.

Les BMDCs ont été récupérées après 8 jours de culture et remis en culture pendant 24h en présence ou non de LPS. Le phénotype de ces cellules a alors été analysé par cytométrie de flux sur un FACS LSRII. L'expression du CD86 (A) et du CD40 (B) sont exprimée en moyenne de fluorescence (MFI). (C) Les surnageants ont également été prélevés suite à la stimulation et analysés par ELISA afin de déterminer la sécrétion d'IL12p70. L'ensemble de ces résultats représente la moyenne de 6 échantillons différents. (D) Les BMDCs ont été remis en culture lymphocytaire mixte en présence de cellules ganglionnaires de souris Balb/c (CMH allogénique) pendant 3 jours. La prolifération a été déterminée par incorporation de thymidine tritiée durant les huit dernières heures de culture. Les résultats sont exprimés en CPM, ont été réalisés en triplicatas et représentent la moyenne de trois animaux différents dans chaque groupe.

2.4 Etude de l'expression, de la régulation et de la fonction de TORID dans les MDSC

Une population de cellules myéloïdes immature à différents stades de différenciation a été identifiée dans des modèles murins de tumeurs comme ayant des propriétés

immunosuppressives (Pekarek et al. 1995; Seung et al. 1995). Ces cellules ont récemment fait l'objet de multiples études et ont été regroupés sous le terme de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (Gabrilovich et al. 2007). Plus récemment, un rôle de ces cellules a été décrits dans des modèles de tolérance à une greffe (Dugast et al. 2008; De Wilde et al. 2008 Submitted). L'expression de TORID étant principalement restreinte aux cellules myéloïdes immatures et le fait que nous l'ayons identifiée comme étant surexprimées dans un modèle de tolérance à une allogreffe cardiaque, qui est fortement infiltrées par des cellules de type myéloïde, nous a laissé penser que ces MDSC pourraient exprimer TORID et que notre molécule pourrait jouer un rôle dans la biologie de ces cellules.

a- Expression de TORID dans les MDSC.

Premièrement, nous avons voulu tester l'hypothèse que TORID pourrait être exprimée par les MDSC. Pour pallier le fait que ces cellules ne sont présentes qu'en faible quantité dans la rate d'une souris naïve (0,5 à 2%), nous avons utilisé trois modèle pour induire l'accumulation / expansion des MDSC : l'injection de GM-CSF recombinant (Sica and Bronte 2007), l'administration de LPS (2 faibles doses tolérogéniques et une forte dose le troisième jour) (De Wilde et al. 2008 Submitted) et l'injection de tumeur transplantable (Gallina et al. 2006). Le groupe de V. Bronte a récemment décrit que cette population suppressive, classiquement identifié par les marqueurs CD11b et Gr1, pouvait être phénotypée plus précisément en utilisant les marqueurs CD11b et CD124. Nous avons donc purifiés les cellules spléniques de souris porteuses de tumeurs et analysé l'expression de TORID (Figure 24). Nos résultats montrent que TORID est fortement exprimé par les MDSC (CD11⁺Gr1⁺CD124⁺) mais que faiblement par les cellules granulocytaires. De plus, l'expression de TORID est dix fois plus forte dans les MDSC en comparaison de l'expression dans les autres cellules spléniques d'une souris porteuse de tumeur. Des taux similaires de TORID ont été observés dans les MDSC induites par injection de LPS ou de GM-CSF.

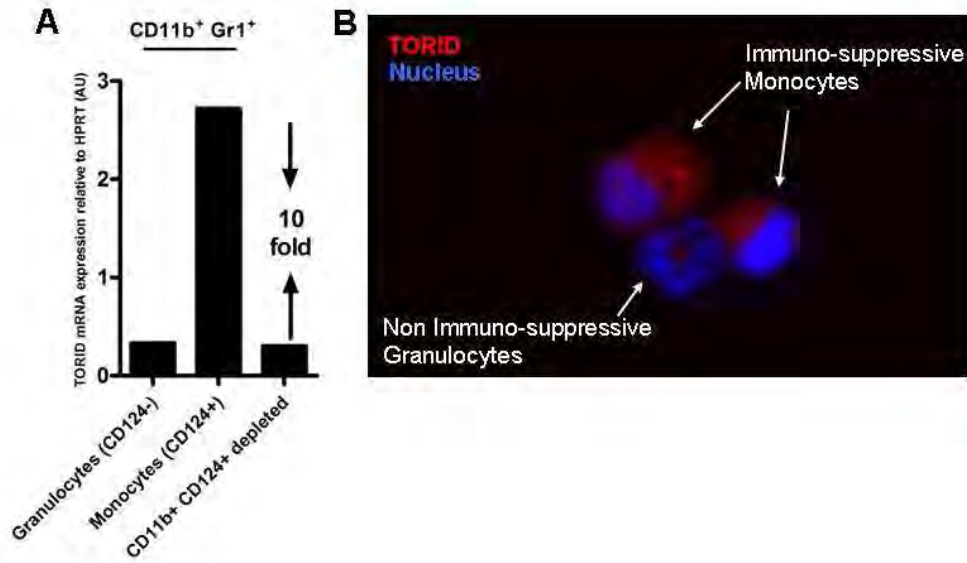


Figure 24 : Expression de TORID par les MDSC.

(A) analyse de l'expression de l'ARNm de TORID par PCR quantitative dans les MDSC purifié à partir de splénocytes de souris porteuses de mélanomes B78H1. Les cellules $CD11b^+Gr1^+CD124^+$ (cellules suppressives de type monocyttaire) et les cellules $CD11b^+Gr1^+CD124^-$ (granulocytes non-suppressifs) ont été purifiées par cytométrie de flux. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'HPRT et sont exprimés en valeur arbitraire (AU). (B) Expression de TORID au niveau protéique. Les MDSC ($CD11b^+GR1^+$) ont été marqués par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-TORID (marquage rouge) et du DAPI (marquage bleu) qui marque l'ADN. Les granulocytes et les monocytes sont différenciés à l'aide de la morphologie de leur noyau.

b- Implication de TORID dans la régulation des enzymes

immunosuppressives clé des MDSC

Les principaux mécanismes d'action décrit pour ces cellules impliquent deux enzymes immunorégulatrices : l'arginase 1 et iNOS (Marigo et al. 2008). Suivant notre hypothèse que TORID pourrait être impliquées dans la biologie de ces cellules, nous avons analysés l'expression de ces deux enzymes ainsi que la production de radicaux oxygénés dans des MDSC dérivées d'animaux déficients pour TORID (Tableau 1). Nous avons aussi analysés l'expression de l'enzyme HO1, récemment décrits comme pouvant intervenir dans les propriétés suppressives des MDSC (De Wilde et al. 2008 Submitted), et de l'enzymeIDO, jamais décrit pour le moment dans ces cellules (Tableau 1).

	Arg-1	iNOS	HO-1	ROS	IDO
WT NT	++++	-	+/-	+++	+
KO NT	-	-	+/-	++	+/-
WT IFN-γ	-	+	-	+++	+++
KO IFN-γ	++	+++	++++	+	+

Tableau 1 : Expression et régulation des enzymes immunorégulatrices dans les MDSC déficientes pour TORID.

L'expression de l'arginase-1, iNOS, HO1 et IDO a été quantifiée par la technique de western-blot dans les MDSC cultivées en présence ou non d'IFN γ pendant 24 heures. La production de réactifs oxygénés (ROS) a été analysée par cytométrie de flux à l'aide d'une sonde fluorescente sur les mêmes échantillons. Ce tableau récapitulatif représente les résultats de trois expériences indépendantes.

Nous avons observés que HO1 est très fortement exprimé suite à la stimulation à l'IFN γ des MDSC issues d'animaux déficients pour TORID. Du fait que HO1 soit connu pour avoir des propriétés anti-oxydantes, notre hypothèse est que la forte expression de HO1 pourrait être responsable de la faible production de ROS dans ces cellules. De plus, l'inhibition de l'activité de HO1 par l'intermédiaire d'un inhibiteur spécifique (le SnPP) permet de supprimer les différences de production de ROS entre les cellules déficientes pour TORID et les cellules contrôles. D'autre part, l'expression d'IDO est significativement diminuée dans les MDSC déficientes pour TORID. Notre hypothèse est donc que TORID favorise l'expression d'IDO et la production de ROS tout en inhibant celle d'HO1. Des différences significatives ont aussi été observées pour l'expression des enzymes Arginase-1 et iNOS. Afin de mieux comprendre comment TORID intervient dans la biologie de ces cellules et régule ces différentes enzymes, nous allons mesurer l'activité enzymatique de ces molécules et il pourrait s'avérer utile d'inhiber ces enzymes pour déterminer si elles peuvent aussi réguler l'expression de TORID. Ces études nous permettraient de mieux comprendre comment TORID intervient dans ce réseau complexe d'enzymes immunosuppressives exprimés par les MDSC (Figure 25).

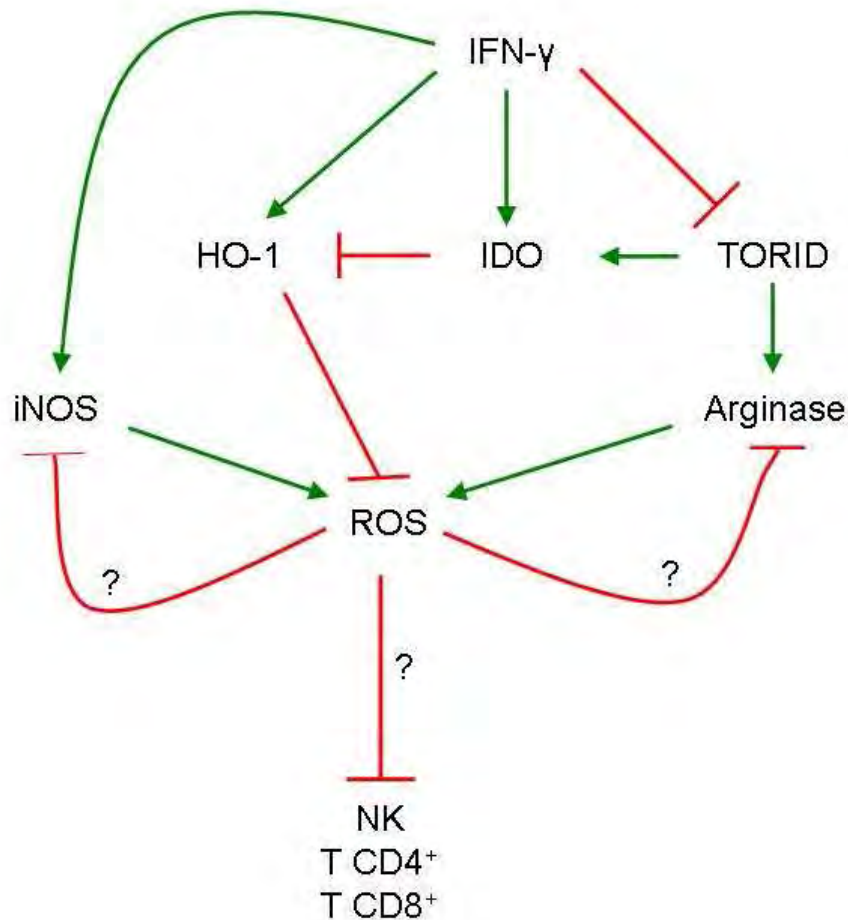


Figure 25 : Modèle hypothétique d'interaction de TORID avec les enzymes immunosuppressives dans les MDSC.

Basée sur l'expression et la régulation des différentes enzymes (IDO, HO1, iNOS et l'arginase) après traitements à l'IFN γ , nous posons l'hypothèse de comment TORID pourrait interagir avec ces différentes enzymes et ainsi réguler la réponse immune.

Une autre approche afin de déterminer l'implication de TORID dans la biologie de ces cellules serait de réaliser des puces à ADN afin de comparer les MDSC issues de souris déficientes pour TORID à des souris normal avant et après traitement à l'IFN γ .

c- Rôle de TORID et des MDSC dans un modèle de greffe de peaux

Comme TORID a été identifié dans un modèle de tolérance à une allogreffe cardiaque chez le rat, nous voulions aussi tester le rôle de TORID dans l'induction d'une tolérance chez la souris en utilisant nos animaux KO comme donneur ou receveur. Le groupe de A. Lemoine ayant récemment décrit un modèle de prolongation de la survie d'une greffe de peaux chez la souris (greffe de peaux d'un male sur une femelle receveuse) (De Wilde et al. 2008 Submitted). Dans ce modèle, La prolongation de survie est induite par traitement des donneurs et des receveurs avec du LPS 7, 6 et 5 jours avant la greffe (2

faibles doses aux jours -7 et -6 et une dose plus forte 5 jour avant la greffe) et un rôle des MDSC a été décrit dans ce modèle. En effet, le transfert de ces cellules à des receveurs naïfs non traités permet d'induire une prolongation de la survie de l'allogreffe. L'hypothèse que TORID puisse intervenir dans ce modèle paraissait donc comme concevable. Nos expériences montrent que lors de ce traitement, on observe une accumulation de ces cellules dans la rate des souris déficientes ou non pour TORID. Le pourcentage représenté par ces cellules passe de 0,5-2% chez une souris naïve à environ 15-20% chez les souris traités. Nous avons donc réalisés des greffes de peaux de souris sauvage sur des receveurs sauvage traités ou non avec du LPS ainsi que des greffes de peaux d'animaux déficients pour TORID sur des receveurs eux aussi déficients et nous avons suivi la survie de la greffe (Figure 26).

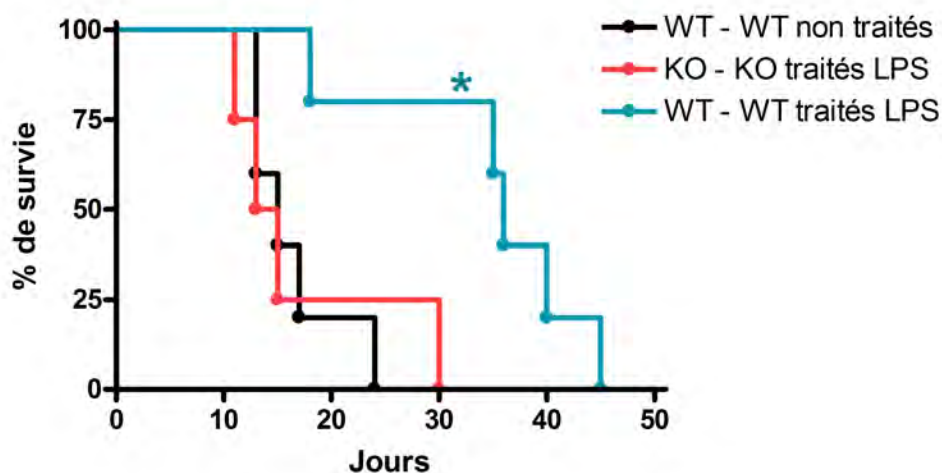


Figure 26 : Survie des greffes de peaux chez des animaux déficients pour TORID.

Les donneurs (males) et les receveurs (femelles) ont été traités avec du LPS 7, 6 et 5 jours avant la greffe. La peau de la queue est prélevée sur les donneurs et greffée sur le dos des receveurs sous anesthésie. La survie de la greffe est ensuite suivie de façon journalière. La courbe noire représente la survie des greffons issus de souris sauvages chez des receveurs sauvages non traités (n=5), la courbe bleu la survie des greffons issus de souris sauvages chez des receveurs sauvages traités (n=5) et la courbe rouge la survie des greffons issus de souris KO pour TORID sur des receveurs eux aussi KO (n=4).

Nous avons pu observer que, malgré le traitement, les souris KO pour TORID rejettent leur greffe suivant la même cinétique que les souris sauvages non traités alors que les souris sauvage traités au LPS présentent une prolongation de la survie du greffon. Ces résultats suggèrent que TORID pourrait jouer un rôle critique dans la prolongation de la survie du greffon dans ce modèle. Cependant, nous ne savons pas, pour le moment, dans quel délai un greffon de souris KO peut être rejetés par une souris sauvages traités au LPS et inversement combien de temps le greffon d'une souris sauvage va survivre avant d'être rejetés chez une souris déficientes pour TORID. Ces résultats nous permettraient de mieux comprendre l'implication de TORID dans ce modèle. Notre hypothèse est que l'absence de

TORID chez les receveurs bloque les propriétés immunosuppressives des MDSC et par conséquent, la survie prolongée du greffon. Afin de tester cette hypothèse, nous avons testé les capacités suppressives des MDSC issus d'animaux sauvages ou déficients pour TORID. Pour cela, nous avons induit l'expansion / accumulation des MDSC dans la rate de souris naïves par injection de LPS et avons purifié les cellules CD11b⁺ spléniques de ces animaux. Les résultats de la première expérience semblent indiquer que les MDSC déficientes pour TORID auraient des capacités à supprimer une MLR fortement diminuée (Figure 26). Cependant, ces résultats ne sont que préliminaires et restent à confirmer.

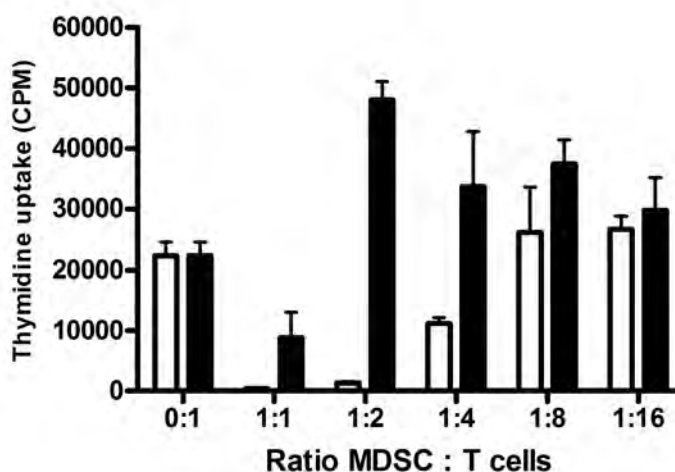


Figure 26 : Activité suppressive des MDSC dérivées d'animaux KO pour TORID.

Les tests de suppression ont été réalisés en ajoutant un nombre décroissant de MDSC sauvage (barre blanche) ou déficientes pour TORID (barre noire) à une MLR constante. Les cellules T syngéniques des MDSC sont stimulées avec des splénocytes allogéniques irradiés à un ratio 2:1. Après trois jours de culture, la prolifération est mesurée par incorporation de thymidine tritiée durant les huit dernières heures de culture. Les résultats sont exprimés en CPM et représente une seule expérience.

Si nous confirmons ces résultats, il serait intéressant de réaliser des expériences de transfert adoptif de ces MDSC dérivées d'animaux sauvages ou déficients pour TORID. Cela permettrait de confirmer le rôle de TORID dans les MDSC et son implication dans la prolongation de la survie de la greffe.

d- Rôle de TORID et des MDSC dans un modèle de développement tumoral

Certains modèles de cancer représentent la situation classique où l'échappement tumoral est directement dépendant de l'expansion des MDSC et de leurs capacité à supprimer une réponse anti-tumorale (Terabe et al. 2003). Dans ces modèles, la déplétion des MDSC conduits au rejet de la tumeur par l'intermédiaire du système immunitaire. Nous avons donc supposé que, dans ces modèles impliquant les MDSC, TORID pourrait, comme dans des modèles de tolérance à des alloantigènes, jouer un rôle important. Afin de tester cette hypothèse, nous avons injecté deux lignées de cellules cancéreuses différentes (Le

lymphome EL4 et le mélanome B78H1) à des souris déficientes ou non pour TORID et avons suivi la croissance tumorale (Figure 27). Ces deux lignées induisent l'accumulation de MDSC dans la rate de ces animaux (20-30% des splénocytes 15 jours après l'injection des cellules tumorales. De façon très intéressante, dans les deux modèles, les tumeurs ne se développent que très lentement ou sont même rejetés dans le cas des lymphomes EL4 dans les souris KO pour TORID, alors que les souris sauvages présentent une pousse tumorale continue. De plus, l'injection de la lignée de cellules cancéreuses B16F10 (lignée de mélanomes n'induisant pas l'accumulation de MDSC) conduit à une croissance tumorale similaire entre les animaux sauvage ou KO pour TORID. Ces résultats confirment l'implication de TORID dans la biologie des MDSC et constitue un deuxième modèle d'étude pour déterminer le rôle précis de TORID dans ces cellules.

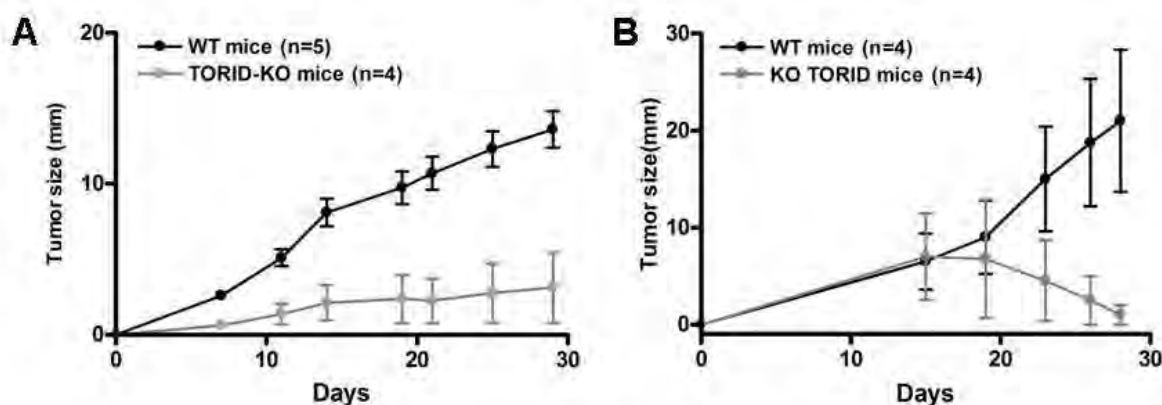


Figure 27 : Croissance tumorale dans deux modèles de tumeurs transplantable injectés à des souris déficientes pour TORID.

(A) Croissance tumorale après transplantation d'1 millions de cellules B78H1 (mélanome) dans des souris sauvage (courbe noire) ou des souris KO pour TORID (ligne grise). **(B)** Croissance tumorale après transplantation d'0,5 millions de cellules EL4 (lymphome) dans des souris sauvage (courbe noire) ou des souris KO pour TORID (ligne grise).

IV- Intégration des nouveaux résultats dans le modèle de TSD

La recherche de nouvelles molécules dans le modèle de TSD a conduit notre équipe à identifier et à caractériser le rôle de plusieurs molécules comme la fractalkine et son récepteur, la molécule FSTL1 ou bien TORID.

L'identification de FSTL1 comme un gène surexprimé 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 et al. 1993), qui joue un rôle clé dans l'induction de la tolérance (Josien et al. 1998a). Ensuite, des études récentes ont permis de lui attribuer un rôle antiprolifératif et anti-inflammatoire (Sumitomo et al. 2000; Kawabata 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 et al. 1998b; Douillard et al. 1999). La prolongation de la survie de l'allogreffe avec la protéine FSTL1, ainsi que les résultats obtenus sur l'implication de FSTL1 sur la production de certaines cytokines pro inflammatoires, suggèrent que dans notre modèle, FSTL1 pourrait avoir un rôle immunorégulateur en inhibant la réponse effectrice et / ou en ayant une action directe de protection vis-à-vis du greffon. D'un autre point de vue, nous ne pouvons pas, à l'heure actuelle, exclure un rôle direct de FSTL1 sur les cellules T effectrices.

Dans l'étude consacrée à la Fractalkine et son récepteur, CX3CR1 (Louvet et al. 2004), notre équipe a montré qu'ils sont tous les deux 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'ait pu caractériser précisément le phénotype de ces cellules, elles pourraient correspondre à la population de MDSC décrites comme pouvant exprimer le récepteur CX3CR1 (Umemura et al. 2008).

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-antigènes par les cellules T CD8 du receveur (correspondant probablement au clone V β 18 (Douillard et al. 1996)). Il paraît raisonnable d'imaginer que cette induction de la Fractalkine pourrait être médié par FSTL1 qui a été récemment décrit comme ayant un effet protecteur sur les

cellules endothéliales. Les MDSC CX3CR1⁺ pourraient alors s'accumuler dans le greffon et exercer une fonction régulatrice sur les cellules effectrices.

D'autre part, notre équipe a précédemment montré que TORID est exprimé par les cellules myéloïdes immatures (macrophage, cellules dendritiques) (Louvét et al. 2005) et dans cette thèse, nous avons montré que TORID est aussi exprimé par les MDSC. Une accumulation de MDSC pourrait alors expliquer l'augmentation de TORID que nous avons montré comme fortement exprimé dans ces cellules. Étant donné que nous n'avons pas pu établir le phénotype des cellules non T infiltrant le greffon, l'hypothèse que ces cellules soient des MDSC est tout à fait plausible. Cependant, les MDSC chez le rat n'ont été que très peu décrites. De plus, la cinétique d'expression de TORID et CX3CR1 étant très similaire, il est probable que ces deux molécules soient exprimées par les mêmes cellules. De fait, notre hypothèse est que l'expression de TORID dans ces cellules pourrait moduler les propriétés régulatrices de ces cellules et ainsi jouer un rôle direct dans l'induction de la tolérance. Nous pouvons aussi supposer que FSTL1 pourrait avoir un effet sur les cellules MDSC en augmentant, par exemple, leur capacité suppressives. Il serait donc intéressant de traiter des MDSC avec du FSTL1 recombinant et de tester ensuite leur capacité suppressive afin de vérifier cette dernière hypothèse.

Par ailleurs, les expériences de transduction adénovirale de TORID dans des BMDCs et les expériences réalisées sur les BMDCs issues de souris déficientes pour TORID suggèrent que celui-ci est impliqué dans le contrôle de la maturation des DCs. Les cellules exprimant TORID dans le greffon pourraient donc aussi correspondre 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; Dhodapkar et al. 2001), ou semi matures (Lutz and Schuler 2002) étaient capables d'induire la tolérance. Elles auraient alors la capacité de capturer des allo-antigènes 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. Ce phénomène impliquerait donc une reconnaissance active des allo-antigènes. En corrélant ce phénomène avec le fait que les cellules leucocytaires passagères du greffon sont requises pour l'induction de tolérance dans ce modèle (Josien et al. 1998b), nous pourrions démontrer que la Fractalkine constituerait alors un des signaux précoces permettant la mise en place des mécanismes de tolérance dans ce modèle.

En plus du rôle de TORID dans ces cellules, il n'est pas à exclure un rôle de FSTL1 et du TGF β sur ces cellules. Outre l'effet du TGF β sur les APCs précédemment décrit, une de nos hypothèses concernant FSTL1 est que cette molécule pourrait inhiber la production

de cytokines proinflammatoire, telles que l'IL6, par les APC. Il pourrait donc être envisageable que l'effet de FSTL1 sur les APCs pourrait faire intervenir TORID.

La figure 28 propose un essai de synthèse des différentes données précédemment acquises avec les nouveaux éléments apportés par l'étude de ces différentes molécules dans le modèle d'induction de tolérance par TSD.

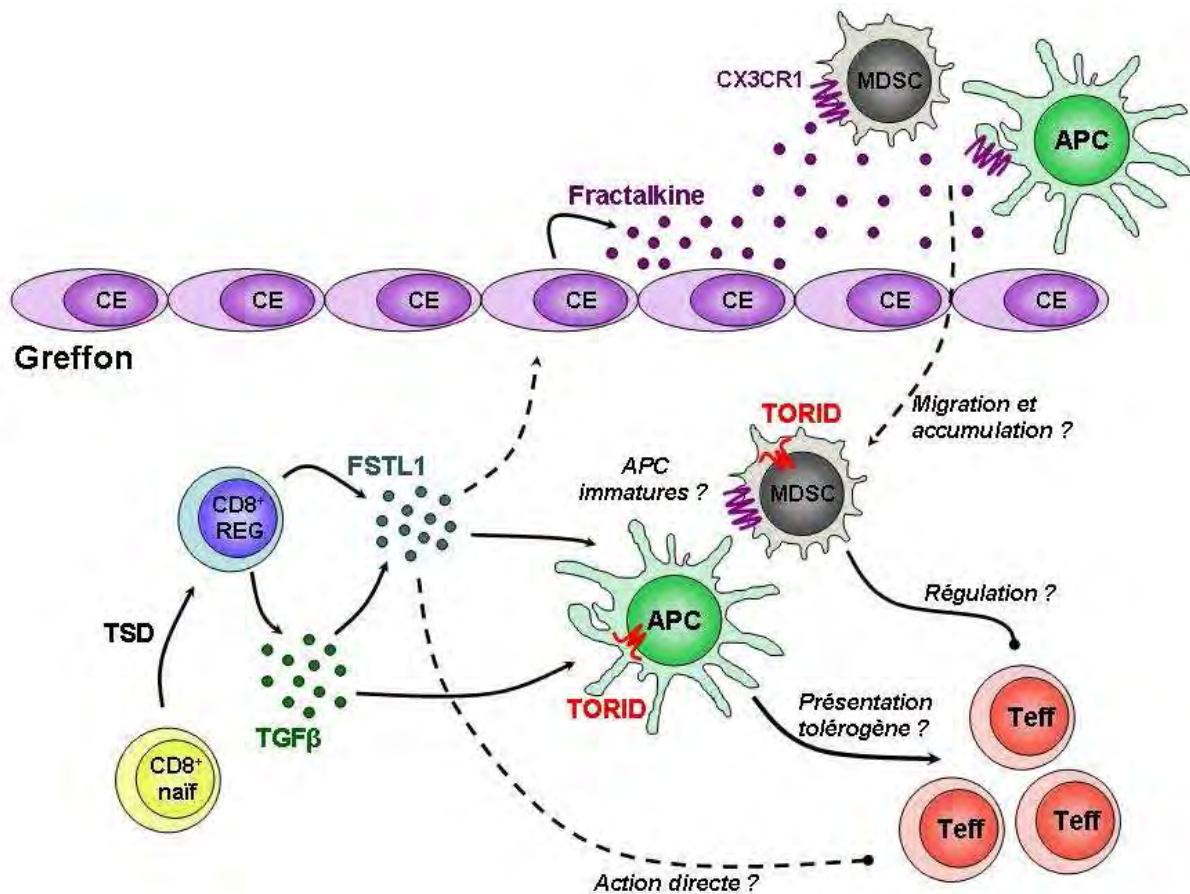


Figure 28 : Modèle hypothétique des mécanismes d'induction de tolérance à l'allogreffe par TSD.

**Partie 2 : CARACTERISATION DE SLFN3 SUREXPRIMEES
DANS LE MODELE DE TOLERANCE INDUITS PAR
ADMINISTRATION DE LF15-0195**

I- Le modèle de tolérance induit par traitement au LF15-0195

Le modèle de transplantation cardiaque utilise la même combinaison de souches de rats que celui utilisé dans le modèle de transfusion sanguine de donneur (TSD), sans traitement l'allogreffe cardiaque est rejetée en 6 ± 0.6 jours (Josien et al. 1998a; Chiffolleau et al. 2002a). Nous avons décrit qu'un court traitement quotidien avec un nouvel immunosuppresseur pendant 20 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 (Chiffolleau et al. 2002a; 2002b). La tolérance induite par le LF15-0195 est durable et spécifique. De plus, le LF15-0195 a aussi 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). 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 et al. 2002a). 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 et al. 2002a).

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 et al. 2002a) et les cellules infiltrant la greffe tolérée (Heslan et al. 2005). 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 et al. 2002a), et une proportion importante de cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a été retrouvée dans les cœurs tolérés (Heslan et al. 2005; Thebault et al. 2007). 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 et al. 2002a). Les cellules régulatrices induites par le traitement au 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 et al. 2002a). 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 et al. 2002a). 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.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de ces Tregs ou d'identifier des nouveaux marqueurs biologiques de ces cellules, 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). Parmi les différents clones obtenus lors de cette analyse, Schlafen-3 (Slfn3) présentait une expression différentielle assez importante (3,81 fois plus) dans la MLR des animaux tolérants comparé à la MLR des animaux naïfs. Nous avons donc décidé d'analyser l'expression et la régulation de cette molécule dans les différentes populations de lymphocytes T.

II- Caractérisation de l'expression et de la régulation de Schlafen-3

1- La famille de molécules, 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 et al. 1998). Ceux-ci pouvaient être classés en deux groupes distincts. Le premier groupe formé par Slfn1 et Slfn2 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 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 29 montre la représentation schématique de l'alignement des différents membres de la famille Schlafen formant trois groupes protéiques en fonction de leurs homologies.

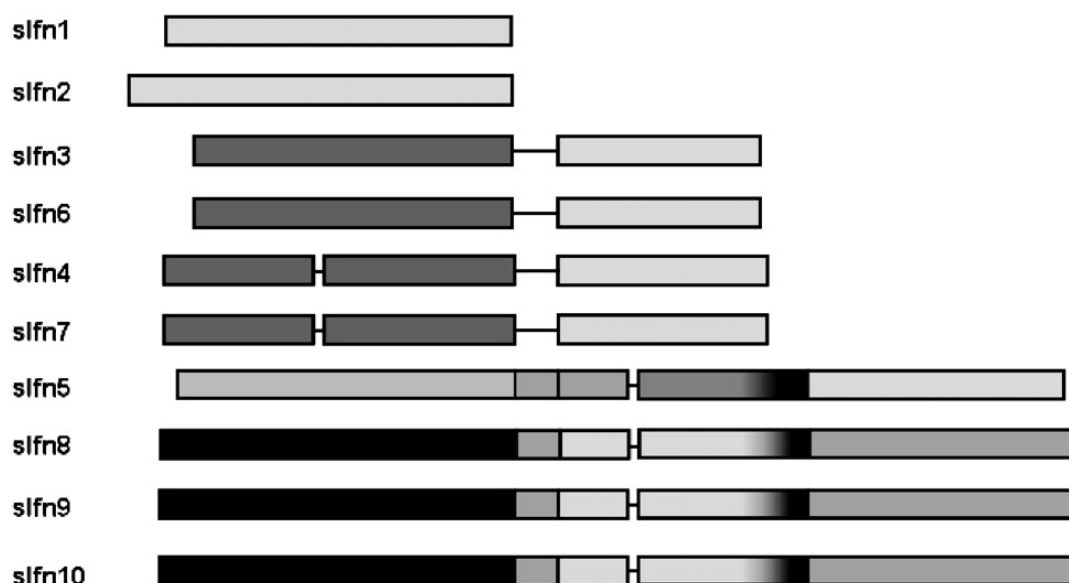


Figure 29 : Représentation schématiques des différents membres de la famille Schlafen. D'après Geserick et al. (Geserick et al. 2004)

Le gène Schlafen 3 (Slfn3) 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 30). 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 profile d'hydrophobicité de cette protéine, une zone hydrophobe dans la partie C terminale qui permet de prédire une zone transmembranaire.

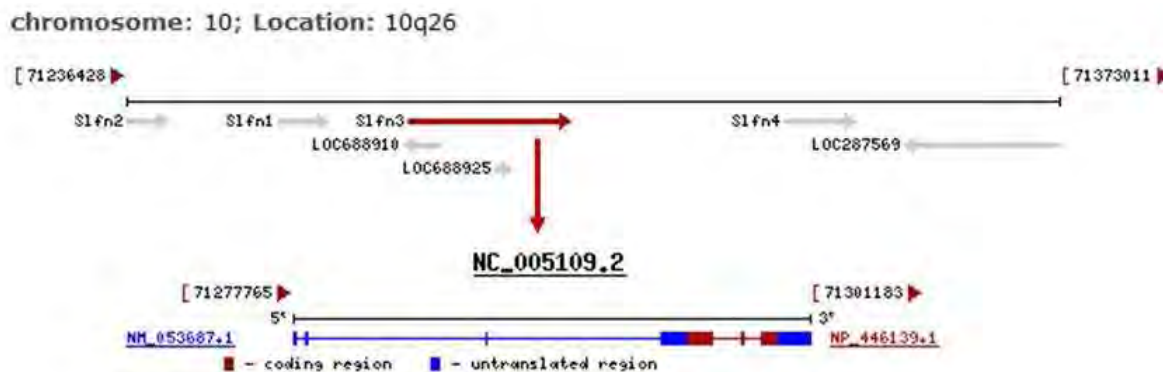


Figure 30 : Localisation chromosomique et structure du transcript codant pour Slfn3.

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 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 et al. 2004). D'autre part, il a été montré que Slfn1 devait être lié à la molécule DNAJB6, de la famille des molécules chaperones HSP40, pour être transloqué dans le noyau et ainsi inhiber la cyclin D1 (Zhang et al. 2008). Le groupe de Gonda a, de plus, montré que l'expression des molécules Slfn des groupes 1 et 2 est localisé dans le cytoplasme des cellules alors que les molécules du troisième groupe sont localisées dans le noyau des cellules (Neumann et al. 2008). Récemment, Zhao et ses collaborateurs ont publié des données contradictoires montrant que l'expression de Slfn1 et Slfn2 n'inhiberait pas la prolifération de fibroblastes ou de cellules myéloïdes (Zhao et al. 2008). Enfin, la molécule Slfn2 a été montrée comme exprimé par les cellules myéloïdes et que la stimulation de ces dernières par le ligand du TLR4, le LPS, induit une augmentation de l'expression de cette molécule (Sohn et al. 2007). Les mêmes résultats ont été montrés pour la molécule Slfn1 dans les cellules microgliales (Lund et al. 2006). Très peu de données sont disponibles sur la molécule Slfn3 mis à part que son expression ectopique dans des fibroblastes inhibe la prolifération de ces cellules (Schwarz et al. 1998).

2- ARTICLE 2: CHARACTERIZATION OF SCHLAFEN-3 EXPRESSION IN EFFECTOR AND REGULATORY T CELLS.

**Thomas Condamine, Jean Benoît Le Ludec, Elise Chiffolleau, Gaelle Beriou,
Cedric Louvet, Michele Heslan, Maria-Cristina Cuturi.**

Soumis dans the Journal of Immunology, en 2008.

Résumé de l'article 2 :**CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DE SLFN3 DANS LES LYMPHOCYTES T EFFECTEUR OU REGULATEURS.**

Des membres de la famille protéique Schlafen (Slfn) ont été montrés comme étant impliqués dans la régulation de la prolifération ainsi que le développement et maturation des LT dans le thymus. 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+ splénique, ainsi que dans ceux du thymus. De manière intéressante, nous montrons que dans des conditions d'activation induisant leur prolifération, l'expression transcriptionnelle de Slfn3 est diminuée dans les cellules T régulatrices, et fortement 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

Thomas Condamine^a, Jean-Benoît Le Luavec^{a†}, Elise Chiffoleau^a, Gaëlle Bériou^{a¤}, Cédric Louvet^{a#}, Michele Heslan^a, and Maria-Cristina Cuturi^a.

^a INSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France

[†] Current address: INSERM U851, 21 avenue Tony Garnier, 69365 Lyon, cedex 7 France.

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

[¤] 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

ABSTRACT

Members of the Schlafen (Slfn) protein family have been implicated in the regulation of cell growth, haematopoietic cell differentiation, and T cell development/differentiation in the thymus. Ten members have been described in mouse and divided in three subgroups based on overall sequence homology and size of the encoded proteins. We have identified Schlafen-3 (Slfn3) a member of the subgroup II, 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 and Treg cells whereas at the same time in Treg 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 et al. 2002a) to identify new molecules implicated in the mechanisms of tolerance. We previously reported that this model is characterized by a specific expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T cells in the spleen and graft (Chiffolleau et al. 2002a; 2002b; Heslan et al. 2005; Thebault et al. 2007). We also described that donor-specific tolerance can be transferred by CD4+ T splenocytes from long-term tolerant recipients (Chiffolleau et al. 2002b; Heslan et al. 2005). By Suppressive Subtractive Hybridization, we identified Slfn3 as being over expressed in donor-stimulated T cells from long-term LF treated tolerant animals compared to naives ones.

The Schlafen (Slfn) family proteins was first discovered in mice (Schwarz et al. 1998), and currently comprises 10 members (Geserick et al. 2004). This family have been divided in three sub-group based on their overall homology of exon encoding regions (Geserick et al. 2004). Slfn3 belongs to the sub-group II which comprise Slfn4, 6 and 7. Slfn3 and 7 were described to be tightly upregulated following T cells activation (Schwarz et al. 1998). These molecules seem to play an important role in the ontogenesis of thymocytes (Schwarz et al. 1998; Geserick et al. 2004) and one of them (Slfn1) has been described to be involved in the control of the cellular cycle by inhibiting the induction of the cyclin D1 (Brady et al. 2005; Zhang et al. 2008). Recently, Zhao et Al. reported contradicting data showing that Slfn1 and 2 do not inhibit growth of fibroblast and myeloid cells (Zhao et al. 2008). Slfn2 has been described to be upregulated in myeloid cells during differentiation or maturation and

this expression is regulated by two transcription factor, AP-1 and NF κ B (Sohn et al. 2007; Neumann et al. 2008). Little is known about the function of Slfn3, it has been shown to have an anti-proliferative effect when ectopically expressed by fibroblasts (Schwarz 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. Interestingly Slfn3 is up regulated during polyclonal T cell activation (in CD4+CD25- Tcells) and is downregulated after anti CD3/CD28 activation of CD4+CD25+ T cells. Finally, we demonstrate that Slfn3 is negatively regulated by TGF β in both CD25+ and CD25- T CD4+ subpopulations. Our results suggest that Slfn3 could be a new marker of T cell activation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and transplantations.

Six to 10-week-old Lewis and Sprague-Dawley rats were obtained from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and maintained in an animal facility under standard conditions according to our institutional guidelines.

LEW.1W (RT1.u) or LEW.1A (RT1.a) rats were used as heart donors, and LEW.1A rats were used as allograft recipients. Heterotopic heart transplantations were performed using the Ono and Lindsey technique (Ono and Lindsey 1969). Graft function was monitored daily by palpation through the abdominal wall.

In order to induce donor-specific allograft tolerance, recipients were treated with LF 15-0195 (Laboratories Fournié Dijon France) at 3mg/kg for 20 days, as previously described (Chiffolleau et al. 2002a).

Antibodies.

The following hybridoma anti-rat mAbs were obtained from the European Collection of Animal Cell Culture (Salisbury, U.K.) and used for 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 (integrin 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 the hybridoma JJ319 (anti-rat CD28) was kindly provided by Dr T. Hünig (University of Würzburg, Germany). A neutralizing murine anti-human TGF β mAb-producing hybridoma (clone 2G7) (Lucas et al. 1990) was kindly provided by Dr. K. Melief (Academisch Ziekenhuis

Leiden, The Netherlands). The human CD16 mAb (clone 3G8) was used as an isotype-matched control.

Cell separations

Dendritic cells. Total CD103⁺ DCs were selected using OX62-MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France), as previously described (Voisine et al. 2002; Ouabed et al. 2008).

B cells and NK cells. B cells (TCR⁻ CD4⁻ CD45R⁺) and NK cells (CD8⁺/CD161a^{high}) were purified from Mononuclear spleen cells using a FACSAria flow cytometer, as previously described (Louvet et al. 2005). The resultant purity of the sorted cells was >95%.

Monocytes and T-cells. Mononuclear blood cells were isolated using a Ficoll density gradient. Monocytes (MHC II⁻ CD103⁻ CD2⁻) and T-cells (His42⁻ OX42⁻) were obtained after negative selection with anti-mouse IgG-coated magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway), as previously described (Louvet et al. 2005). The purity was routinely ≥95%.

Treg and Teff cells. 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 et al. 2002; Ouabed et al. 2008). 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-TCRαβ-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 µL.

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 (NUNC™, Merck, Eurolab, France) coated with anti-CD3 (1 µg/ml) and with addition of soluble anti-CD28 (1ng/ml) in a final volume of 200 µl. When indicated, recombinant TGFβ1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (2ng/mL) or TGFβ Ab (2G7 at 1µg/mL) or antibody control (3G8 at 1µg/mL) were added.

The cultures were incubated at 37°C, in 5% (v/v) CO₂ and pulsed for the last 8h with 0.5 mCi [3H]TdR (Amersham, Les Ulis, France). Cells were then harvested on glass fiber filters and [3H]TdR incorporation was measured using standard scintillation procedures (Packard Institute, Meriden, CT, USA).

Real-time quantitative RT-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 et al. 2004) using a GenAmp 7700 Sequence Detection System and SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The following oligonucleotides were used in this study: Sifn3 forward: AGCATGTTTCTCCAAGCAAGAT; Sifn3 reverse: TTTAGGAAGCGAGTCCAAGTGT; HPRT forward: CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC; HPRT reverse: TTCGCTGATGACACAAACATGA; 18S forward: AGTTCCGACCATAAACGATGC; 18S reverse: CCCTTCCGTC AATTCCTTTAA; FoxP3 forward: CCCAGGAAAGACAGCAACCTT; 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 (Livak and Schmittgen 2001; Louvet et al. 2005), 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 naive 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 analysed using the non-parametric Mann-Whitney test. *P* values < 0.05 were considered as 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 et al. 2002a). 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 ($p < 0.05$), undependably if they were purified from allograft recipients of LF treated or from naïve animals (Fig.1B). We also analyzed FoxP3 mRNA expression (a marker of regulatory T cells (Sakaguchi 2003)) in the same experiments, . As shown in Fig. 1C, FoxP3 is highly expressed in CD4+CD25+ compared to CD25- T cells. No difference was found also for Foxp3 expression in CD4+CD25+ T cells from naive versus tolerant recipients. These results showed that Slfn3 mRNA expression is higher in the CD4+CD25+ T cell population and suggested 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 et al. 2002b).

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. 1D, the mRNA expression of Slfn3 was higher in CD4+CD25+ cells compared to CD4+CD25- cells (15 fold) ($n=3$, $p<0.05$). 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 (Data not shown). As for the expression of Slfn3, FoxP3 mRNA was strongly expressed in the CD4+CD25+ population in comparison to the CD4+CD25- population (Figure 1E). In conclusion, Slfn3 and FoxP3 present the same profile of expression in TCR+CD4+CD25+ and - thymic subpopulations.

Slfn3 mRNA distribution in rat tissues.

In order to analyze the tissue distribution of Slfn3, its mRNA expression was studied in rat tissues by real-time quantitative PCR (Fig. 2A) and compared to the expression of FoxP3 mRNA (Fig. 2B). Our results show that Slfn3 and FoxP3 mRNA have quite similar tissue distribution. In fact, both mRNAs 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 have the same overall distribution and be preferentially expressed in lymphoid organs and tissues.

Slfn3 mRNA distribution in naive rat leukocytes.

We next analysed the expression of Slfn3 (Fig. 3A) and FoxP3 (Fig. 3B) in different populations of freshly isolated leukocytes. As it has been previously described, the expression of the natural regulatory T cells transcription factor, FoxP3 was limited to the T cells compartment with the strongest expression was found in the CD4+ T cells subset who contain the natural regulatory T cells. In contrast, Slfn3 mRNA expression was observed in many subsets of leukocytes. The strongest expression of Slfn3 was observed in the Monocytes compartment, and Slfn3 was expressed at an intermediate level in T cells (Both CD4+ and CD8+ subsets), NK cells and peritoneal macrophages. Low levels of Slfn3 mRNA were observed in resting DCs and B cells. In summary, on the contrary of the very restricted expression of FoxP3 (expressed only in T cells), Slfn3 is expressed in many subsets of leukocytes and is not restricted to the lymphoid compartment.

Slfn3 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 mAb has previously been shown in mice (Schwarz et al. 1998). 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 mAb and analyzed for Slfn3 and FoxP3 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 (30 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. 4C). On the contrary, FoxP3 expression was strongly decreased following activation and remains very low even after 96 hrs of stimulation. We thus show here that Slfn3 is strongly induced by T cell activation whereas at the same time FoxP3 were strongly decreased. The upregulation of Slfn3 expression following activation in naïve T cells was confirmed at the protein level by western blot analysis (fig 5 A and B). In addition, we have showed that Slfn3 is express at the intracellular level in T cells by immunocytochemistry and that this expression was restricted to a single point in the cytoplasm of the cells (Fig 5C).

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 mAb. We analyzed Slfn3 mRNA expression in unstimulated and in cells stimulated for 48 hrs. As shown in Fig. 4D, Slfn3 mRNA was strongly decreased after 48 hrs of stimulation in CD4+CD25+ T cells. Interestingly, FoxP3 present the same regulation in CD4+CD25+ T cells (Fig. 4E). On the contrary, Slfn3 mRNA was highly increased in the same conditions for CD4+CD25- T cells where FoxP3 expression remains very low. Very interestingly, whereas we observed a contrasting regulation of Slfn3 expression after stimulation in CD4+CD25+ (increased) and CD4+CD25- (decreased) T cells, the stimulation induces comparable levels of proliferation of both cells types (Fig. 4F). These results show that Slfn3 is differentially regulated during the activation of CD4+CD25+ or

CD4⁺CD25⁻ T cells, and suggest that Slfn3 mRNA expression does not depend on proliferation mechanisms, as it 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 the regulation of T cell activation/differentiation (Ranges et al. 1987; Chen et al. 2003b; Li and Flavell 2008) and to have a regulatory effect on certain T cell functions (proliferation, apoptosis) (Kehrl et al. 1986; Green et al. 2003a; Marrack and Kappler 2004). We thus tested the effect of TGF β during CD4⁺ T cell activation by CD3 and CD28 mAb after 48, 72 or 96 hrs. 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 (Data not shown). 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 mAb-activated CD4⁺ T cells. These results show that TGF β differentially regulates Slfn3 (negative regulation) and FoxP3 (positive regulation) mRNA expression in activated T cells.

DISCUSSION

By Subtractive Suppressive Hybridization we identified *Slfn3* as been overexpressed in donor-stimulated T cells from long-term tolerant (LTT) animals induced by treatment with LF15-0195 versus naïve donor stimulated T cells.

We have previously shown that CD4+CD25+FoxP3+ T cells are highly expanded (in both percentage and absolute numbers) in splenocytes from tolerant recipients (Thebault et al. 2007). 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 analyzed *Slfn3* mRNA expression in CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells from naïf and LTT recipients. Our results show that *Slfn3* mRNA expression is higher in CD4+CD25+ T cells than in CD4+CD25- T cells, but we did not found difference when we compared the expression in cells from naïve animals or LTT recipients. These results show that *Slfn3* mRNA is expressed to a greater extent in CD4+CD25+ T cells than in CD4+CD25- T cells and that the increased expression found 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. But we observed a differential *Slfn3* mRNA expression in TCR+CD4+CD25+ thymocytes compared to TCR+CD4+CD25- ones , with a stronger expression in the CD25+ cell population. Similar pattern of expression was observed for *Foxp3* mRNA expression.

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 et al. 2003; Hori et al. 2003a), 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.

Expression of the Slfn family of molecules has been mainly described in T cells (Schwarz et al. 1998; Geserick et al. 2004) but also in myeloid cells like macrophages for Slfn2 (Sohn et al. 2007). In the present study, we reported that Slfn3 is largely expressed in leukocytes as T cells, NK cells, Monocytes or macrophages. Members of Slfn family have been recently described as having a role in T cell activation (Schwarz et al. 1998; Geserick 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 et al. 1998). In this study, we observed a strong time-dependent induction of Slfn3 expression upon T cell stimulation both at transcript and protein level. 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 mAb 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, after 48 hrs of stimulation Slfn3 mRNA expression was strongly decreased in CD4⁺CD25⁺ T cells and highly increased in CD4⁺CD25⁻ T cells. Interestingly, with the condition of stimulation used, we induced comparable levels of proliferation of both CD4⁺CD25^{+/}- T cells subpopulations. These results suggest that Slfn3 could have a role in T cell activation/differentiation but does not have a direct role on the proliferation mechanisms, as it has been suggested by Schwarz et al. for others members of the

family (Schwarz et al. 1998). On the other hand, even if Slfn3 is preferentially expressed in natural regulatory T cells, this molecule is not specific of regulatory T cells due to the fact that its expression is strongly upregulated following T cells activation.

We demonstrate in this study a negative regulation of TGF β on Slfn3 mRNA expression during T cell activation (on total T cells, on CD4+CD25+ and CD4+CD25- or CD8+ T cells). TGF β has been shown to have important implications in the regulation of T cell activation/differentiation (Ranges et al. 1987; Chen et al. 2003b; Li and Flavell 2008) and to have a regulatory effect on some T cell functions such as proliferation and apoptosis (Kehrl et al. 1986; Green et al. 2003a; Marrack and Kappler 2004; Li and Flavell 2008). Our results show that Slfn3 is increased during activation and proliferation of naïve CD4+ T cells. However, our results suggest that this increase does not depend on the mechanisms of regulation of cell proliferation as suggested for Slfn2 (inhibition of cyclin D1) (Brady et al. 2005). In fact we show a down-regulation of Slfn3 in proliferating Tregs. This suggests that the antiproliferative effect of TGF β and the decrease of Slfn3 mRNA expression that we observed could reflect two independent mechanisms. On the same experiments we showed that TGF β treatment in the presence of anti CD3 and CD28 stimulation increased FoxP3 mRNA expression, confirming the role of TGF β in regulatory T cell differentiation as has been demonstrated previously (Chen et al. 2003b). Given that we have shown Slfn3 to be over expressed during activation of naïve CD4+ and CD8+ T cells and that this increase is negatively regulated by TGF β .

Interestingly, Sohn et al. recently reported that Slfn2 transcription is controlled by two transcription factors, NF κ B and AP1 that are involved in T cells activation (Foletta et al. 1998; Siebenlist et al. 2005) Slfn3 as Slfn2 transcription could be controlled by

NFκB and AP-1. It has been shown that TGFβ inhibit AP-1 activation (Chen et al. 2003a) and could negatively regulates Slfn3.

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 expression of this molecule is decreased upon stimulation in this population. We have also shown that Slfn3 is up regulated upon T cell activation. Moreover the expression of Slfn3 on CD3/CD28 mAb-activated T cells is inhibited by TGFβ 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

1. Chiffoleau, 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* 2:745-757.
2. Chiffoleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soullillou, and M. C. Cuturi. 2002. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 168:5058-5069.
3. Heslan, J. M., G. Beriou, J. B. Le Luduec, C. Guillonnet, I. Anegon, J. P. Soullillou, M. C. Cuturi, and E. Chiffoleau. 2005. Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vbeta7-TCR rearrangements in tolerated allografts. *Transplantation* 80:1476-1484.
4. Thebault, P., T. Condamine, M. Heslan, M. Hill, I. Bernard, A. Saoudi, R. Josien, I. Anegon, M. C. Cuturi, and E. Chiffoleau. 2007. Role of IFNgamma in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am J Transplant* 7:2472-2482.
5. Schwarz, D. A., C. D. Katayama, and S. M. Hedrick. 1998. Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development. *Immunity* 9:657-668.
6. 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* 16:1535-1548.
7. Brady, G., L. Boggan, A. Bowie, and L. A. O'Neill. 2005. Schlafen-1 causes a cell cycle arrest by inhibiting induction of cyclin D1. *J Biol Chem* 280:30723-30734.
8. Zhang, Y., Z. Yang, Y. Cao, S. Zhang, H. Li, Y. Huang, Y. Q. Ding, and X. Liu. 2008. The Hsp40 family chaperone protein DnaJB6 enhances Schlafen1 nuclear localization which is critical for promotion of cell-cycle arrest in T-cells. *Biochem J* 413:239-250.
9. Zhao, L., B. Neumann, K. Murphy, J. Silke, and T. J. Gonda. 2008. Lack of reproducible growth inhibition by Schlafen1 and Schlafen2 in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 41:188-193.
10. Neumann, B., L. Zhao, K. Murphy, and T. J. Gonda. 2008. Subcellular localization of the Schlafen protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 370:62-66.
11. Sohn, W. J., D. Kim, K. W. Lee, M. S. Kim, S. Kwon, Y. Lee, D. S. Kim, and H. J. Kwon. 2007. Novel transcriptional regulation of the schlafen-2 gene in macrophages in response to TLR-triggered stimulation. *Mol Immunol* 44:3273-3282.
12. Ono, K., and E. S. Lindsey. 1969. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 57:225-229.

13. Lucas, C., L. N. Bald, B. M. Fendly, M. Mora-Worms, I. S. Figari, E. J. Patzer, and M. A. Palladino. 1990. The autocrine production of transforming growth factor-beta 1 during lymphocyte activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA. *J Immunol* 145:1415-1422.
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* 172:7485-7494.
15. Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan, and R. Josien. 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169:2284-2291.
16. Louvet, C., E. Chiffolleau, M. Heslan, L. Tesson, J. M. Heslan, R. Brion, G. Beriou, C. Guillonneau, 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* 5:2143-2153.
17. 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* 78:1259-1266.
18. 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* 25:402-408.
19. Sakaguchi, S. 2003. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest* 112:1310-1312.
20. 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* 198:1875-1886.
21. Li, M. O., and R. A. Flavell. 2008. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134:392-404.
22. 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* 166:991-998.
23. 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* 163:1037-1050.
24. Green, D. R., N. Droin, and M. Pinkoski. 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193:70-81.

25. Marrack, P., and J. Kappler. 2004. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* 22:765-787.
26. 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* 4:330-336.
27. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
28. Nicholas, R. J., and R. J. Scothorne. 1969. Studies on the testis as an 'immunologically privileged' site. *J Anat* 104:194.
29. 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.
30. Siebenlist, U., K. Brown, and E. Claudio. 2005. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 5:435-445.
31. Foletta, V. C., D. H. Segal, and D. R. Cohen. 1998. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 63:139-152.
32. Chen, C. H., C. Seguin-Devaux, N. A. Burke, T. B. Oriss, S. C. Watkins, N. Clipstone, and A. Ray. 2003. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp Med* 197:1689-1699.

LEGENDS to FIGURES

Figure 1: Slfn3 and FoxP3 mRNA expression

Slfn3 and FoxP3 mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR. mRNA levels were normalized by HPRT and expressed in arbitrary units (AU). 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. Each MLR was realized with a pool of cells from three animals. Expression of Slfn3 **(B)** and FoxP3 **(C)** mRNA in CD25+ and - CD4+ T cells from LF 15-0195 treated or naïve recipient (CD4+CD25+ □ CD4+CD25- ■). Each group was expressed in arbitrary units (AU) as the mean \pm SD of three independent experiments for each cell subset. Expression of Slfn3 **(D)** and FoxP3 **(E)** mRNA in CD4+CD25+ and - thymocytes. Each group was expressed in arbitrary units (AU) as the mean \pm SD of three independent experiments for each cell subset.

Figure 2: Expression of Slfn3 and FoxP3 mRNA in rat tissues

Slfn3 and FoxP3 mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR. **(A)** 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. **(B)** 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 3: Expression of Slfn3 and FoxP3 mRNA in immune cells

Expression of Slfn3 and FoxP3 mRNA in cDNAs generated from mRNA extracts from freshly isolated leukocytes, excluding bone-marrow derived DCs (BMDCs) was

assessed by real-time quantitative PCR and normalized to HPRT mRNA expression. Results are expressed as the mean of AU \pm SD of two independent experiments in each cell subset. **(A)** Expression of Slfn3 mRNA in purified immune cells. **(B)** Expression of FoxP3 mRNA in purified immune cells.

Figure 4: Slfn3 and FoxP3 mRNA expression in activated total T cells and CD4+CD25+ or CD4+CD25- T cells.

Expression of Slfn3 and FoxP3 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. mRNA levels were normalized by HPRT and expressed in arbitrary units (AU). Significant differences are indicated (* p <0.05). Kinetics of expression of Slfn3 **(A)** and FoxP3 **(B)** mRNA following T cells anti CD3/CD28 activation. **(C)** Proliferation of these cells was measured by thymidine incorporation assay and the results are given in count per minute (CPM). Results are the mean of three independent experiments. **(D)** Expression of Slfn3 in T cells following anti CD3/CD28 was confirmed by Western-Blot analysis. Expression of Slfn3 **(E)** and FoxP3 **(F)** mRNA in CD25+/- CD4+ activated T cells 48 hours following anti CD3/CD28 activation. **(G)** Proliferation of these cells was measured by thymidine incorporation assay and the results are given in count per minute (CPM). Results represent the mean \pm SD of two independent experiments.

Figure 5: Slfn3 protein expression in naïve and activated T cells.

(A) and **(B)**. Expression of Slfn3 protein in cells activated with anti-CD3 (1 μ g/mL) and anti-CD28 (1 μ g/mL) was assessed by Western-blot analysis. **(C)** Localization of SLFN3 in naïve T cells. Immunocytochemistry was realized on naïve T cells using a

polyclonal anti-SLFN3 antibody (green staining), an anti-TCR antibody (red staining) and the molecule Draq5 (blue staining) which stain DNA.

Figure 6: Effect of TGF β on Slfn3 and FoxP3 mRNA expression in activated T cells.

mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR. Purified 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 , 1 μ g/mL of anti-TGF β or 1 μ g/mL of control antibody. Cells were collected 48, 72 or 96 hours following activation. mRNA levels were normalized by HPRT 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 three independent experiments.

Figure 1

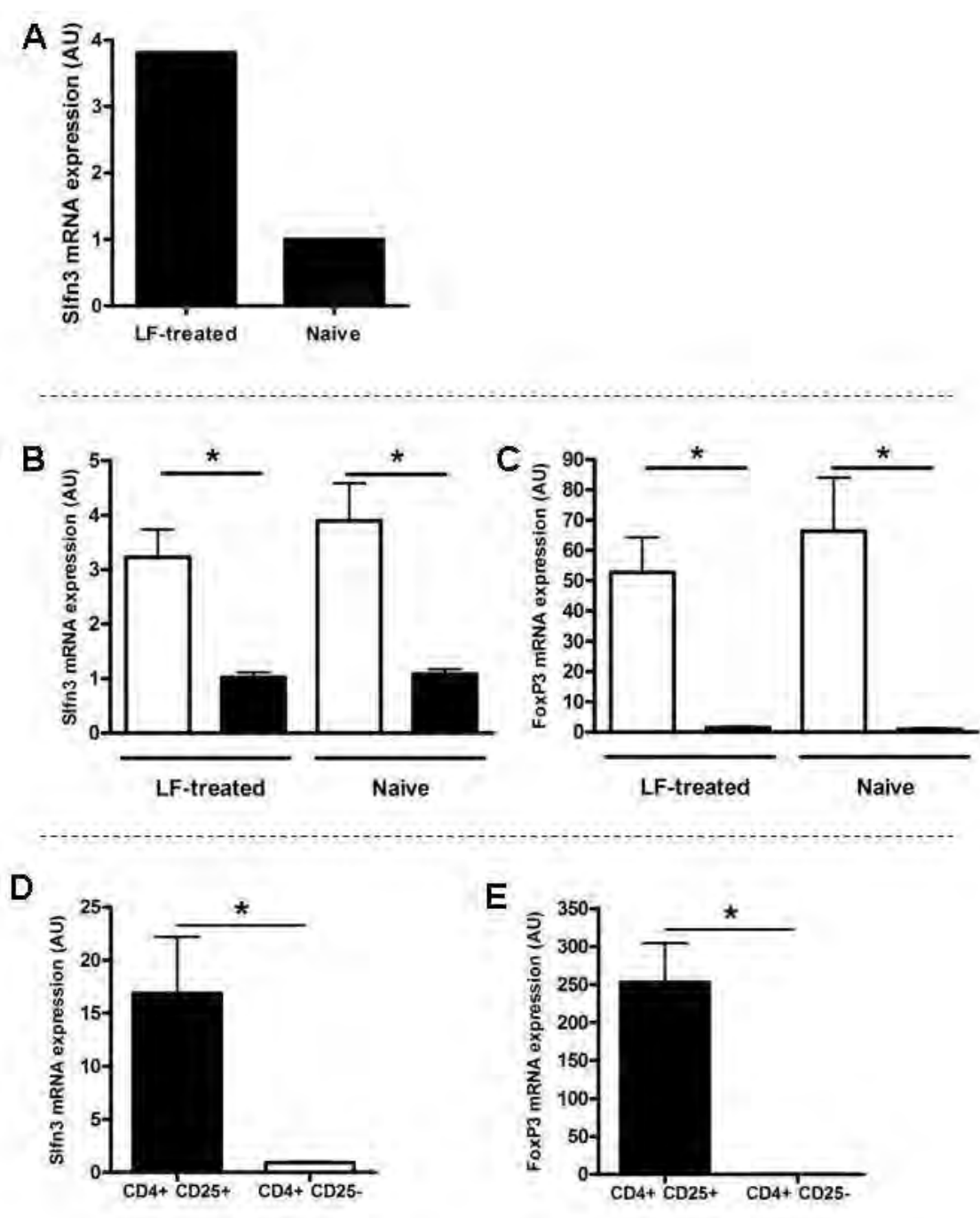


Figure 2

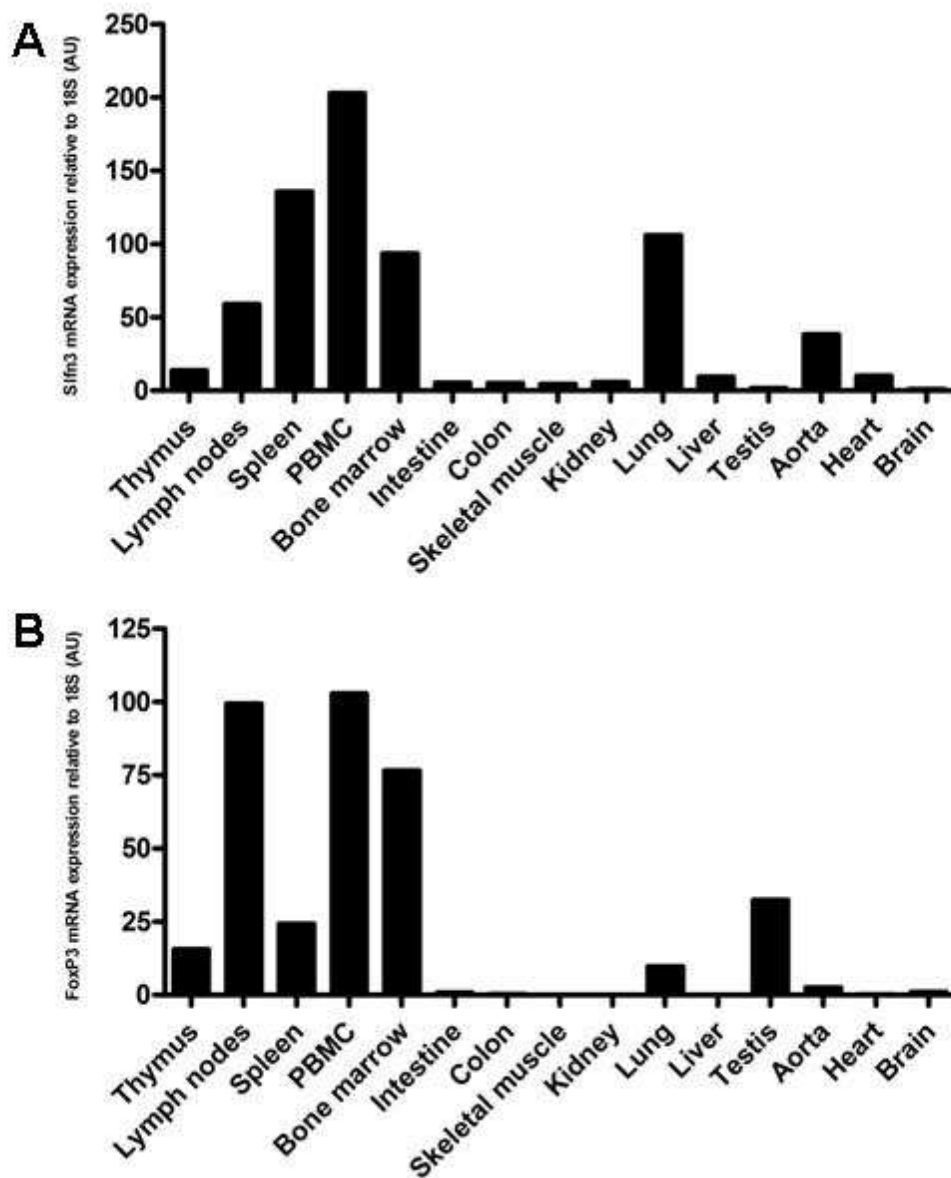


Figure 3

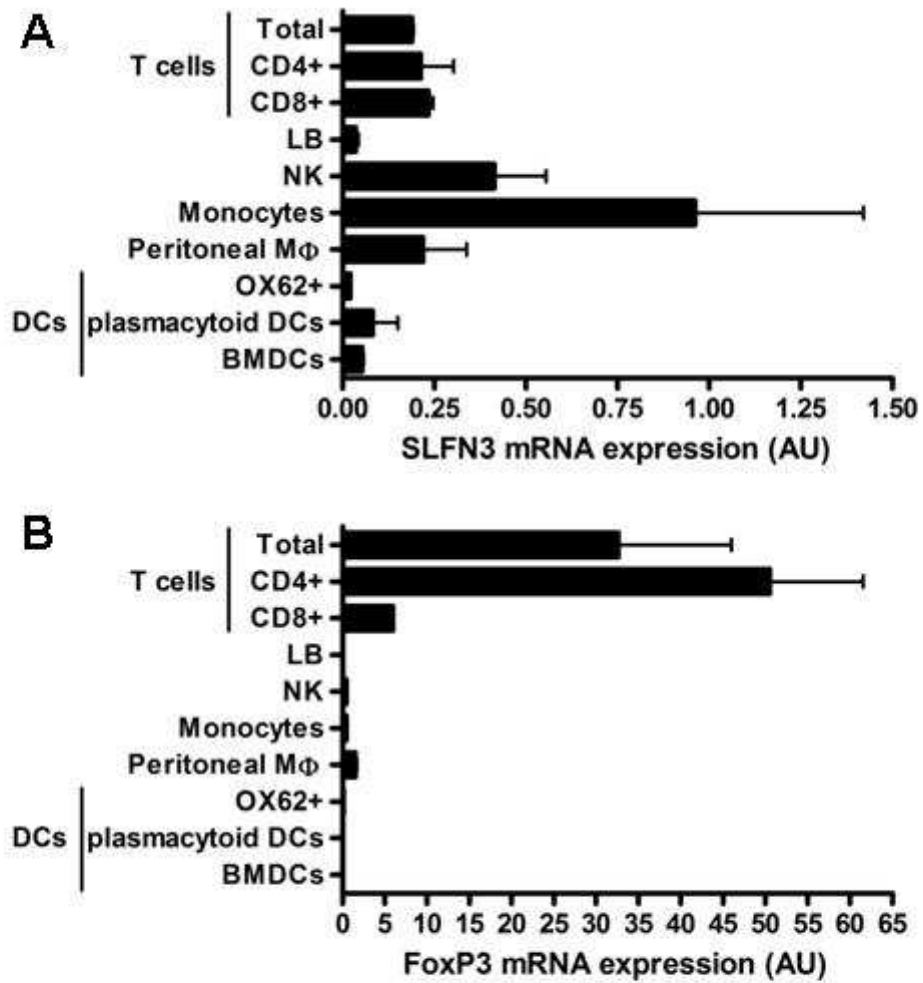


Figure 4

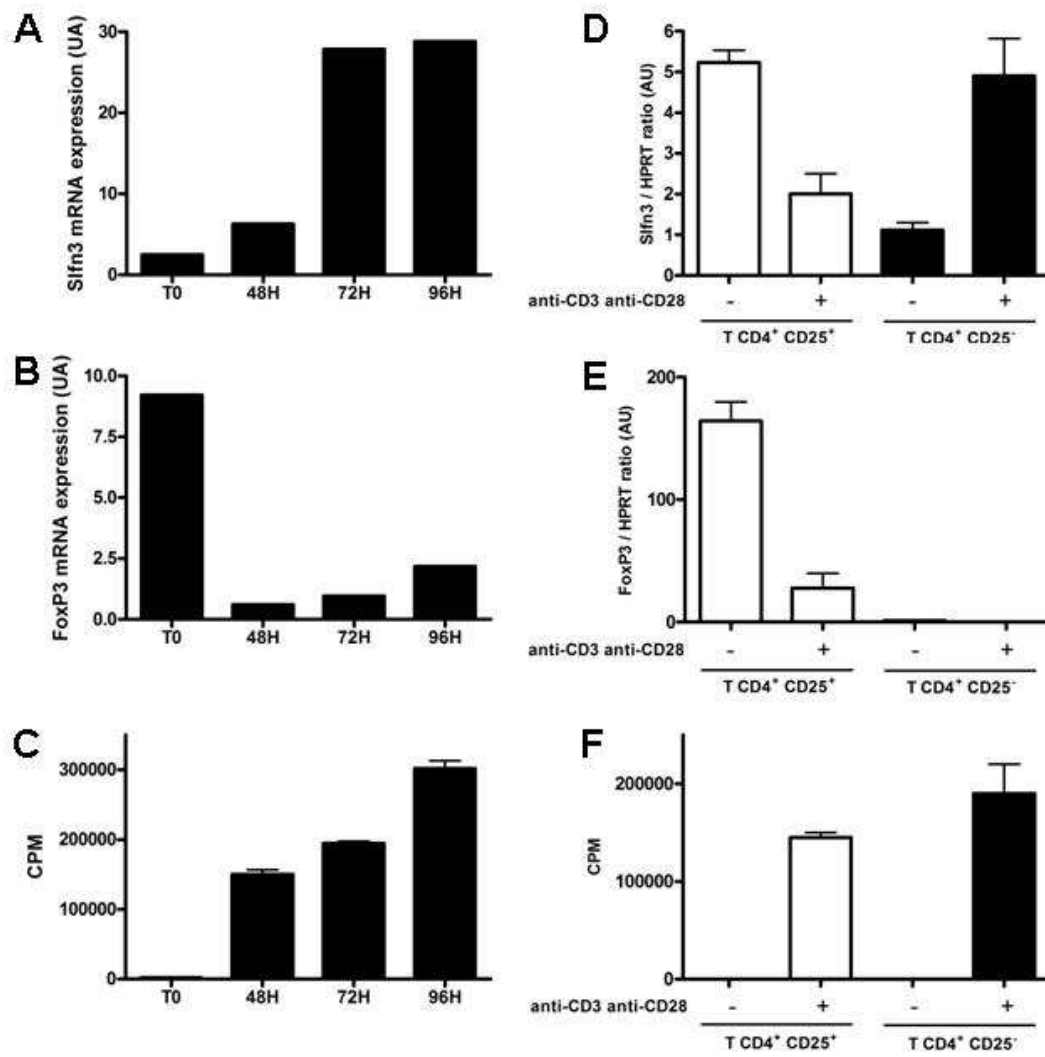


Figure 5

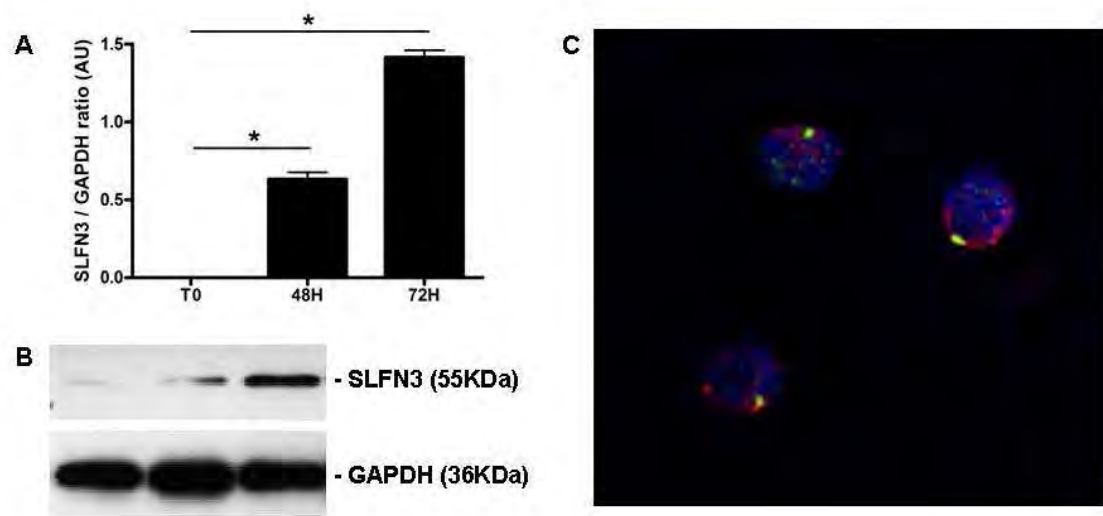
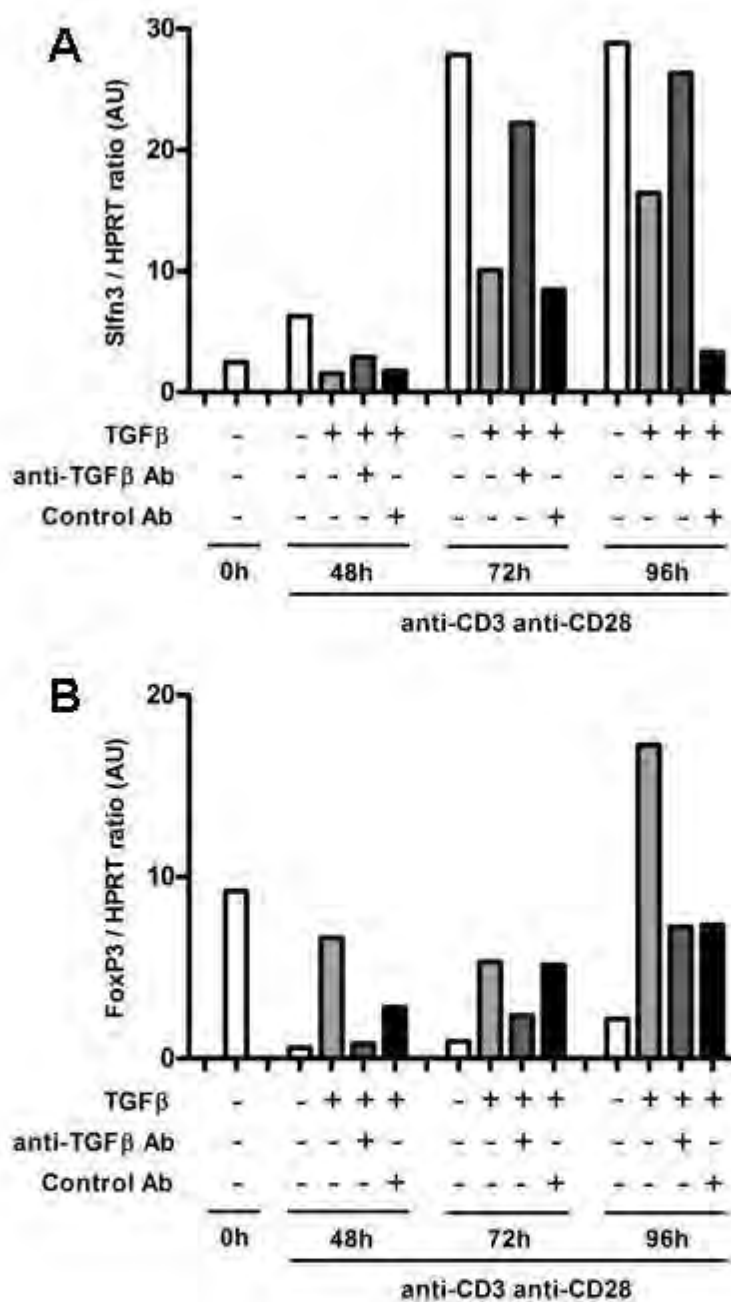


Figure 6



3- Discussion et perspectives

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 restimulés *in vitro* par les antigènes du donneur d'animaux tolérants à long terme traités au LF15-0195. Nous avons précédemment montré que les splénocytes des animaux tolérants 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 tolérants, une population de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ capable de transférer la tolérance (Chiffolleau et al. 2002b), et fortement représentée (pourcentage et nombre absolu) dans les splénocytes des receveurs tolérants. Nous avons identifié Slfn3 surexprimé dans ces cellules, en comparaison de son expression dans les 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.

Nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de Slfn3 observée dans les cellules T 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 tolérants. 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 dû au plus grand nombre de LT CD4⁺ CD25⁺ parmi les cellules T des animaux tolérants.

La famille Slfn a récemment été décrite comme ayant un rôle dans l'activation des cellules T (Schwarz et al. 1998; Geserick et al. 2004). Slfn3 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 et al. 1998). Dans cette étude, nous montrons une forte induction de l'expression de Slfn3 dans les LT activés, avec un niveau d'expression dépendant du temps de stimulation. Nous avons également montré une différence d'expression transcriptionnelle de Slfn3 selon la sous-population CD4⁺ stimulée. Alors que la stimulation avec anti-CD3 et anti-CD28 induit une surexpression de Slfn3 dans les LT totaux, CD4⁺ et CD8⁺, nous avons observé une régulation opposée dans les LT CD4⁺CD25⁺. En effet l'expression de Slfn3 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 Sln3 ne jouerait pas un rôle direct dans les mécanismes de prolifération, au moins dans les LT, comme il l'avait été suggéré par d'autres auteurs (Schwarz et al. 1998).

Nous avons démontré dans cette étude une régulation négative de Sln3 par le TGFβ pendant l'activation des LT (totaux, CD4⁺ ou CD8⁺). Le TGFβ a été montré comme ayant une implication importante dans la régulation de l'activation et la différenciation des LT (Ranges et al. 1987; Gorelik and Flavell 2002; Chen et al. 2003b). Il a également un effet régulateur dans certaines fonctions des LT (prolifération, apoptose) (Kehrl et al. 1986; Green et al. 2003a; Marrack and Kappler 2004). L'effet anti-prolifératif du TGFβ a notamment été démontré *in vitro* sur les LT (Kehrl et al. 1986). Nos résultats montrent que l'augmentation de l'expression de Sln3 pendant l'activation des LT ne semble pas liée à la prolifération de ces cellules, suggérant que l'effet anti-prolifératif du TGFβ et l'inhibition de l'expression de Sln3 pourraient répondre à deux mécanismes indépendants. Le TGFβ 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 et al. 1987; Smyth et al. 1991). Nous avons montré que Sln3 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 Sln3 dans la différenciation des LT.

D'autre part, il a été montré que certaines molécules de la famille Sln, en particulier Sln2, peuvent être exprimées les cellules myéloïdes (Lund et al. 2006; Sohn et al. 2007). De plus, il a été montré dans ces publications que la maturation de ces cellules avec du LPS induit une augmentation de l'expression de ces molécules. Nous avons donc analysé l'expression de Sln3 dans des cellules dendritiques plus ou moins stimulés en présence de LPS (Figure 30). Nous avons observé que comme pour les molécules Sln1 et 2, lors de l'activation par stimulation au LPS, l'expression de Sln3 est augmentée au niveau transcriptionnel. Cependant, 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 Sln3 dès 2h et une diminution ensuite à 24h. La cinétique d'induction de Sln3 lors de la stimulation des cellules semble donc être différente entre les LT et les DCs.

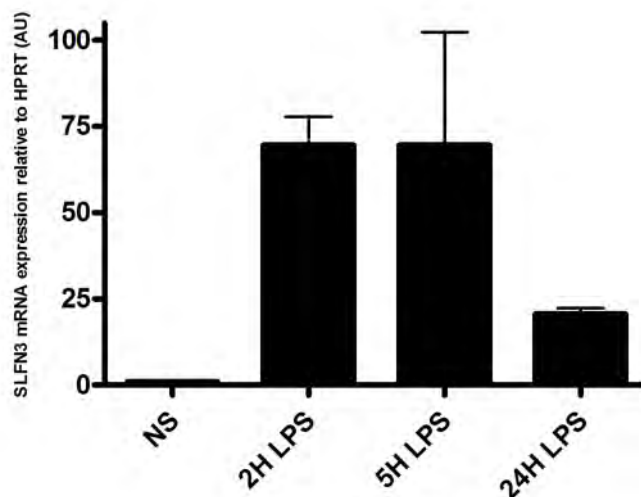


Figure 30 : Expression de Slfn3 dans les cellules dendritiques chez le rat.

Les DCs spléniques (OX62⁺) ont été purifiées et ensuite mis en culture en présence de LPS. Les cellules ont été récupérées au différents temps de la cinétique et les ARNm totaux ont alors été extraits. L'expression de Slfn3 a été analysée par RT-PCR quantitative. L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU). Ces résultats représentent la moyenne de l'expression de Slfn3 dans trois échantillons distincts.

En analysant l'expression protéique par immuno-histochimie de Slfn3 dans des BMDCs avant et après activation au LPS (Figure 31), 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 31), la localisation du marquage de Slfn3 devient plus diffuse avec un marquage de forme granulaire, après activation par le LPS (Figure 31). De plus, des expériences de co-marquage ont montré que l'expression de Slfn3 dans les cellules non stimulées est localisée à l'intérieur de l'appareil de Golgi (Figure 32). Cette régulation de la localisation de Slfn3 suite à la maturation des DCs pourrait être un facteur déterminant dans la fonction de cette molécule.

L'analyse de la séquence protéique de Slfn3 a montré que cette séquence 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 et al. 1999). Nous pouvons donc supposé que lors de l'activation des LT ou des DCs certaines caspases soient activés et clivent la protéine Slfn3 permettant sa relocalisation dans le cytoplasme de la cellule. Ainsi Slfn3 pourrait exercer son activité dans les cellules activées et suivant cette hypothèse, n'aurait pas de fonction dans les cellules au repos.

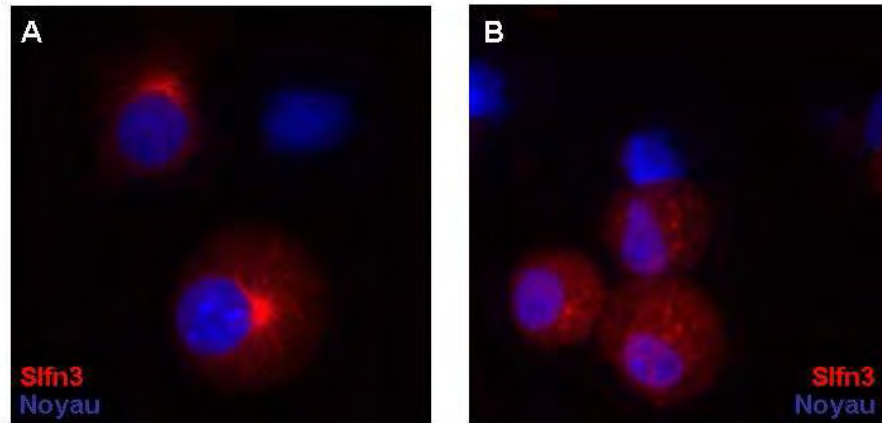


Figure 31 : Expression et localisation protéique de Sfn3 dans des BMDCs.

Les BMDCs ont été stimulées ou non en présence de LPS pendant 24 heures et des marquages par immuno-histochimie sur des BMDCs fraîches (**A**) ou activées au LPS (**B**) ont été réalisés. Les marquages sont réalisés avec un anticorps primaire polyclonal dirigé contre Sfn3 (marquage rouge). Les noyaux des cellules sont marqués au dapi (marquage bleu).

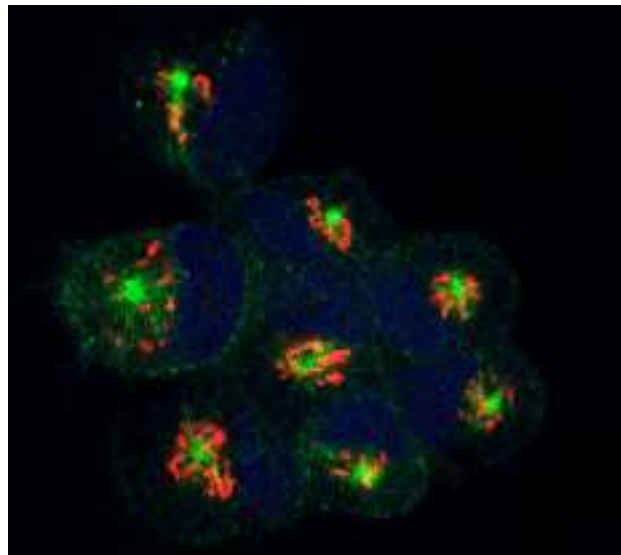


Figure 32 : Expression de Sfn3 dans l'appareil de Golgi dans des BMDCs au repos.

Les marquages ont été réalisés sur des BMDCs non stimulés par immunocytochimie. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps polyclonal anti-Sfn3 (marquage vert), l'anticorps anti-GM130 (marquage rouge) qui reconnaît spécifiquement l'appareil de golgi et du Draq5 (Marquage bleu) qui marque l'ADN.

D'autre part, nous avons pu montrer que Sfn3 est fortement induit suite à l'activation des LT et des DCs. Sohn et collaborateur a, de plus, montré que la molécule Sfn2 est régulé positivement dans les cellules dendritiques par les facteurs de transcription AP1 et NFkB, très fortement impliqué dans l'activation des cellules dendritiques mais aussi dans celle des LT (Sohn et al. 2007). Nous avons donc pensé que la molécule Sfn3 pourrait être, de la même façon exprimé sous le contrôle de ces facteurs de transcription. Afin de tester cette hypothèse, nous avons stimulé des lymphocytes T en présence ou non d'inhibiteur de la

phosphorylation de ces facteurs de transcription. Cependant, nous ne pouvons pas conclure, à l'heure actuelle, car l'utilisation de ces inhibiteurs dans nos expériences ne bloque pas la production d'IL2.

Nous souhaitons maintenant caractériser la fonction de cette molécule dans les LT mais aussi dans les DCs. Dans ce but, nous avons généré, en collaboration avec l'équipe d'I. Anegón (INSERM U643), des rats transgéniques pour la molécule *Slfn3*. Pour cela, nous avons microinjecté un lentivirus codant pour *Slfn3* et la GFP (Green Fluorescent Protein) dans l'espace périvitellin de l'embryon. Nous avons ainsi pu établir plusieurs lignées de rats transgéniques. Nous commençons tout juste l'analyse de ces lignées et avons pu établir qu'au moins deux d'entre elles présentent une surexpression de *Slfn3* dans les organes lymphoïdes. Nous allons maintenant analyser le phénotype de ces animaux afin de déterminer si la surexpression de *Slfn3* induit un phénotype particulier dans ces animaux. De plus, nous allons analyser l'expression de *Slfn3* dans les LT et les DCs afin de voir si ces populations surexpriment cette molécule. Si tel est le cas, ces cellules représenteraient de très bons outils afin de d'analyser l'effet de la surexpression de *Slfn3* dans les LT ou les cellules dendritiques. Une autre stratégie afin d'étudier la fonction de la molécule *Slfn3* serait d'inhiber son expression dans les cellules. Pour cela, nous sommes en train de tester l'efficacité d'inhibition de différents SiRNA spécifiques de cette molécule dans des BMDCs et dans des LT.

En conclusion, nous avons montré qu'il existait une régulation transcriptionnelle de *Slfn3* lors de l'activation des différentes sous populations de LT, ainsi que lors de l'activation des DCs. De façon intéressante, nous avons pu montrer que cette molécule est fortement exprimée par les Tregs mais son expression diminue suite à la stimulation de ces cellules alors que l'expression de *Slfn3* augmente fortement dans les lymphocytes T effecteurs. Ces résultats laissent donc penser que *Slfn3* serait impliqué dans l'activation / différenciation des lymphocytes T et que cette molécule pourrait devenir un marqueur d'activation cellulaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

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. Cependant, il paraît difficilement concevable qu'une seule molécule puisse permettre d'induire une tolérance spécifique du greffon et dans ce cas, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'établissement et le maintien d'une tolérance immune pourrait permettre d'établir de nouveaux protocoles thérapeutiques.

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 plus précisément son mode d'action et essayer d'optimiser son effet afin d'envisager son utilisation d'un point de vue thérapeutiques dans le contexte de la l'allogreffe mais aussi dans le contexte d'autres pathologie comme la sclérose en plaques.

La caractérisation de la fonction de TORID pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de tolérance induits par les cellules myéloïdes (DC et MDSC). Si l'importance de TORID dans les propriétés tolérogéniques de ces cellules sont confirmés, il serait alors envisageable de moduler l'expression de TORID dans ces cellules pour ensuite les utilisées dans le cadre de protocole de thérapie cellulaire en allogreffe mais aussi dans d'autres pathologies tel que les maladies auto-immunes ou dans des traitements anti-cancéreux.

Au départ du travail qui nous a amenée à nous intéresser à Slfn3, nous avons dans l'idée d'étudier une molécule directement impliquée dans la tolérance. Au travers des résultats que nous avons obtenus, 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

American Journal of Transplantation 2007; 7: 2472–2482
Blackwell Munksgaard

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The American Society of
Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/j.1600-6143.2007.01960.x

Role of IFN γ in Allograft Tolerance Mediated by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by Induction of IDO in Endothelial Cells

P. Thebault^a, T. Condamine^a, M. Heslan^a,
M. Hill^a, I. Bernard^b, A. Saoudi^b, R. Josien^a,
I. Anegon^a, M. C. Cuturi^a and E. Chiffoleau^{a,*}

^aINSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France

^bINSERM U563, Toulouse, France

* Corresponding author: Elise Chiffoleau,
Elise.Chiffoleau@univ-nantes.fr

Regulatory T cells have been described to specifically accumulate at the site of regulation together with effector T cells and antigen-presenting cells, establishing a state of local immune privilege. However the mechanisms of this interplay remain to be defined. We previously demonstrated, in a fully MHC mismatched rat cardiac allograft combination, that a short-term treatment with a deoxyspergualine analogue, LF15-0195, induces long-term allograft tolerance with a specific expansion of regulatory CD4⁺CD25⁺T cells that accumulate within the graft. In this study, we show that following transfer of regulatory CD4⁺T cells to a secondary irradiated recipient, regulatory CD25⁺Foxp3⁺ and CD25⁺Foxp3⁻ CD4⁺T cells accumulate at the graft site and induce graft endothelial cell expression of Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) by an IFN γ -dependent mechanism. Moreover, *in vivo* transfer of tolerance can be abrogated by blocking IFN γ or IDO, and anti-IFN γ reduces the survival/expansion of alloantigen-induced regulatory Foxp3⁺CD4⁺T cells. Together, our results demonstrate interrelated mechanisms between regulatory CD4⁺CD25⁺T cells and the graft endothelial cells in this local immune privilege, and a key role for IFN γ and IDO in this process.

Key words: Endothelial cells, Foxp3, IFN γ , rat, regulatory T cells, tolerance

Received 06 March 2007, revised 24 July 2007 and accepted for publication 26 July 2007

Introduction

Functionally specialized subsets of regulatory CD4⁺T cells have been shown to play an important role in the regulation

of both T-cell-mediated and innate immune responses (1). In particular, the CD4⁺CD25⁺ subpopulation of T cells has been shown to be crucial in self-tolerance and also to prevent allograft rejection (2–4). It was recently reported that most human and mouse regulatory CD4⁺CD25⁺T cells express forkhead box protein 3 (Foxp3), a specific transcription factor that controls both their development and function (5–7). As CD25 is not uniquely expressed by regulatory T cells, but can also be expressed by activated effector cells, the identification of Foxp3 has provided an opportunity to specifically identify regulatory T cells and to track them *in vivo* so as to better define the mechanisms involved in their regulation of immune responses (8,9).

In models of allograft tolerance in rodents, alloantigen-specific and highly suppressive regulatory CD4⁺CD25⁺T cells have been shown to preferentially accumulate within the graft, where they hold effector cells in check by exertion of regulatory mechanisms (10,11). These findings suggest an interplay between regulatory T cells, effector cells and antigen-presenting cells (APC) within the graft itself, leading to local immune privilege and long-term tolerance. The comprehension of the active suppressive mechanisms involved in this phenomenon of local immune privilege may help to generate new therapies in the clinical setting.

We previously demonstrated in a fully MHC mismatched rat cardiac allograft combination, that a short-term treatment with a deoxyspergualine analogue, LF15-0195, induces allograft tolerance with no signs of chronic rejection at long-term and is characterized by a specific expansion of CD4⁺CD25⁺T cells that accumulate in the spleen and graft (12–14). Moreover, we observed an accumulation of transcripts coding for numerous cytoprotective molecules in long-term tolerated allografts, such as Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), Nitric Oxide synthase (NOS) and Heme-Oxygenase-1 (HO-1) (15). These data suggested that in our model, long-term tolerance is maintained locally by interrelated mechanisms involving regulatory T cells and the graft itself, to regulate local effector cells and to prevent graft damage.

We previously showed that CD4⁺T cells from the spleen or from the graft are able to transfer tolerance to a subsequent sublethally irradiated host, demonstrating the presence of powerful regulatory T cells (13,14). However, the

involvement of Foxp3⁺ regulatory T cells and the mechanisms of action of tolerance transfer remained to be defined. Here, we demonstrate that following transfer of regulatory CD4⁺T cells to a secondary recipient, regulatory CD25⁺Foxp3⁺ and CD25⁺Foxp3⁻ CD4⁺T cells accumulate in the graft and induce the expression of IDO by graft endothelial cells (EC). This induction is strictly dependent on IFN γ , a molecule that plays a crucial role in allograft tolerance in our model. This study thus reveals a key role for IFN γ in the induction of local immune privilege by regulatory CD4⁺CD25⁺T cells.

Materials and Methods

Animals and transplantation

Rats were purchased from the 'Centre d'Élevage Janvier' (Genest-Saint-Isle-France) and maintained in an animal facility under standard conditions according to our institutional guidelines. LEW.1W (RT1u) or LEW.1A (RT1a) rats served as heart donors and LEW.1A as recipients. Heterotopic cardiac allografts were performed as previously described (16). LF15-0195 (Fournier Laboratories) was administered to recipients by i.p. injection at 3 mg/kg/day for 20 days (12). The model of chronic rejection was induced by two donor blood transfusions (DST) prior to transplantation (15,17). The graft function was assessed daily by scoring heart pulsations through the abdominal wall.

Antibodies

Some anti-rat monoclonal antibodies (Abs) (European collection of Cell Culture [Salisbury, UK]) were labeled with FITC, Allophycocyanin-Cyanin7 (APC-Cy7), PE, AlexaFluor-647 or 488 (Biotantique, Nantes, France). Commercial Abs: anti-rat CD3, Foxp3 (Clinisciences, Montrouge, France), CD31 (Serotec, Oxford, UK); Rabbit polyclonal anti-rat iNOS (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France), IDO (Neosystems, Strasbourg, France) and HO-1 (Stressgen Biotechnologies, Canada). Biotin-anti-mouse IgG, AlexaFluor-568 anti-mouse, FITC anti-rabbit, HRP-streptavidin and PE-streptavidin purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA). HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (from Pierce, Rockford, IL). The hybridomas producing anti-rat CD28 antibody was kindly provided by T. Hüning (University of Würzburg, Germany) and anti-rat IFN γ (DB-1) by P.H. Van der Meide (Rijswijk, The Netherlands).

Western blot

Total lysate from naïve hearts or from syngeneic, chronically rejected or tolerant allografts (day 100 or from transferred recipients [day 35]) were prepared. Nitrocellulose membrane blocked with TBS (Tween-20-Tris buffered saline)-5% milk, were incubated with rabbit anti-IDO, anti-HO-1 or mouse anti-tubulin (1 μ g/mL) diluted in TBS-5% milk (overnight) and then with HRP-goat anti-rabbit (1:6000) or anti-mouse IgG (1:3000). Bands were revealed by enhanced chemiluminescence (Amersham, Little Chalfont, UK), exposed to Kodak film and quantified with Kodak Digital Science Image Analysis 1D Software.

Immunohistology

Cardiac tissue was snap-frozen in liquid nitrogen after embedding in OCT compound (Tissue Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN). Cryostat sections (7 μ m) fixed in acetone were incubated overnight with anti-IDO, iNOS or HO-1 Abs (1.5 μ g/mL), followed by a FITC-anti-rabbit, by anti-rat CD31 or class II MHC (5 μ g/mL) and by AlexaFluor-568 anti-mouse Abs, and DAPI and mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), and observed by fluorescence microscopy (Axioskop2 plus, Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany). Images were visualized (\times 400) and processed using the AxionVision Viewer program (Carl Zeiss Inc.).

Role of IFN γ in Allograft Tolerance

Cell purification

Graft-infiltrating cells (GIC): GIC from tolerant recipients (day 100) or from recipients that had received cell transfers (day 5 or day 35) were recovered, pressed through a stainless steel mesh and isolated by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham, Biosciences, Sweden) and then stained with mAbs and analyzed with a FACS LSR-II flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

T-cell purification: Spleen-derived CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells from naïve rats or from tolerant recipients were purified by positive selection using a FACSaria flow cytometer (Becton Dickinson). Splenocytes were stained with R7-3-FITC, Ox35-Cy7, Ox8-PE or Ox39-APC Alexa-647 for CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ T-cell purification. Purity was >99%.

Endothelial cell-T-cell coculture

EC of LEW.1W or LEW.1A origin were isolated as previously described (18) and plated into 6 well plates (NUNC™ Merck, Eurolab, France) (1 \times 10⁶ cells/well) in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 5 \times 10⁻⁵ M-2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 10% heat-inactivated FCS [GIBCO]). After overnight culture (37°C, 5% CO₂), highly purified CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺T cells from naïve rats or from tolerant recipients were added (5 \times 10⁵ cells/well) to the EC cultures (with irrelevant mAb [3G8] or anti-IFN γ at 5 μ g/mL). Twenty-four h later, the lymphocytes were discarded and the adherent EC were washed several times and lysed with Trizol (Invitrogen) for RT/PCR analysis of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) and IDO expression.

RNA extraction and real-time quantitative RT/PCR

RNA extraction and real-time quantitative RT/PCR was performed as previously described in an Applied Biosystems-GenAmp 7700 Sequence Detection System using SYBR-Green PCR Core Reagents (19). The oligonucleotides used were: rHPRT (Up-CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC, Lo-TTC-GCTGATGACACAAACATGA), rIDO (Up-ATCCAGACACCTTTTCCACG, Lo-CAGCAGATCCTCACCAACG) and rIFN γ (Up-TGGATGCTATGGAAGG-AAAGA, Lo-GATTCTGGTACAGCTGGTG). HPRT was used as an endogenous control gene to normalize for varying starting amounts of RNA, data were expressed in arbitrary units (AU).

Stimulation assays

Anti-CD3/CD28: CD4⁺T cells from naïve rats or from rejecting or tolerant recipients (5 \times 10⁴ cells/well) were stimulated in 96 well flat-bottom plates (NUNC™) coated with anti-CD3 (0.75 μ g/mL) and with addition of soluble anti-CD28 (0.6 μ g/mL) in a final volume of 200 μ L of complete medium.

Mixed Leukocyte Reaction (MLR): APC-enriched cell populations from donor-type isolated by a Nicodez gradient served as stimulator cells. Responder (CD4⁺T cells) (2 \times 10⁵) were labeled with CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester) (Molecular Probes, Eugene, OR) as previously described (20) and plated with stimulator cells (5 \times 10⁴) in 96 well round-bottomed plates in 200 μ L of complete medium. For intracellular cytokine staining, CD4⁺T cells were cultured in the presence of brefeldin A (5 μ g/mL, last 4 h). Cells were stained with anti-TCR $\alpha\beta$ and CD4 mAbs, fixed in 2% paraformaldehyde, incubated with PBS/0.2% FCS/0.5% saponin (15 min) and then with anti-IFN γ or anti-Foxp3-APC (5 μ g/mL) for 1 h, washed and analyzed using a FACS LSR II after gating on the CD4⁺T-cell population.

In vivo transfer experiments and IFN γ and IDO neutralization

A total of 20 \times 10⁶ CD4⁺T cells from tolerant recipients or from naïve rats (in some cases stained with CFSE) were injected i.v. (in 500 μ L of PBS)

Thebault et al.

on the day of cardiac transplantation into secondary syngeneic irradiated recipients (4 Grey, whole body irradiation (IFR 26, Nantes, France) 1 day before transplantation). A neutralizing anti-rat IFN γ mAb was injected i.p. (2.5 mg/kg) every day. 1-Methyl-DL-Tryptophan (Sigma) neutralizing IDO enzymatic activity (competitive inhibitor) was prepared by dilution in NaOH, adjusted to pH 9 with HCl, diluted in water, and administered orally at 0.2 mg/kg twice daily as previously described (21).

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 mean \pm SEM.

Results***Foxp3*⁺*CD4*⁺*CD25*⁺ regulatory T cells accumulate in the spleen and graft of tolerant recipients**

We previously demonstrated an accumulation of CD4⁺CD25⁺T cells expressing high levels of Foxp3 mRNA transcripts in the spleen and graft of long-term tolerant recipients and that Foxp3 could be considered as a marker of regulatory CD4⁺CD25⁺T cells in rats (13,14). Here we studied the expression of Foxp3 at the protein level in CD4⁺T cells from tolerant recipients. We found a significant increase in the percentage of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells in the spleen of tolerant recipients (8.6%) compared to naïve rats (3.9%), long-term syngeneic recipients (4.4%) and recipients that had rejected their allografts (3.6%) (*n* = 4, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, Figure 1A[a]; representative dot plot Figure 1B). We also observed numerous CD4⁺CD25⁺T cells that did not express Foxp3 in the spleen of tolerant recipients (16.9%) compared to naïve rats (4.6%), long-term syngeneic recipients (8%) and recipients that had rejected their allografts (7%) (*n* = 4, ***p* < 0.01, Figure 1A[a]; representative dot plot Figure 1B). The same results were observed in absolute number (*n* = 4, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, Figure 1A[b]). Moreover, up to 40% of the CD4⁺T cells expressed CD25 within the graft-infiltrating cells of tolerant recipients, with about half of them expressing Foxp3 (*n* = 4, Figure 1A[a]; representative dot plot Figure 1B).

These data demonstrate a specific accumulation of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells in the spleen and graft of tolerant recipients, and also the presence of numerous Foxp3⁻CD4⁺CD25⁺T cells.

Endothelial cells from long-term-tolerated allografts express IDO, iNOS and HO-1

We previously demonstrated a high expression of transcripts coding for IDO, iNOS and HO-1 in long-term-tolerated allografts compared to allografts that had developed chronic rejection and syngeneic grafts (15). In order to determine which cells express these molecules, we performed immunofluorescence on allografts. Interestingly, only EC (CD31⁺) from tolerated allografts expressed

HO-1, iNOS or IDO (Figures 2A[b], [c] and [d], respectively). Staining was attributed mostly to medium-sized vessels for iNOS and HO-1, and to small vessels for IDO. In long-term allografts that had developed chronic rejection or in syngeneic grafts, no staining for HO-1 or iNOS was detectable by immunofluorescence and staining for IDO was observed in only a few EC. The higher expression of IDO in tolerated allografts compared to syngeneic grafts and of HO-1 compared to allografts displaying signs of chronic rejection was confirmed at the protein level by Western blot (Figure 2B, *n* = 3, **p* < 0.05). These results demonstrate a high and specific expression of HO-1, iNOS and IDO by EC in long-term-tolerated allografts.

***Following transfer, CD4*⁺*T cells from tolerant recipients induce accumulation of regulatory Foxp3*⁺*CD25*⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺ T cells and the production of IDO by donor graft EC**

The accumulation of regulatory T cells within the tolerated allografts and the high expression of cytoprotective molecules by graft EC suggested an interplay between these cells. To test this hypothesis, we transferred CFSE-labeled spleen-derived CD4⁺T cells from tolerant recipients or from naïve rats to secondary, sub lethally irradiated heart allograft recipients and analyzed their proliferation, homing and phenotype. Five days after transfer of CFSE-labeled CD4⁺T cells from naïve rats or tolerant recipients, some CFSE⁺CD4⁺T cells were detected in the new allograft and were proliferating (3%, *n* = 4), but none of them were Foxp3⁺ (Figure 3A[a] and [b]). However, interestingly, a higher percentage of CFSE⁻CD4⁺Foxp3⁺ was observed in the allografts following transfer of CD4⁺T cells from tolerant recipients compared with transfer of CD4⁺T cells from naïve rats (16% vs. 10%, *n* = 4, Figure 3A[a] and [b]). These data demonstrate a specific accumulation of Foxp3⁺CD4⁺T cells in the allografts following transfer with CD4⁺T cells from tolerant recipients that seem to be newly induced regulatory T cells from host origin. Moreover, similar to the observations in long-term-tolerant recipients, 35 days after transfer of CD4⁺T cells from tolerant recipients, numerous Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ and Foxp3⁻CD4⁺CD25⁺ T cells accumulated in the spleen (9% and 13%, respectively) and within the graft (14% and 27%, respectively) compared to the spleen of recipients that have been transferred with naïve CD4⁺T cells and that received a syngeneic graft (6% and 3%, respectively) (*n* = 3 or 4, Figure 3B[a] and [b], ***p* < 0.01, ****p* < 0.001). Interestingly, in the allografts, the Foxp3⁻CD4⁺CD25⁺ cells contained numerous IFN γ ⁺-producing cells (11%; *n* = 3, Figure 3B[b]). These data demonstrate that following transfer with regulatory CD4⁺T cells from tolerant recipients, newly induced Foxp3⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺CD25⁺T cells accumulated in the allografts.

Moreover, allografts from recipients that had received CD4⁺T cells from tolerant recipients expressed higher levels of protein for IDO than syngeneic grafts from recipients

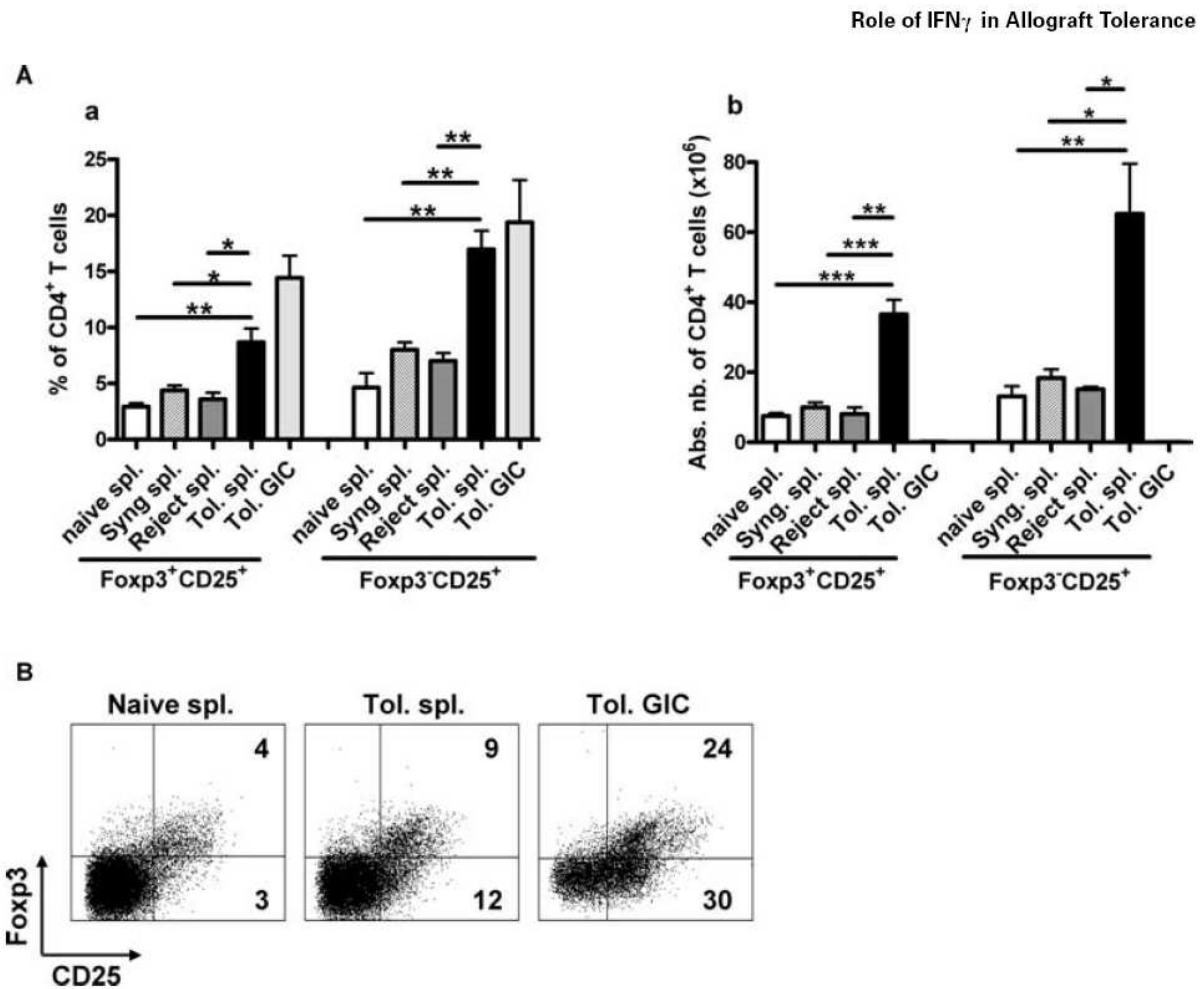


Figure 1: High percentage and absolute number of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ and Foxp3⁻CD4⁺CD25⁺T cells in the spleen and allograft of long-term tolerant recipients. (A) (a) Percentage, (b) Absolute number and (B) representative dot plots of Foxp3⁺CD25⁺ and Foxp3⁻CD25⁺ in spleen-derived CD4⁺T cells from naïve rats, from long-term recipients with syngeneic grafts, from long-term recipients that had rejected their allografts (untreated), from long-term tolerant allograft recipients (day 100 posttransplantation), and graft infiltrating CD4⁺T cells from long-term tolerant recipients (day 100 posttransplantation). Cells were stained with anti-TCR, anti-CD4 and anti-CD25, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Foxp3 mAb as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on CD4⁺T cells and results are expressed as percentage and absolute number of CD4⁺T cells (n = 4), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

that had received CD4⁺T cells from naïve rats (day 35, n = 3, **p < 0.01, Figure 4A[a]). By immunohistology, IDO was found to be expressed exclusively by EC of small-size vessels (CD31⁺) and not by any MHC Class II⁺ leukocytes (Figure 4A[b]). However, HO-1 was not expressed by EC but by other leukocytes, and no expression of iNOS protein was detected in the allografts (data not shown). These data suggested that CD4⁺T cells from recipients that had received cell transfers were able to induce graft EC to produce IDO. To test this hypothesis *in vitro*, we coincubated highly purified CD4⁺CD25⁺ or CD25⁻T cells from tolerant recipients or from naïve rats with allogeneic (donor origin) or syngeneic adherent EC and assessed expression of IDO. As shown in Figure 4B, only the CD25⁺ subpopulation of

CD4⁺T cells from tolerant recipients was able to induce significant expression of IDO transcripts in allogeneic EC (n = 3, **p < 0.01). This induction was moderate compared to that obtained with a high dose of IFN γ . Moreover, the induction was donor-specific and strictly dependent on IFN γ . These data demonstrate that CD4⁺CD25⁺T cells from tolerant recipients directly induce donor-type EC to rapidly express IDO through an IFN γ -dependent mechanism.

In vivo transfer of tolerance is dependent on IFN γ and IDO

In order to determine whether IDO or IFN γ , which is a potent inducer of IDO expression (22), play a role in the mechanisms of transfer of tolerance, we used neutralizing

Thebault et al.

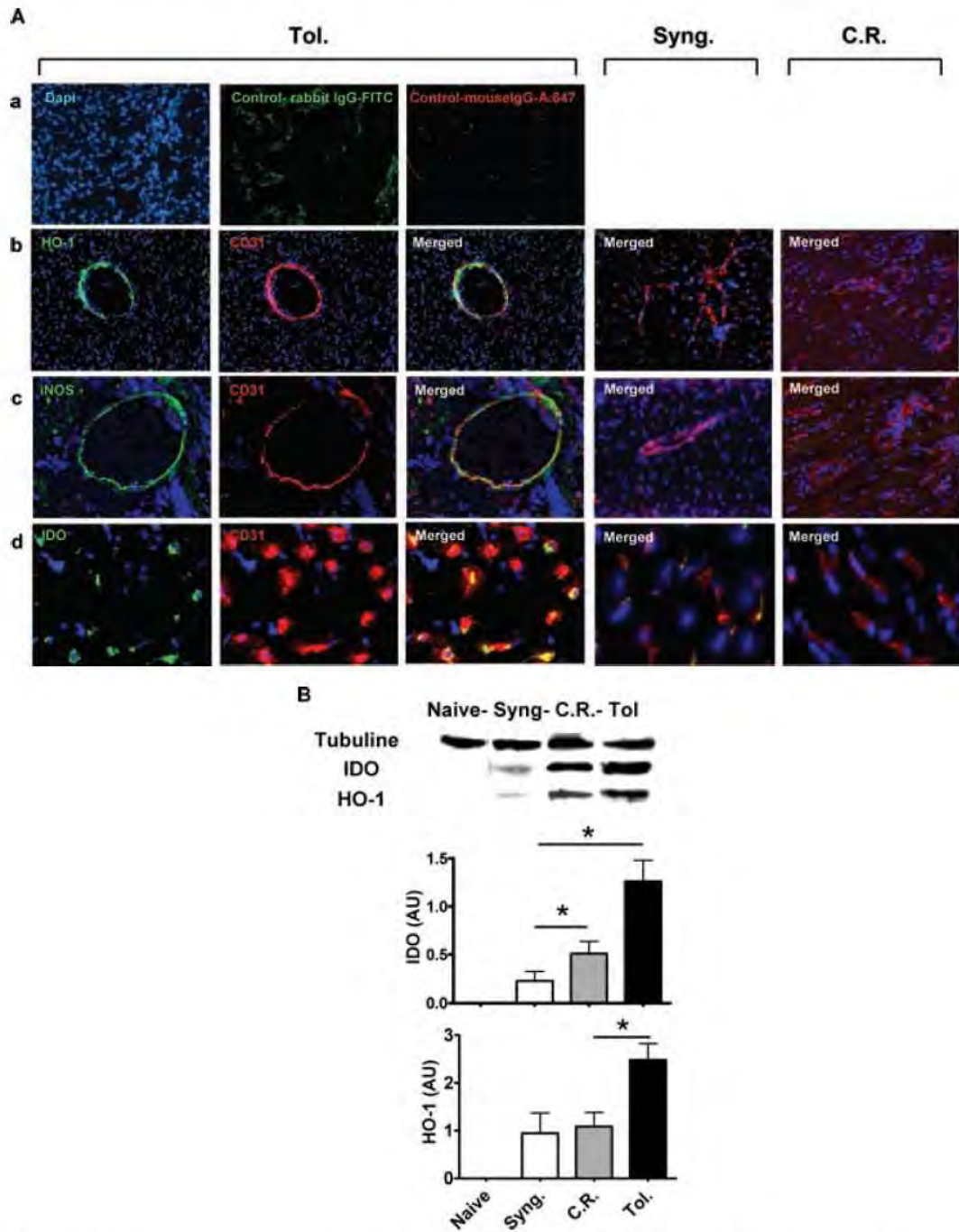


Figure 2: Endothelial cells from long-term-tolerated allografts express high levels of HO-1, iNOS and IDO. (A) Representative pictures of immunofluorescence analysis of long-term-tolerated allografts (Tol.), syngeneic grafts (Syng.) or chronically rejected allografts (C.R.) (day 100 posttransplantation) as described in Material and Methods for (a) Dapi (blue) and isotypic controls rabbit IgG-anti-rabbit FITC (green) and mouse IgG-anti-mouse Alexa 647 (red), respectively (b) HO-1, (c) iNOS and (d) IDO (green) with Dapi (blue) and CD31 (red) staining and merged. Original magnification : $\times 400$ for HO-1 and iNOS and $\times 600$ for IDO. (B) Representative Western Blot analysis of IDO and HO-1 expression in naive hearts (Naive), long-term syngeneic grafts (Syng.), chronically rejected allografts (C.R.) or tolerated allografts (Tol.) (day 100 posttransplantation). The histogram represents IDO/Tubulin and HO-1/Tubulin signal quantification in three samples for each group * $p < 0.05$.

Role of IFN γ in Allograft Tolerance

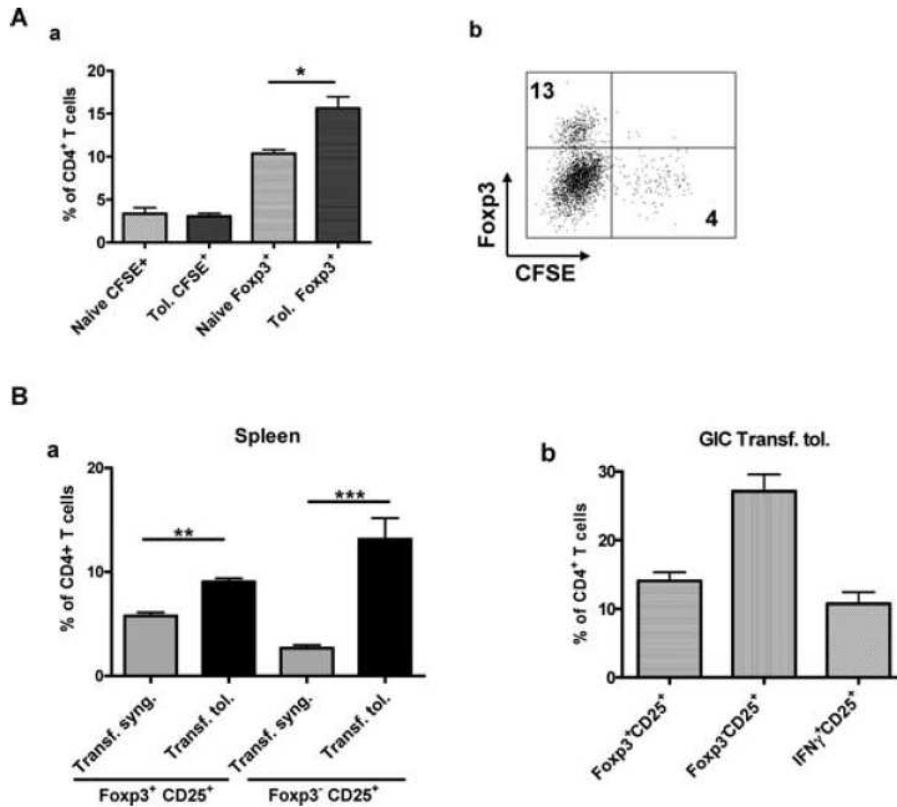


Figure 3: Following transfer to a secondary recipient, CD4⁺T cells from tolerant recipients induce the accumulation of Fopx3⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺T cells. (A) (a) Percentage and (b) representative dot plots of CFSE⁺ versus Fopx3⁺ cells in CD4⁺T cells in the allografts of transferred recipients. 20 × 10⁶ CFSE-labeled spleen CD4⁺T cells from long-term-tolerated allografts or from naïve rats were transferred to a secondary irradiated host as described in the Materials and Methods. Five days after transfer, graft infiltrating cells were purified, stained with anti-TCR and anti-CD4, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Fopx3 mAb as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on CD4⁺T cells (n = 3 or n = 4), *p < 0.05. (B) (a) Percentage of Fopx3⁺CD25⁺ and Fopx3⁻CD25⁺ in spleen-derived CD4⁺T cells of transferred recipients that have received naïve CD4⁺T cells (20 × 10⁶) and syngeneic grafts (Transf. syng., n = 5) and from recipients that have received CD4⁺T cells from tolerant recipients (20 × 10⁶) and allogeneic grafts (Transf. tol., n = 3). (b) Percentage of Fopx3⁺CD25⁺, Fopx3⁻CD25⁺ and IFN γ ⁺CD25⁺ in CD4⁺T cells in the allografts of recipients that have received CD4⁺T cells from tolerant recipients (20 × 10⁶) and allogeneic grafts (GIC Transf. tol., n = 3). Thirty-five days after transfer, spleen-derived or graft infiltrating cells were purified, stained with anti-TCR, anti-CD4 and anti-CD25, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Fopx3 or anti-IFN γ mAb as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on CD4⁺T cells and results are expressed as percentage of CD4⁺T cells.

anti-rat IFN γ mAb and 1-Methyl-DL-Tryptophan. Transfer of tolerance with CD4⁺T cells from tolerant recipients was abrogated in 3 out of 4 recipients by *in vivo* treatment with anti-IFN γ mAb (n = 4, *p < 0.05, Figure 5A) and in all recipients treated with 1-Methyl-DL-Tryptophan (n = 4, **p < 0.01, Figure 5A). However, 1-Methyl-DL-Tryptophan treatment does not break the tolerant state of tolerated allografts induced by LF15-0195 treatment suggesting other mechanisms of regulation at long-term (n = 4, Figure 5A). No effect of control irrelevant mAb 3G8 or vehicle was observed (data not shown). Graft recipients that had received cell transfers and that had promptly rejected their allografts following anti-IFN γ treatment (day 10 after transplantation,

n=2) contained numerous CD4⁺CD25^{low} T cells in their allografts (40%) and few CD4⁺CD25^{high}Fopx3⁺ T cells (7%) (n = 2, Figure 5B) compared to the controls at day 35 (14%, Figure 3B, and representative dot plot Figure 5B). These data suggest that anti-IFN γ treatment induces cellular rejection with numerous effector CD4⁺T cells and few regulatory Fopx3⁺CD4⁺T cells infiltrating the allografts. Moreover, rejected allografts from transferred recipients treated with anti-rat IFN γ had considerably less IDO transcripts than untreated recipients (Figure 5C, n = 3, *p < 0.05). These results demonstrate that IFN γ plays a crucial role in the mechanisms of tolerance transfer in our model that is mediated by the induction of IDO expression by graft EC.

Thebault et al.

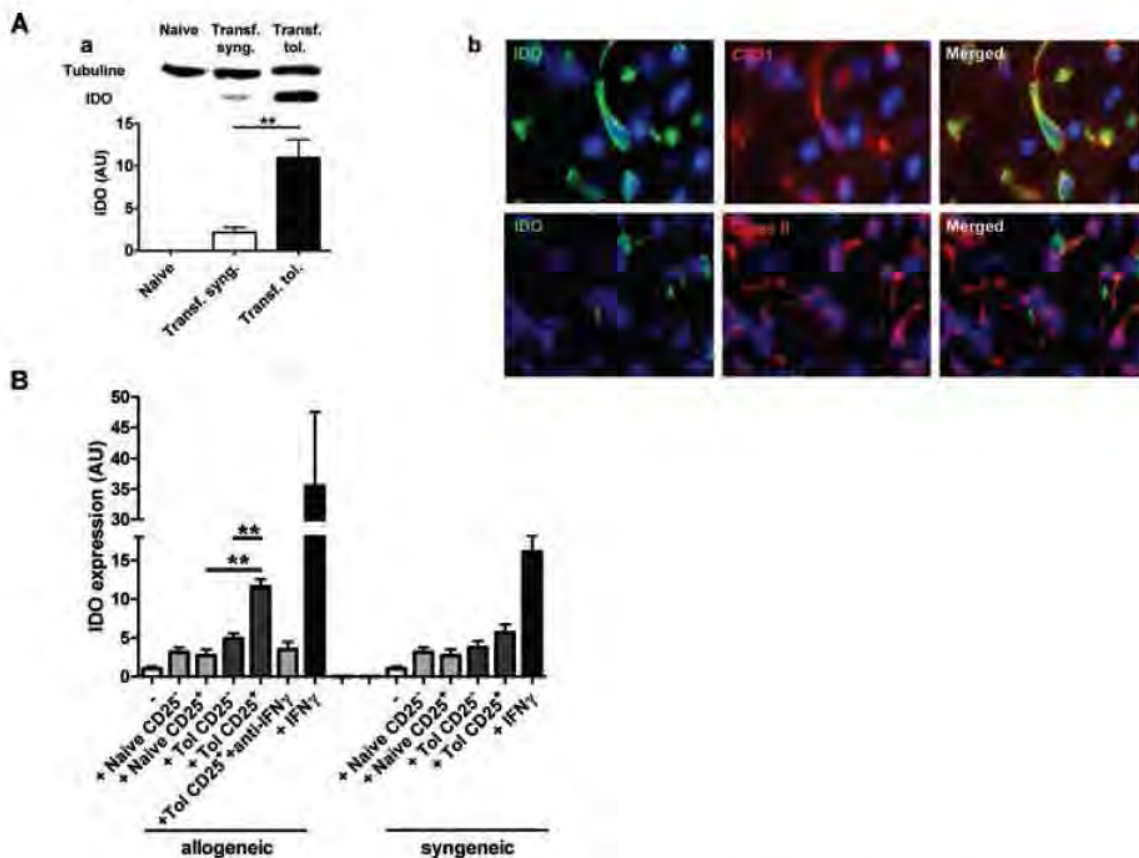


Figure 4: Regulatory CD4⁺T cells from tolerant recipients induce donor-type EC to express IDO by an IFN γ -dependent mechanism. (A) (a) Representative Western Blot analysis of IDO expression in naive hearts (Naive, n = 3), syngeneic grafts from recipients that had received CD4⁺T cells from naive rats (Transf. syng., n = 5) (day 35 posttransplantation) or allografts from recipients that had received CD4⁺T cells from tolerant recipients (Transf. tol, n = 3) (day 35 posttransplantation). The histogram represents IDO/Tubulin signal quantification, **p < 0.01. (b) Representative pictures of immunofluorescence analysis of transferred allografts (day 35 posttransplantation) as described in Material and Methods for IDO (green) with Dapi (blue) and CD31 or MHC Class II (red) staining (merged). Original magnification : $\times 600$. (B) CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺T cells from naïve or tolerant recipients were coincubated for 24 h with allogeneic LEW.1W or syngeneic LEW.1A EC lines in the presence of anti-IFN γ or control 3G8 (5 μ g/mL), and IDO was assessed specifically in EC by quantitative RT/PCR as described in the Materials and methods. EC were incubated with a high dose of IFN γ (50 ng/mL) to induce IDO expression. Results are expressed in AU of IDO/HPRT \pm SEM (n = 3, **p < 0.01).

Expression of IFN γ is detected in the Foxp3⁻ subpopulation of CD4⁺ CD25⁺T cells but is important for the survival of regulatory Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺T cells

In order to determine whether regulatory Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells expressed IFN γ , we assessed intracellular IFN γ production following alloantigen specific or polyclonal stimulation. We were unable to detect intracellular IFN γ protein by FACS in Foxp3⁺CD4⁺T cells from either naïve or tolerant recipients following either types of stimulation (data not shown). However, we observed expression of IFN γ by Foxp3⁻CD4⁺T cells from tolerant recipients following alloantigen-specific or polyclonal stimulation (Figure 6A, 2.6% and Figure 6B, 6.4%, n = 3, respectively) that was similar to that observed with Foxp3⁻CD4⁺T cells

from naïve rats (Figure 6A, 3.4% and Figure 6B, 5.5%, n = 3, respectively) but reduced compared to that observed with Foxp3⁻CD4⁺T cells from rejecting recipients (Figure 6A, 10.3%, ***p < 0.001 and Figure 6B, 12.9%, n = 3, **p < 0.01, respectively). In order to determine whether spleen-derived CD4⁺CD25⁺T cells from tolerant recipients expressed quantitatively more IFN γ than those from naïve rats, we performed quantitative RT/PCR and observed no difference in the level of expression of IFN γ transcripts (Figure 6C). However, the level of IFN γ transcripts in the CD4⁺CD25⁺T cells was relatively low compared to that in the CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺T-cell subpopulations.

Interestingly, we noted that the addition of anti-IFN γ during *in vitro* alloantigen-specific stimulation of CD4⁺T cells

Role of IFN γ in Allograft Tolerance

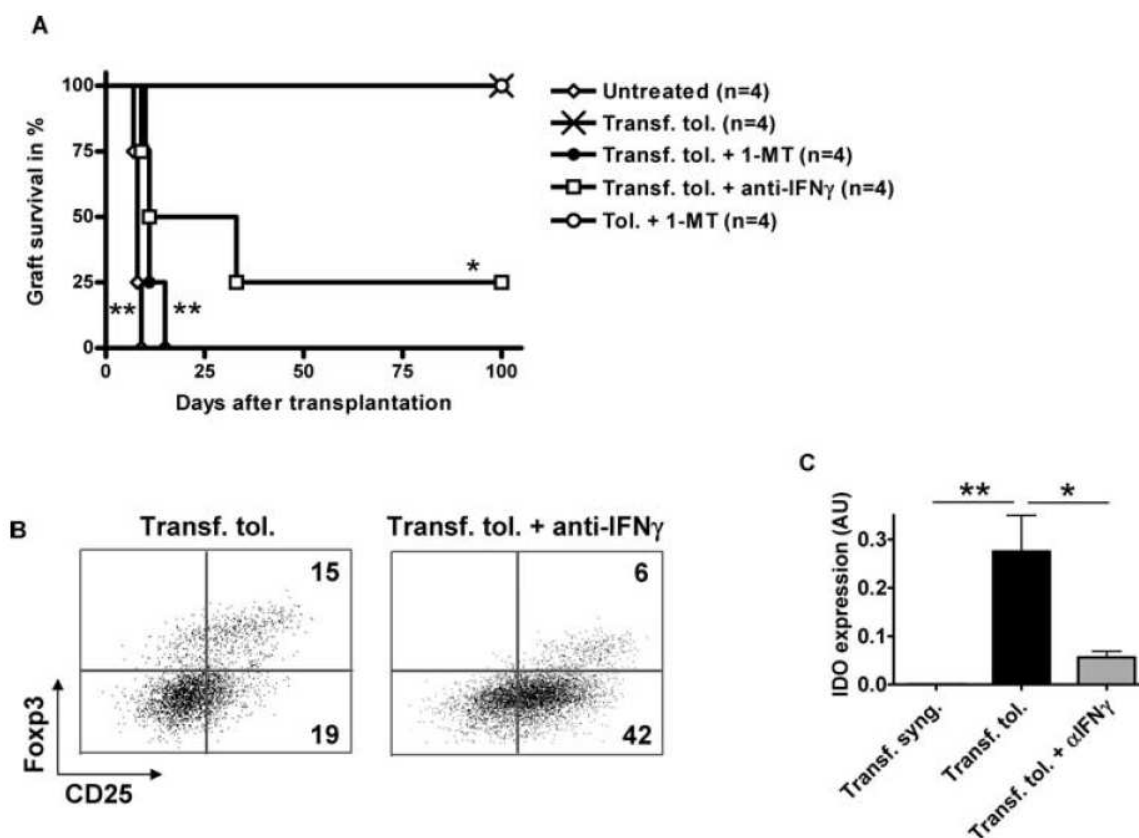


Figure 5: Anti-IFN γ treatment abrogates transfer of tolerance by blocking induction of IDO expression. (A) Long-term LF15-0195-treated recipients or secondary recipients that have been transferred with no cells (untreated) or 20×10^6 spleen CD4⁺T cells from long-term-tolerated allografts were treated as described in the Materials and Methods. A neutralizing mouse anti-rat IFN γ mAb (clone DB1, IgG1) was injected i.p. at day 0 (2.5 mg/kg) every day until rejection. 1-Methyl-DL-Tryptophan neutralizing IDO enzymatic activity (competitive inhibitor) was administered orally at 0.2 mg/kg twice daily. Graft survival was monitored daily by abdominal palpation, and rejection was defined as cessation of heartbeat (n = 4 in each group, **p < 0.01, *p < 0.05). (B) Representative Dot plots of Foxp3 versus CD25 in CD4⁺T cells from allografts of transferred recipients that had received no treatment and that tolerated their allografts (Transf. tol.) (day 35 posttransplantation) or that had rejected the allograft by anti-IFN γ treatment (Transf. tol. + anti-IFN γ) (day 10). Graft-infiltrating cells were purified stained with anti-TCR, anti-CD4 and anti-CD25, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Foxp3 as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on CD4⁺T cells and results are expressed as percentage. (C) IDO transcripts were assessed by quantitative RT/PCR as described in the Materials and Methods in syngeneic grafts from recipients that had received CD4⁺T cells from naïve rats (Transf. syng., n = 5) (day 35 posttransplantation), in allografts from recipients that had received CD4⁺T cells from tolerant recipients (Transf. tol., n = 3) and in allografts from recipients that had received CD4⁺T cells from tolerant recipients that have rejected their allografts following anti-IFN γ treatment (Transf. tol. + anti-IFN γ , n = 3); *p < 0.05, **p < 0.01. Results are expressed in AU of IDO/HPRT \pm SEM.

from tolerant recipients strongly reduced the percentage of recovered Foxp3⁺CD4⁺T cells (Figure 7A, 1.6% vs. 4.1%, n = 3, **p < 0.01). We also observed a reduction, albeit to a lesser degree, in recovered Foxp3⁺CD4⁺T cells with CD4⁺T cells from naïve rats in the presence of anti-IFN γ (Figure 7A, 1.3% vs. 2.9%, n = 3, **p < 0.01). However, anti-IFN γ treatment did not reverse the hypoproliferative state of CD4⁺T cells from tolerant recipients despite the reduction in Foxp3⁺CD4⁺T cells (27% of proliferation vs. 25% with control antibody 3G8 and 41% with CD4⁺T cells from naïve rats) (Figure 7B). These results demonstrate

that IFN γ is detected by intracellular FACS staining only in the Foxp3⁻CD4⁺T-cell subpopulation but seems to play a role in the survival/expansion of regulatory Foxp3⁺CD4⁺T cells.

Discussion

We previously demonstrated, in a fully MHC mismatched rat cardiac allograft combination, that a short-term treatment with a deoxyspergualin analog, induces long-term

Thebault et al.

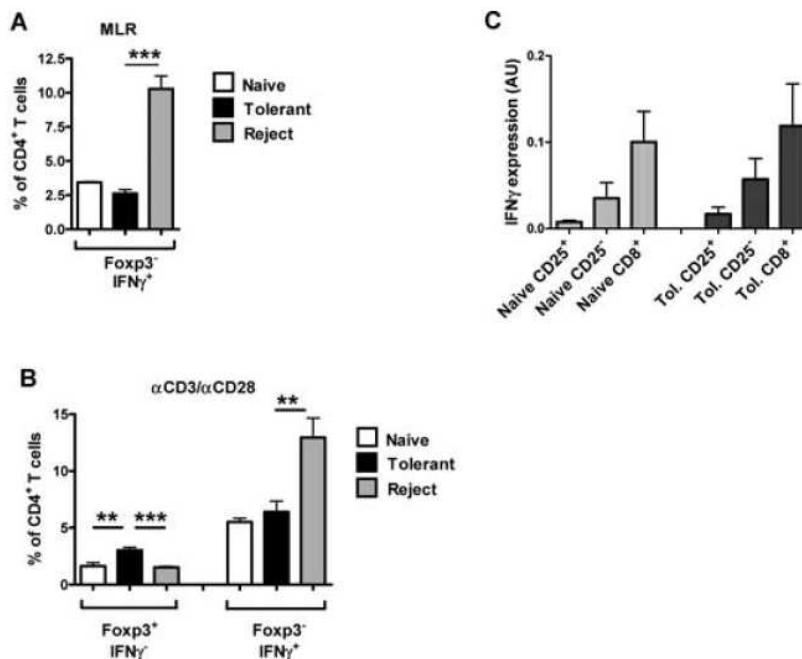


Figure 6: IFN γ is expressed at high levels by nonFcxp3⁺CD4⁺T cells. T cells from naïve rats, from long-term tolerant recipients (day 100) or from recipients that had rejected their allografts (untreated) (A) were cultured with allogeneic (LEW.1W) APC or (B) underwent polyclonal stimulation (plate bound anti-CD3 plus soluble anti-CD28) for 3 days as described in the Materials and Methods. Cells were recovered and stained with anti-TCR and anti-CD4, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Fcxp3 and anti-IFN γ mAb as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on the CD4⁺T cells and results are expressed as percentage of CD4⁺T cells (n = 3). **p < 0.01, ***p < 0.001. (C) IFN γ transcripts were assessed by quantitative RT/PCR as described in the Materials and Methods in highly purified CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺T cells from naïve rats or from long-term tolerant recipients; n = 3 in each group. Results are expressed in AU of IFN γ /HPRT \pm SEM.

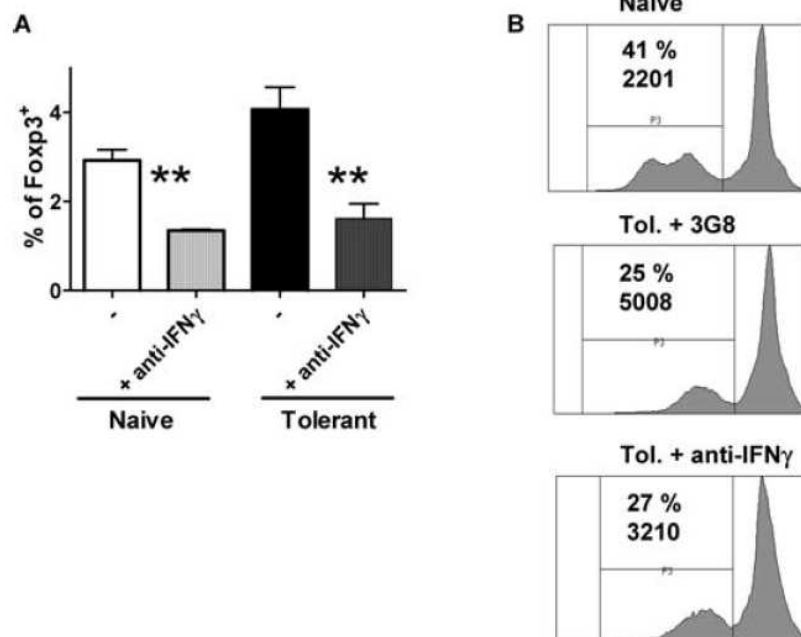
tolerance with a specific expansion of CD4⁺CD25⁺T cells that accumulate in the spleen and graft and are able to transfer tolerance to a secondary recipient (12–14). In this study, we demonstrated that both Fcxp3⁺ and Fcxp3⁻ subpopulations of CD4⁺CD25⁺T cells accumulated in the spleen and the graft of tolerant recipients. The Fcxp3⁻CD4⁺CD25⁺T cells contained IFN γ -secreting cells that could represent other kinds of regulatory T cells or allogeneic-activated T cells. In fact, it has been shown in a model of skin allograft transplantation in mice that regulatory T cells represent only about one-half of the T cells that are present in tolerated allografts and that these nonregulatory T cells are able to reject the grafts when the regulatory CD4⁺T subpopulation is depleted (11,23). It has also been shown, in a model of colitis, that regulatory T cells accumulate in the colonic lamina propria and are in direct contact with dendritic cells, as well as effector T cells (24). Therefore, tolerated grafts could contain effector T cells, being held in check directly or indirectly by CD4⁺ regulatory T cells.

Here, we show that following transfer, CD4⁺T cells from long-term-tolerated recipients induce the accumulation of

Fcxp3⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺T cells in the graft of a secondary recipient and induce EC to express high levels of IDO. These data demonstrate a state of local immune privilege within the graft with an interplay between regulatory T cells and graft EC to regulate T-cell responses and maintain long-term tolerance. Moreover, we show *in vitro* and *in vivo* that the induction of IDO expression in EC by CD4⁺T cells is IFN γ -dependent and that we were able to abrogate the transfer of tolerance by blocking IFN γ or IDO *in vivo*. Therefore, IFN γ plays a key role in the mechanisms of tolerance in this model. IFN γ has been shown to be a potent inducer of IDO in APC (22). IDO has been described as being expressed primarily by monocytes/macrophages and dendritic cells, but also by EC (25–27). A role for IDO in T-cell anergy and apoptosis has been demonstrated in several studies by depleting tryptophan and tryptophan metabolites (25,28–30), and over-expression of IDO in human EC has been shown to prevent T-cell activation (31).

We found that anti-IFN γ led to a reduction of regulatory Fcxp3⁺CD4⁺T cells and to the abrogation of tolerance transfer. These data suggest an important role for IFN γ in the survival/expansion of alloantigen-induced regulatory

Figure 7: IFN γ is important for survival/expansion of alloantigen-induced Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ regulatory T cells. CFSE-labeled T cells from naive rats or from long-term tolerant recipients (day 100) were stimulated by allogeneic (LEW.1W) APC for 5 days in the presence of anti-IFN γ (DB1) or irrelevant Ab (3G8) (5 μ g/mL) as described in the Materials and Methods. Cells were recovered and stained with anti-TCR and anti-CD4, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Foxp3 as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS after gating on CD4 $^+$ T cells. (A) Results are expressed as percentage of Foxp3 $^+$ cells in the CD4 $^+$ T-cell population (n = 3, **p < 0.01). (B) Representative histograms of CFSE profile. Results represent the percentage of proliferation of CD4 $^+$ T cells and the Mean Fluorescence of the proliferating cells. Data are representative of three independent experiments.



Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ T cells and in the induction of IDO by graft EC. IFN γ is usually considered as a pro-inflammatory cytokine, driving Th1-type cell-mediated immune responses (32,33). However, recent data have demonstrated a paradoxical function for IFN γ , depending on the concentration and the microenvironment in which it is expressed. Along these lines, IFN γ treatment has been shown to downregulate experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing NO in local microglia and astrocytes in the target tissue (34). Moreover, a population of autoantigen-specific regulatory CD4 $^+$ T cells, secreting low levels of IFN γ , was shown to directly stimulate APC to produce NO and to inhibit the proliferation of pathogenic T cells and the development of diabetes (35). In the transplantation setting, the generation and function of alloantigen-reactive regulatory T cells in a model of anti-CD4 therapy was impaired dramatically in IFN γ -deficient mice (36). The authors demonstrated that alloantigen-induced regulatory CD4 $^+$ CD25 $^+$ T cells rapidly and transiently express low levels of IFN γ and that induction of tolerance following adoptive transfer is IFN γ -dependent (36). Moreover, in rat, donor alloantigen-specific regulatory CD8 $^+$ T cells have previously been shown to promote local graft immune privilege through IFN γ -dependent IDO expression (37).

We were unable to detect intracellular production of IFN γ protein by spleen-derived or graft-infiltrating Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^+$ T cells from long-term tolerant recipients. It is possible that IFN γ expression is transient and/or too low to enable detection by intracellular staining. Another explanation could be that the source of IFN γ is not the Foxp3 $^+$ subpopulation but the Foxp3 $^-$ subpopulation of CD4 $^+$ CD25 $^+$ T

cells. Indeed, in our model, we demonstrated numerous Foxp3 $^-$ CD4 $^+$ CD25 $^+$ T cells that accumulate within the graft and spleen and that express quantitatively low levels of IFN γ . These cells could be regulatory T cells not expressing Foxp3. Alternatively, a part of these cells could be effector cells expressing low levels of IFN γ that are held in check by regulatory Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^+$ T cells. The IFN γ produced by these cells may be necessary for the survival, expansion and functional properties of the regulatory Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^+$ T cells. Along these lines, it has been shown, in both the human and mouse setting, that *in vitro* IFN γ treatment of CD4 $^+$ CD25 $^+$ T cells leads to their conversion into regulatory CD4 $^+$ T cells, as characterized by increased expression of Foxp3 and enhanced regulatory function (38).

In conclusion, we show here a key role for IFN γ and IDO in the induction of local immune privilege in allograft tolerance with an interplay between regulatory T cells and graft EC. Further studies will help to define the paradoxical role of IFN γ in the immune response and its regulation, with prospects for developing immunotherapies in a clinical setting.

References

1. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2: 816–822.
2. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J et al. Immunologic tolerance maintained by CD25 $^+$ CD4 $^+$ regulatory T cells: Their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18–32.

Thebault et al.

3. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199–210.
4. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531–562.
5. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T Cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057–1061.
6. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330–336.
7. Walker MR, Kasprowitz 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: 1437–1443.
8. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22: 329–341.
9. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C et al. Characterization of Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ and IL-10-secreting CD4⁺ CD25⁺ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006; 177: 5852–5860.
10. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002; 195: 1641–1646.
11. Cobbold SP, Castejon R, Adams E et al. Induction of foxP3⁺ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004; 172: 6003–6010.
12. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. 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* 2002; 2: 745–757.
13. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Role for thymic and splenic regulatory CD4⁺ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15–0195 treatment. *J Immunol* 2002; 168: 5058–5069.
14. Heslan JM, Beriou G, Le Ludeuc JB et al. Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vbeta7-TCR rearrangements in tolerated allografts. *Transplantation* 2005; 80: 1476–1484.
15. Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, Chiffolleau E. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1185–1193.
16. Ono K, Lyndsey ES. Improved technic of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968; 57: 225–229.
17. Souillou J-P, Blandin F, Günther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984; 38: 63–67.
18. Charreau B, Cassard A, Tesson L et al. Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation* 1994; 58: 1222–1229.
19. Louvet C, Heslan JM, Merieau E, Souillou JP, Cuturi MC, Chiffolleau E. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8⁺ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 2004; 78: 1259–1266.
20. Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 1997; 100: 3173–3183.
21. Haspot F, Seveno C, Dugast AS et al. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant* 2005; 5: 2339–2348.
22. Yoshida R, Imanishi J, Oku T, Kishida T, Hayaishi O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 129–132.
23. Cobbold SP, Adams E, Graca L et al. Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2006; 213: 239–255.
24. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: Cure of colitis by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 170: 3939–3943.
25. Terness P, Bauer TM, Rose L et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002; 196: 447–457.
26. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002; 107: 452–460.
27. Adam R, Russing D, Adams O et al. Role of human brain microvascular endothelial cells during central nervous system infection. Significance of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immunoregulation. *Thromb Haemost* 2005; 94: 341–346.
28. Munn DH, Zhou M, Attwood JT et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191–1193.
29. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206–1212.
30. Uytendhove C, Pilote L, Theate I et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9: 1269–1274.
31. Beutelspacher SC, Tan PH, McClure MO, Larkin DF, Lechler RI, George AJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: Implications for the control of alloresponses. *Am J Transplant* 2006; 6: 1320–1330.
32. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749–795.
33. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 713–758.
34. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: A possible role for nitric oxide. *J Immunol* 1999; 163: 5278–5286.
35. Chen C, Lee WH, Zhong L, Liu CP. Regulatory T cells can mediate their function through the stimulation of APCs to produce immunosuppressive nitric oxide. *J Immunol* 2006; 176: 3449–3460.
36. Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, Karim M, Herber M, Wood KJ. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med* 2005; 201: 1925–1935.
37. Guillonnet C, Hill M, Hubert FX et al. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007; 117: 1096–1106.
38. Wang Z, Hong J, Sun W et al. Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4⁺ CD25⁺ T cells to CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* 2006; 116: 2434–2441.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaltonen, J. and P. Bjorses (1999). "Cloning of the APECED gene provides new insight into human autoimmunity." *Ann Med* **31**(2): 111-6.
- Afzali, B., R. I. Lechler and M. P. Hernandez-Fuentes (2007a). "Allorecognition and the alloresponse: clinical implications." *Tissue Antigens* **69**(6): 545-56.
- Afzali, B., G. Lombardi, R. I. Lechler and G. M. Lord (2007b). "The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease." *Clin Exp Immunol* **148**(1): 32-46.
- 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.
- Albert, M. L., M. Jegathesan and R. B. Darnell (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." *Nat Immunol* **2**(11): 1010-7.
- Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- Alexander, S. I., N. Smith, M. Hu, D. Verran, A. Shun, S. Dorney, A. Smith, B. Webster, P. J. Shaw, A. Lammi and M. O. Stormon (2008). "Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased-donor liver transplant." *N Engl J Med* **358**(4): 369-74.
- Aliberti, J., C. Reis e Sousa, M. Schito, S. Hieny, T. Wells, G. B. Huffnagle and A. Sher (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells." *Nat Immunol* **1**(1): 83-7.
- Aliberti, J., J. G. Valenzuela, V. B. Carruthers, S. Hieny, J. Andersen, H. Charest, C. Reis e Sousa, A. Fairlamb, J. M. Ribeiro and A. Sher (2003). "Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells." *Nat Immunol* **4**(5): 485-90.
- Almand, B., J. I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N. R. English, S. C. Knight, D. P. Carbone and D. I. Gabrilovich (2001). "Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer." *J Immunol* **166**(1): 678-89.
- 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.
- 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.
- Anegón, I., C. Guillonéau, M. Hill and C. Chauveau (2004). "Application of gene transfer technologies to transplantation." *Ther Drug Monit* **26**(3): 248-50.
- Angulo, I., F. G. de las Heras, J. F. Garcia-Bustos, D. Gargallo, M. A. Muñoz-Fernandez and M. Fresno (2000). "Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ER-MP12)(+) cells in the spleen of cyclophosphamide-treated mice: implications for T-cell responses in immunosuppressed mice." *Blood* **95**(1): 212-20.
- Antonyamy, M. A., W. C. Fanslow, F. Fu, W. Li, S. Qian, A. B. Trout and A. W. Thomson (1999). "Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors." *J Immunol* **162**(1): 577-84.
- Apostolou, I. and H. von Boehmer (2004). "In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells." *J Exp Med* **199**(10): 1401-8.
- Appay, V., J. J. Zaunders, L. Papagno, J. Sutton, A. Jaramillo, A. Waters, P. Easterbrook, P. Grey, D. Smith, A. J. McMichael, D. A. Cooper, S. L. Rowland-Jones and A. D. Kelleher (2002). "Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo." *J Immunol* **168**(11): 5954-8.
- Aranami, T. and T. Yamamura (2008). "Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS)." *Allergol Int* **57**(2): 115-20.

- 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.
- 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.
- Ashton-Chess, J., M. Giral, S. Brouard and J. P. Souillou (2007). "Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation." Transplantation **84**(10): 1215-9.
- Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman and F. Powrie (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." J Exp Med **190**(7): 995-1004.
- 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.
- Bachmann, M. F., M. Kopf and B. J. Marsland (2006). "Chemokines: more than just road signs." Nat Rev Immunol **6**(2): 159-64.
- Bachmann, M. F., B. R. Wong, R. Josien, R. M. Steinman, A. Oxenius and Y. Choi (1999). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation." J Exp Med **189**(7): 1025-31.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." Nat Rev Immunol **5**(4): 296-306.
- Banerjee, D. K., M. V. Dhodapkar, E. Matayeva, R. M. Steinman and K. M. Dhodapkar (2006). "Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients." Blood **108**(8): 2655-61.
- Bardel, E., F. Larousserie, P. Charlot-Rabiega, A. Coulomb-L'Hermine and O. Devergne (2008). "Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35." J Immunol **181**(10): 6898-905.
- Barker, C. F. and R. E. Billingham (1977). "Immunologically privileged sites." Adv Immunol **25**: 1-54.
- Belghith, M., J. A. Bluestone, S. Barriot, J. Megret, J. F. Bach and L. Chatenoud (2003). "TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes." Nat Med **9**(9): 1202-8.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach and D. L. Sacks (2002). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity." Nature **420**(6915): 502-7.
- 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.
- Benichou, G., P. A. Takizawa, C. A. Olson, M. McMillan and E. E. Sercarz (1992). "Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection." J Exp Med **175**(1): 305-8.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-1.
- Benoist, C. and D. Mathis (1989). "Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur?" Cell **58**(6): 1027-33.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-8.

- Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2008). "Induction and effector functions of T(H)17 cells." *Nature* **453**(7198): 1051-7.
- Bettelli, E., M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity." *Nat Immunol* **8**(4): 345-50.
- Billingham, R. E., L. Brent and P. B. Medawar (1953). "Actively acquired tolerance of foreign cells." *Nature* **172**(4379): 603-6.
- Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt and U. R. Kees (1998). "Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway." *J Immunol* **160**(12): 5729-34.
- Bobe, P., K. Benihoud, D. Grandjon, P. Opolon, L. L. Pritchard and R. Huchet (1999). "Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction." *Blood* **94**(3): 1028-37.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." *Nat Immunol* **2**(10): 907-16.
- Bogman, M. J., I. M. Dooper, J. G. van de Winkel, W. J. Tax, A. J. Hoitsma, K. J. Assmann, D. J. Ruiters and R. A. Koene (1989). "Diagnosis of renal allograft rejection by macrophage immunostaining with a CD14 monoclonal antibody, WT14." *Lancet* **2**(8657): 235-8.
- Boitard, C., R. Yasunami, M. Dardenne and J. F. Bach (1989). "T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice." *J Exp Med* **169**(5): 1669-80.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." *J Exp Med* **196**(12): 1627-38.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmethofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit and E. Schmitt (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." *J Exp Med* **204**(6): 1303-10.
- 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.
- Brady, G., L. Boggan, A. Bowie and L. A. O'Neill (2005). "Schlafen-1 causes a cell cycle arrest by inhibiting induction of cyclin D1." *J Biol Chem* **280**(35): 30723-34.
- Brandle, D., J. Joergensen, G. Zenke, K. Burki and R. P. Hof (1998). "Contribution of donor-specific antibodies to acute allograft rejection: evidence from B cell-deficient mice." *Transplantation* **65**(11): 1489-93.
- 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.
- Bronte, V., E. Apolloni, A. Cabrelle, R. Ronca, P. Serafini, P. Zamboni, N. P. Restifo and P. Zanollo (2000). "Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells." *Blood* **96**(12): 3838-46.
- Bronte, V., D. B. Chappell, E. Apolloni, A. Cabrelle, M. Wang, P. Hwu and N. P. Restifo (1999). "Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation." *J Immunol* **162**(10): 5728-37.
- Bronte, V., P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, V. Tosello, A. Mazzoni, D. M. Segal, C. Staib, M. Lowel, G. Sutter, M. P. Colombo and P. Zanollo (2003). "IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* **170**(1): 270-8.
- Bronte, V., M. Wang, W. W. Overwijk, D. R. Surman, F. Pericle, S. A. Rosenberg and N. P. Restifo (1998). "Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells." *J Immunol* **161**(10): 5313-20.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* **27**(1): 68-73.

Brunner, 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. Souillou (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. Souillou (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.

Campos, L., A. Najj, 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.

Carrier, Y., J. Yuan, V. K. Kuchroo and H. L. Weiner (2007). "Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice." *J Immunol* **178**(1): 179-85.

Cederbom, L., H. Hall and F. Ivars (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." *Eur J Immunol* **30**(6): 1538-43.

Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." *J Exp Med* **184**(2): 747-52.

Chai, J. G., I. Bartok, P. Chandler, S. Vendetti, A. Antoniou, J. Dyson and R. Lechler (1999). "Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo." *Eur J Immunol* **29**(2): 686-92.

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.

Chen, C. H., C. Seguin-Devaux, N. A. Burke, T. B. Oriss, S. C. Watkins, N. Clipstone and A. Ray (2003a). "Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation." *J Exp Med* **197**(12): 1689-99.

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 (1998a). "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., W. Jin, M. Cook, H. L. Weiner and S. M. Wahl (1998b). "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, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003b). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* **198**(12): 1875-86.

Chen, Y., 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. Souillou (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. Souillou and M. C. Cuturi (2002a). "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. Souillou and M. C. Cuturi (2002b). "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.
- 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., Z. Liu, A. I. Colovai, E. Ho, S. Itescu, S. Ravalli, M. A. Hardy, R. Cortesini, E. A. Rose and N. Suci-Foca (1998). "Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts." *J Clin Invest* **101**(2): 398-405.
- Cobbold, S. P., R. Castejon, E. Adams, D. Zelenika, L. Graca, S. Humm and H. Waldmann (2004). "Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants." *J Immunol* **172**(10): 6003-10.
- Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehry, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* **450**(7169): 566-9.
- Colovai, A. I., Z. Liu, R. Ciubotariu, S. Lederman, R. Cortesini and N. Suci-Foca (2000). "Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells." *Transplantation* **69**(7): 1304-10.
- 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., E. Renna-Molajoni, P. Cinti, R. Pretagostini, E. Ho, P. Rossi and N. Suci-Foca Cortesini (2002). "Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells." *Hum Immunol* **63**(11): 1010-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." *Nat Immunol* **9**(12): 1347-55.
- De Caterina, R., P. Libby, H. B. Peng, V. J. Thannickal, T. B. Rajavashisth, M. A. Gimbrone, Jr., W. S. Shin and J. K. Liao (1995). "Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines." *J Clin Invest* **96**(1): 60-8.
- De Wilde, V., N. Van Rompaey, M. Hill, J. F. Lebrun, P. Lemaitre, F. Lhomme, C. Kubjak, B. Vokaer, G. Oldenhove, M. Petein, L. M. Charbonnier, M. C. Cuturi, M. Goldman and A. Le Moine (2008 Submitted). "CD11b+Gr1+ suppressor cells in mice tolerized to endotoxin enhance allograft survival." *Submitted*.

- Dhodapkar, M. V., K. M. Dhodapkar and A. K. Palucka (2008). "Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance." *Cell Death Differ* **15**(1): 39-50.
- Dhodapkar, M. V. and R. M. Steinman (2002). "Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans." *Blood* **100**(1): 174-7.
- 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.
- 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.
- Dugast, A. S., T. Haudebourg, F. Coulon, M. Heslan, F. Haspot, N. Poirier, R. Vuillefroy de Silly, C. Usal, H. Smit, B. Martinet, P. Thebault, K. Renaudin and B. Vanhove (2008). "Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion." *J Immunol* **180**(12): 7898-906.
- Duncan, S. R., N. G. Capetanakis, B. R. Lawson and A. N. Theofilopoulos (2002). "Thymic dendritic cells traffic to thymi of allogeneic recipients and prolong graft survival." *J Clin Invest* **109**(6): 755-64.
- 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.
- Essery, G., M. Feldmann and J. R. Lamb (1988). "Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes." *Immunology* **64**(3): 413-7.
- Fabre, J. W. and P. J. Morris (1972). "The effect of donor strain blood pretreatment on renal allograft rejection in rats." *Transplantation* **14**(5): 608-17.
- Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell and F. Powrie (2005). "T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *J Exp Med* **201**(5): 737-46.
- Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre and P. Puccetti (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1206-12.
- 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.
- 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.
- Fink, P. J. and M. J. Bevan (1978). "H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity." *J Exp Med* **148**(3): 766-75.
- Fischer, T. A., A. Palmethofer, S. Gambaryan, E. Butt, C. Jassoy, U. Walter, S. Sopper and S. M. Lohmann (2001). "Activation of cGMP-dependent protein kinase Ibeta inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells." *J Biol Chem* **276**(8): 5967-74.
- Foletta, V. C., D. H. Segal and D. R. Cohen (1998). "Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1." *J Leukoc Biol* **63**(2): 139-52.
- 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.
- Frauwirth, K. A. and C. B. Thompson (2002). "Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation." *J Clin Invest* **109**(3): 295-9.

- 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.
- Fukaura, H., S. C. Kent, M. J. Pietrusewicz, S. J. Khoury, H. L. Weiner and D. A. Hafler (1996). "Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients." *J Clin Invest* **98**(1): 70-7.
- Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze and J. J. Lafaille (2002). "Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function." *J Exp Med* **196**(6): 851-7.
- Gabrilovich, D. I., V. Bronte, S. H. Chen, M. P. Colombo, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg and H. Schreiber (2007). "The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells." *Cancer Res* **67**(1): 425; author reply 426.
- Galili, U. (1993). "Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans." *Immunol Today* **14**(10): 480-2.
- Gallina, G., L. Dolcetti, P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, M. P. Colombo, G. Basso, F. Brombacher, I. Borrello, P. Zanovello, S. Biciato and V. Bronte (2006). "Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells." *J Clin Invest* **116**(10): 2777-90.
- Garin, M. I., C. C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait and R. I. Lechler (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." *Blood* **109**(5): 2058-65.
- Gassel, A. M., M. L. Hansmann, H. J. Radzun and M. Weyand (1990). "Human cardiac allograft rejection. Correlation of grading with expression of different monocyte/macrophage markers." *Am J Clin Pathol* **94**(3): 274-9.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." *Immunology* **18**(5): 723-37.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1971). "Infectious immunological tolerance." *Immunology* **21**(6): 903-14.
- 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.
- 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.
- Gokmen, M. R., G. Lombardi and R. I. Lechler (2008). "The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation." *Curr Opin Immunol* **20**(5): 568-74.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." *J Immunol* **174**(4): 1783-6.
- Goni, O., P. Alcaide and M. Fresno (2002). "Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells." *Int Immunol* **14**(10): 1125-34.
- 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.
- Gotter, J., B. Brors, M. Hergenroth and B. Kyewski (2004). "Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters." *J Exp Med* **199**(2): 155-66.
- Green, D. R., N. Droin and M. Pinkoski (2003a). "Activation-induced cell death in T cells." *Immunol Rev* **193**: 70-81.
- Green, D. R. and D. R. Webb (1993). "Saying the 'S' word in public." *Immunol Today* **14**(11): 523-5.

- Green, E. A., L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran and R. A. Flavell (2003b). "CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10878-83.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004a). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." Immunity **21**(4): 589-601.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004b). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." Blood **104**(9): 2840-8.
- 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.
- Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-67.
- Guillonneau, C., M. Hill, F. X. Hubert, E. Chiffolleau, C. Herve, X. L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Menoret, A. Saoudi, B. Le Mauff, R. Josien, M. C. Cuturi and I. Anegon (2007). "CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase." J Clin Invest **117**(4): 1096-106.
- Halasz, N. A., M. J. Orloff and F. Hirose (1964). "Increased Survival of Renal Homografts in Dogs after Injection of Graft Donor Blood." Transplantation **2**: 453-8.
- 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.
- 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.
- Hancock, W. W., R. DiStefano, P. Braun, R. T. Schweizer, N. L. Tilney and J. W. Kupiec-Weglinski (1990). "Cyclosporine and anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody therapy suppress accelerated rejection of rat cardiac allografts through different effector mechanisms." Transplantation **49**(2): 416-21.
- Handel, A., A. Yates, S. S. Pilyugin and R. Antia (2007). "Gap junction-mediated antigen transport in immune responses." Trends Immunol **28**(11): 463-6.
- Hawiger, D., R. F. Masilamani, E. Bettelli, V. K. Kuchroo and M. C. Nussenzweig (2004). "Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo." Immunity **20**(6): 695-705.
- 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.
- Heidecke, C. D., J. L. Araujo, J. W. Kupiec-Weglinski, M. Abbud-Filho, D. Araneda, J. Stadler, J. Siewert, T. B. Strom and N. L. Tilney (1985). "Lack of evidence for an active role for natural killer cells in acute rejection of organ allografts." Transplantation **40**(4): 441-4.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, R. Tibbott, F. Salcido Ochoa, M. J. James, F. M. Marelli-Berg and R. I. Lechler (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." J Immunol **173**(8): 4828-37.
- Heslan, J. M., G. Beriou, J. B. Le Luduec, C. Guillonneau, 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.
- Heslan, J. M., K. Renaudin, P. Thebault, R. Josien, M. C. Cuturi and E. Chiffolleau (2006). "New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance." Transplantation **82**(9): 1185-93.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003a). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.

Hori, S., T. Takahashi and S. Sakaguchi (2003b). "Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells." Adv Immunol **81**: 331-71.

Huang, B., P. Y. Pan, Q. Li, A. I. Sato, D. E. Levy, J. Bromberg, C. M. Divino and S. H. Chen (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." Cancer Res **66**(2): 1123-31.

Huang, C. A., Y. Fuchimoto, 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.

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. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-6.

Janeway, C. A., Jr. and K. Bottomly (1994). "Signals and signs for lymphocyte responses." Cell **76**(2): 275-85.

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.

Jiang, S., S. Tugulea, G. Pennesi, Z. Liu, A. Mulder, S. Lederman, P. Harris, R. Cortesini and N. Suci-Foca (1998). "Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro." Hum Immunol **59**(11): 690-9.

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.

Jondal, M., R. Schirmbeck and J. Reimann (1996). "MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens." Immunity **5**(4): 295-302.

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.

Josien, R., M. C. Cuturi, P. Douillard, M. Heslan, J. M. Heslan and J. P. Souillou (1999). "Recombinant IFN-gamma abrogates allograft tolerance induced by donor-specific blood transfusion by restoring alloantibody production." Eur J Immunol **29**(1): 317-26.

Josien, R., P. Douillard, C. Guillot, M. Muschen, I. Anegon, J. Chetritt, S. Menoret, C. Vignes, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1998a). "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 (1998b). "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.

Kabelitz, D., T. Pohl and K. Pechhold (1993). "Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes." Immunol Today **14**(7): 338-9.

Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." Nature **369**(6475): 31-7.

Kamradt, T. and N. A. Mitchison (2001). "Tolerance and autoimmunity." N Engl J Med **344**(9): 655-64.

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.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, T. R. Spitzer, N. Toloff-Rubin, M. Suthanthiran, S. L. Saidman, J. Shaffer, F. I. Preffer, R. Ding, V. Sharma, J. A. Fishman, B. Dey, D. S. Ko, M. Hertl, N. B. Goes, W. Wong, W. W. Williams, Jr., R. B. Colvin, M. Sykes and D. H. Sachs (2008). "HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression." *N Engl J Med* **358**(4): 353-61.
- 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.
- Kingsley, C. I., M. Karim, A. R. Bushell and K. J. Wood (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." *J Immunol* **168**(3): 1080-6.
- Kitchens, W. H., S. Uehara, C. M. Chase, R. B. Colvin, P. S. Russell and J. C. Madsen (2006). "The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance." *Transplantation* **81**(6): 811-7.
- Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani and G. Schuler (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." *J Exp Med* **184**(2): 741-6.
- Kondo, T., K. Morita, Y. Watarai, M. B. Auerbach, D. D. Taub, A. C. Novick, H. Toma and R. L. Fairchild (2000). "Early increased chemokine expression and production in murine allogeneic skin grafts is mediated by natural killer cells." *Transplantation* **69**(5): 969-77.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." *Nature* **448**(7152): 484-7.
- 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 (2002a). "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 (2002b). "Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition." *Nat Med* **8**(3): 233-9.
- Krensky, A. M., A. Weiss, G. Crabtree, M. M. Davis and P. Parham (1990). "T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection." *N Engl J Med* **322**(8): 510-7.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig and H. von Boehmer (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." *Nat Immunol* **6**(12): 1219-27.
- Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen and W. Zou (2006). "Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells." *J Immunol* **177**(1): 40-4.
- 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.
- Kusmartsev, S. and D. I. Gabrilovich (2003). "Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species." *J Leukoc Biol* **74**(2): 186-96.
- 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.
- Lafferty, K. J., L. Andrus and S. J. Prowse (1980). "Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses." *Immunol Rev* **51**: 279-314.
- 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.

- Lakkis, F. G., A. Arakelov, B. T. Konieczny and Y. Inoue (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." *Nat Med* **6**(6): 686-8.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2001). "The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics." *Curr Opin Immunol* **13**(3): 291-8.
- Larsen, C. P., P. J. Morris and J. M. Austyn (1990). "Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection." *J Exp Med* **171**(1): 307-14.
- 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 Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman and W. E. Paul (1990). "Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells." *J Exp Med* **172**(3): 921-9.
- Le Moine, A., M. Goldman and D. Abramowicz (2002). "Multiple pathways to allograft rejection." *Transplantation* **73**(9): 1373-81.
- Lechler, R., J. G. Chai, F. Marelli-Berg and G. Lombardi (2001a). "The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance." *Immunology* **103**(3): 262-9.
- Lechler, R., W. F. Ng and R. M. Steinman (2001b). "Dendritic cells in transplantation--friend or foe?" *Immunity* **14**(4): 357-68.
- 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., G. Lombardi, J. R. Batchelor, N. Reinsmoen and F. H. Bach (1990). "The molecular basis of alloreactivity." *Immunol Today* **11**(3): 83-8.
- 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, R. S., M. J. Grusby, L. H. Glimcher, H. J. Winn and H. Auchincloss, Jr. (1994). "Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo." *J Exp Med* **179**(3): 865-72.
- Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini and M. G. Roncarolo (2005). "Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells." *Blood* **105**(3): 1162-9.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, F. Galbiati, S. Squadrone, R. de Waal Malefyt and M. G. Roncarolo (2001). "IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells." *J Immunol* **166**(9): 5530-9.
- Levisetti, M. G., P. A. Padrid, G. L. Szot, N. Mittal, S. M. Meehan, C. L. Wardrip, G. S. Gray, D. S. Bruce, J. R. Thistlethwaite, Jr. and J. A. Bluestone (1997). "Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation." *J Immunol* **159**(11): 5187-91.
- Li, M. O. and R. A. Flavell (2008). "TGF-beta: a master of all T cell trades." *Cell* **134**(3): 392-404.
- Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." *J Immunol* **180**(9): 5916-26.
- Libby, P. and J. S. Pober (2001). "Chronic rejection." *Immunity* **14**(4): 387-97.
- Lindahl, K. F. and D. B. Wilson (1977). "Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors." *J Exp Med* **145**(3): 508-22.
- Linsley, P. S. and J. A. Ledbetter (1993). "The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen." *Annu Rev Immunol* **11**: 191-212.
- Lipman, M. L., A. C. Stevens and T. B. Strom (1994). "Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts." *J Immunol* **152**(10): 5120-7.

- 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, C., S. Yu, J. Kappes, J. Wang, W. E. Grizzle, K. R. Zinn and H. G. Zhang (2007). "Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host." *Blood* **109**(10): 4336-42.
- Liu, H., B. Hu, D. Xu and F. Y. Liew (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4." *J Immunol* **171**(10): 5012-7.
- 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. Fazekas 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, 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.
- 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.
- Loong, C. C., H. G. Hsieh, W. Y. Lui, A. Chen and C. Y. Lin (2002). "Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection." *J Pathol* **197**(3): 322-32.
- Lordon, R. E., G. T. Stelzer and S. Ferrone (1984). "The early posttransplant prognosis of acute renal allograft rejection as determined by detection of cytotoxic antibodies to lymphoid B cell lines." *Transplantation* **38**(5): 493-7.
- Louvet, C., E. Chiffolleau, M. Heslan, L. Tesson, J. M. Heslan, R. Brion, G. Berioux, 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. Soullou, 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.
- Lucas, C., L. N. Bald, B. M. Fendly, M. Mora-Worms, I. S. Figari, E. J. Patzer and M. A. Palladino (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.
- Lumsden, J. M., J. A. Williams and R. J. Hodes (2003). "Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in vivo." *J Immunol* **170**(2): 781-7.
- Lund, S., K. V. Christensen, M. Hedtjarn, A. L. Mortensen, H. Hagberg, J. Falsig, H. Hasseldam, A. Schratzenholz, P. Porzgen and M. Leist (2006). "The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions." *J Neuroimmunol* **180**(1-2): 71-87.
- Lundqvist, A., A. Palmberg, M. Pavlenko, J. Levitskaya and P. Pisa (2005). "Mature dendritic cells induce tumor-specific type 1 regulatory T cells." *J Immunother* **28**(3): 229-35.
- Lurton, J., T. M. Rose, G. Raghu and A. S. Narayanan (1999). "Isolation of a gene product expressed by a subpopulation of human lung fibroblasts by differential display." *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**(2): 327-31.
- Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani and G. Schuler (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." *J Immunol Methods* **223**(1): 77-92.
- 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.
- MacPherson, G. G. and S. E. Christmas (1984). "The role of the macrophage in cardiac allograft rejection in the rat." *Immunol Rev* **77**: 143-66.

- Maeda, Y., L. Fujimura, O. W. J. M. Hatano, A. Sakamoto, M. Arima, M. Ebara, H. Ino, T. Yamashita, H. Saisho and T. Tokuhiya (2006). "Role of Clast1 in development of cerebellar granule cells." *Brain Res* **1104**(1): 18-26.
- Maier, S., C. Tertilt, N. Chambron, K. Gerauer, N. Huser, C. D. Heidecke and K. Pfeffer (2001). "Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice." *Nat Med* **7**(5): 557-62.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. Weaver (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." *Nature* **441**(7090): 231-4.
- Manilay, J. O. and M. Sykes (1998). "Natural killer cells and their role in graft rejection." *Curr Opin Immunol* **10**(5): 532-8.
- Marigo, I., L. Dolcetti, P. Serafini, P. Zanovello and V. Bronte (2008). "Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells." *Immunol Rev* **222**: 162-79.
- 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.
- Markus, P. M., M. van den Brink, X. Cai, J. Harnaha, L. Palomba, J. C. Hiserodt and D. V. Cramer (1991). "Effect of selective depletion of natural killer cells on allograft rejection." *Transplant Proc* **23**(1 Pt 1): 178-9.
- Marrack, P. and J. Kappler (2004). "Control of T cell viability." *Annu Rev Immunol* **22**: 765-87.
- Marsland, B. J., P. Battig, M. Bauer, C. Ruedl, U. Lassing, R. R. Beerli, K. Dietmeier, L. Ivanova, T. Pfister, L. Vogt, H. Nakano, C. Nembrini, P. Saudan, M. Kopf and M. F. Bachmann (2005). "CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells." *Immunity* **22**(4): 493-505.
- 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.
- Matzinger, P. and M. J. Bevan (1977). "Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?" *Cell Immunol* **29**(1): 1-5.
- 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.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." *Nat Rev Immunol* **1**(2): 135-45.
- Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* **106**(3): 255-8.
- Mellor, A. L., B. Baban, P. Chandler, B. Marshall, K. Jhaver, A. Hansen, P. A. Koni, M. Iwashima and D. H. Munn (2003). "Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion." *J Immunol* **171**(4): 1652-5.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." *Nat Rev Immunol* **4**(10): 762-74.
- Mencacci, A., C. Montagnoli, A. Bacci, E. Cenci, L. Pitzurra, A. Spreca, M. Kopf, A. H. Sharpe and L. Romani (2002). "CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis." *J Immunol* **169**(6): 3180-90.
- Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler and M. B. Lutz (2002). "Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity." *J Exp Med* **195**(1): 15-21.
- 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.
- Mirshahidi, S., C. T. Huang and S. Sadegh-Nasseri (2001). "Anergy in peripheral memory CD4(+) T cells induced by low avidity engagement of T cell receptor." *J Exp Med* **194**(6): 719-31.

- Miyamae, T., A. D. Marinov, D. Sowders, D. C. Wilson, J. Devlin, R. Boudreau, P. Robbins and R. Hirsch (2006). "Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule." *J Immunol* **177**(7): 4758-62.
- 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.
- Morelli, A. E. and A. W. Thomson (2007). "Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance." *Nat Rev Immunol* **7**(8): 610-21.
- 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.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* **7**: 145-73.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, J. R. Lee, K. G. Jhaver, T. S. Johnson, D. B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S. J. Antonia, R. Burgess, C. L. Slingluff, Jr. and A. L. Mellor (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." *Science* **297**(5588): 1867-70.
- Munn, D. H., M. Zhou, J. T. Attwood, I. Bondarev, S. J. Conway, B. Marshall, C. Brown and A. L. Mellor (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." *Science* **281**(5380): 1191-3.
- Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 933-44.
- 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.
- Nagaraj, S., K. Gupta, V. Pisarev, L. Kinarsky, S. Sherman, L. Kang, D. L. Herber, J. Schneck and D. I. Gabrilovich (2007). "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer." *Nat Med* **13**(7): 828-35.
- Nakajima, H., M. Takenaka, J. Y. Kaimori, Y. Nagasawa, A. Kosugi, S. Kawamoto, E. Imai, M. Hori and K. Okubo (2002). "Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria." *Kidney Int* **61**(5): 1577-87.
- Nakamura, K., A. Kitani and W. Strober (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." *J Exp Med* **194**(5): 629-44.
- Neijssen, J., C. Herberts, J. W. Drijfhout, E. Reits, L. Janssen and J. Neefjes (2005). "Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions." *Nature* **434**(7029): 83-8.
- Neumann, B., L. Zhao, K. Murphy and T. J. Gonda (2008). "Subcellular localization of the Schlafen protein family." *Biochem Biophys Res Commun* **370**(1): 62-6.
- Nicholas, R. J. and R. J. Scothorne (1969). "Studies on the testis as an 'immunologically privileged' site." *J Anat* **104**(Pt 1): 194.
- Niedbala, W., X. Q. Wei, B. Cai, A. J. Hueber, B. P. Leung, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2007). "IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells." *Eur J Immunol* **37**(11): 3021-9.
- Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten and C. Dong (2007). "Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." *Nature* **448**(7152): 480-3.
- O'Neill, D. W., S. Adams and N. Bhardwaj (2004). "Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer." *Blood* **104**(8): 2235-46.

- Ochando, J. C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S. A. Lira, G. J. Randolph and J. S. Bromberg (2006). "Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts." *Nat Immunol* **7**(6): 652-62.
- Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio and F. Ivars (2006). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression." *Immunology* **118**(2): 240-9.
- Oertel, M., K. Kohlhaw, H. M. Diepolder, S. Schroder, R. Schwarz, A. Tannapfel, J. Mossner, J. Hauss and F. Berr (2001). "Alloreactivity of natural killer cells in allogeneic liver transplantation." *Transplantation* **72**(1): 116-22.
- 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.
- Olthoff, K. M., T. A. Judge, A. E. Gelman, X. da Shen, W. W. Hancock, L. A. Turka and A. Shaked (1998). "Adenovirus-mediated gene transfer into cold-preserved liver allografts: survival pattern and unresponsiveness following transduction with CTLA4lg." *Nat Med* **4**(2): 194-200.
- Ono, K. and E. S. Lindsey (1969). "Improved technique of heart transplantation in rats." *J Thorac Cardiovasc Surg* **57**(2): 225-9.
- Oshima, Y., N. Ouchi, K. Sato, Y. Izumiya, D. R. Pimentel and K. Walsh (2008). "Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart." *Circulation* **117**(24): 3099-108.
- Ouabed, A., F. X. Hubert, D. Chabannes, L. Gautreau, M. Heslan and R. Josien (2008). "Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells." *J Immunol* **180**(9): 5862-70.
- Ouchi, N., Y. Oshima, K. Ohashi, A. Higuchi, C. Ikegami, Y. Izumiya and K. Walsh (2008). "Follistatin-like 1, a Secreted Muscle Protein, Promotes Endothelial Cell Function and Revascularization in Ischemic Tissue through a Nitric-oxide Synthase-dependent Mechanism." *J Biol Chem* **283**(47): 32802-11.
- Ozdemir, B. H., B. Demirhan and Y. Gungen (2002). "The presence and prognostic importance of glomerular macrophage infiltration in renal allografts." *Nephron* **90**(4): 442-6.
- Palucka, A. K., H. Ueno, J. W. Fay and J. Banchereau (2007). "Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells." *Immunol Rev* **220**: 129-50.
- Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." *Nat Immunol* **8**(12): 1353-62.
- Parker, D. C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." *Annu Rev Immunol* **11**: 331-60.
- 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.
- Paul, W. E. and R. A. Seder (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." *Cell* **76**(2): 241-51.
- Paust, S., L. Lu, N. McCarty and H. Cantor (2004). "Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(28): 10398-403.
- Pekarek, L. A., B. A. Starr, A. Y. Toledano and H. Schreiber (1995). "Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes." *J Exp Med* **181**(1): 435-40.
- Pelaez, B., J. A. Campillo, J. A. Lopez-Asenjo and J. L. Subiza (2001). "Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism." *J Immunol* **166**(11): 6608-15.
- Penhale, W. J., W. J. Irvine, J. R. Inglis and A. Farmer (1976). "Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells." *Clin Exp Immunol* **25**(1): 6-16.
- Petersson, E., O. Ostraat, H. Ekberg, J. Hansson, M. Simanaitis, T. Brodin, M. Dohlsten and G. Hedlund (1997). "Allogeneic heart transplantation activates alloreactive NK cells." *Cell Immunol* **175**(1): 25-32.

- 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.
- Pietra, B. A., A. Wiseman, A. Bolwerk, M. Rizeq and R. G. Gill (2000). "CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II." *J Clin Invest* **106**(8): 1003-10.
- Pirenne, J., H. Kitade, M. Kawai, T. Koshiba, B. Van Damme, C. Mathieu and M. Waer (2005). "Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion." *Transplantation* **79**(3 Suppl): S25-7.
- Popov, I. A., E. V. Fedoseyeva, P. L. Orr, M. R. Garovoy and G. Benichou (1995). "Direct evidence for in vivo induction of CD8+ cytotoxic T cells directed to donor MHC class I peptides following mouse allotransplantation." *Transplantation* **60**(12): 1621-4.
- Powrie, F., J. Carlino, M. W. Leach, S. Mauze and R. L. Coffman (1996). "A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells." *J Exp Med* **183**(6): 2669-74.
- Pratt, J. R., S. A. Basheer and S. H. Sacks (2002). "Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection." *Nat Med* **8**(6): 582-7.
- Probst, H. C., J. Lagnel, G. Kollias and M. van den Broek (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance." *Immunity* **18**(5): 713-20.
- Randolph, G. J., J. Ochando and S. Partida-Sanchez (2008). "Migration of dendritic cell subsets and their precursors." *Annu Rev Immunol* **26**: 293-316.
- 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.
- Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." *Nat Rev Immunol* **6**(6): 476-83.
- Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong and Y. Wang (2007). "Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *Cell Death Differ* **14**(12): 2076-84.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa and P. Matzinger (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* **393**(6684): 474-8.
- Rifkin, I. R., E. A. Leadbetter, L. Busconi, G. Viglianti and A. Marshak-Rothstein (2005). "Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease." *Immunol Rev* **204**: 27-42.
- Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno and A. C. Ochoa (2007). "L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression." *Blood* **109**(4): 1568-73.
- Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, J. Zabaleta, B. Ortiz, A. H. Zea, M. B. Piazuelo, A. Delgado, P. Correa, J. Brayer, E. M. Sotomayor, S. Antonia, J. B. Ochoa and A. C. Ochoa (2004). "Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses." *Cancer Res* **64**(16): 5839-49.
- Rodriguez, P. C., A. H. Zea, J. DeSalvo, K. S. Culotta, J. Zabaleta, D. G. Quiceno, J. B. Ochoa and A. C. Ochoa (2003). "L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes." *J Immunol* **171**(3): 1232-9.
- Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula and M. K. Levings (2001). "Type 1 T regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 68-79.
- Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller and A. Y. Rudensky (2008). "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces." *Immunity* **28**(4): 546-58.
- 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, 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.
- Sakaguchi, S., T. Takahashi and Y. Nishizuka (1982). "Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis." *J Exp Med* **156**(6): 1577-86.
- 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.
- Salcido-Ochoa, F. and R. I. Lechler (2002). "Dendritic cells prohibited by anergic T cells acquire tolerogenic properties." *Transplant Proc* **34**(7): 2851-4.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Samy, E. T., L. A. Parker, C. P. Sharp and K. S. Tung (2005). "Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4+CD25+ regulatory T cells in the regional lymph node." *J Exp Med* **202**(6): 771-81.
- Sandrin, M. S. and I. F. McKenzie (1994). "Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies." *Immunol Rev* **141**: 169-90.
- Sayegh, M. H. and R. B. Colvin (2003). "Case record of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 8-2003. A 35-year-old man with early dysfunction of a second renal transplant." *N Engl J Med* **348**(11): 1033-44.
- Sayegh, M. H. and A. M. Krensky (1996). "Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides." *Kidney Int Suppl* **53**: S13-20.
- Scandling, J. D., S. Busque, S. Dejbakhsh-Jones, C. Benike, M. T. Millan, J. A. Shizuru, R. T. Hoppe, R. Lowsky, E. G. Engleman and S. Strober (2008). "Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation." *N Engl J Med* **358**(4): 362-8.
- 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.
- 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.
- Selvaggi, G., C. Ricordi, E. R. Podack and L. Inverardi (1996). "The role of the perforin and Fas pathways of cytotoxicity in skin graft rejection." *Transplantation* **62**(12): 1912-5.
- Serafini, P., I. Borrello and V. Bronte (2006). "Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression." *Semin Cancer Biol* **16**(1): 53-65.
- Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer and P. Santamaria (2003). "CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." *Immunity* **19**(6): 877-89.
- Seung, L. P., D. A. Rowley, P. Dubey and H. Schreiber (1995). "Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6254-8.
- Shevach, E. M. (2006). "From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells." *Immunity* **25**(2): 195-201.

- 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., 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.
- Sica, A. and V. Bronte (2007). "Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development." J Clin Invest **117**(5): 1155-66.
- Siebenlist, U., K. Brown and E. Claudio (2005). "Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB." Nat Rev Immunol **5**(6): 435-45.
- Sinha, P., V. K. Clements, S. K. Bunt, S. M. Albelda and S. Ostrand-Rosenberg (2007). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." J Immunol **179**(2): 977-83.
- 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.
- Sohn, W. J., D. Kim, K. W. Lee, M. S. Kim, S. Kwon, Y. Lee, D. S. Kim and H. J. Kwon (2007). "Novel transcriptional regulation of the schlafen-2 gene in macrophages in response to TLR-triggered stimulation." Mol Immunol **44**(13): 3273-82.
- 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.
- Steele, D. J., T. M. Laufer, S. T. Smiley, Y. Ando, M. J. Grusby, L. H. Glimcher and H. Auchincloss, Jr. (1996). "Two levels of help for B cell alloantibody production." J Exp Med **183**(2): 699-703.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**: 271-96.
- Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 351-8.
- Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman and K. Inaba (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." J Exp Med **191**(3): 411-6.
- Steller, H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." Science **267**(5203): 1445-9.
- 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. 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.
- Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English and G. Huston (1990). "IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors." J Immunol **145**(11): 3796-806.

- Tadokoro, C. E., G. Shakhara, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille and M. L. Dustin (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **203**(3): 505-11.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu and S. Sakaguchi (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." *Int Immunol* **10**(12): 1969-80.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak and S. Sakaguchi (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.
- 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., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel and J. A. Bluestone (2006). "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice." *Nat Immunol* **7**(1): 83-92.
- Terabe, M., S. Matsui, J. M. Park, M. Mamura, N. Noben-Trauth, D. D. Donaldson, W. Chen, S. M. Wahl, S. Ledbetter, B. Pratt, J. J. Letterio, W. E. Paul and J. A. Berzofsky (2003). "Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence." *J Exp Med* **198**(11): 1741-52.
- Thebault, P., T. Condamine, M. Heslan, M. Hill, I. Bernard, A. Saoudi, R. Josien, I. Anegon, M. C. Cuturi and E. Chiffolleau (2007). "Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells." *Am J Transplant* **7**(11): 2472-82.
- Thery, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz and S. Amigorena (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." *Nat Immunol* **3**(12): 1156-62.
- 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, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." *J Immunol* **164**(1): 183-90.
- 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.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.
- Trifilo, M. J. and T. E. Lane (2004). "The CC chemokine ligand 3 regulates CD11c+CD11b+CD8alpha- dendritic cell maturation and activation following viral infection of the central nervous system: implications for a role in T cell activation." Virology **327**(1): 8-15.
- 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.
- Turka, L. A., P. S. Linsley, H. Lin, W. Brady, J. M. Leiden, R. Q. Wei, M. L. Gibson, X. G. Zheng, S. Myrdal, D. Gordon and et al. (1992). "T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 11102-5.
- Umemura, N., M. Saio, T. Suwa, Y. Kitoh, J. Bai, K. Nonaka, G. F. Ouyang, M. Okada, M. Balazs, R. Adany, T. Shibata and T. Takami (2008). "Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics." J Leukoc Biol **83**(5): 1136-44.
- Vadivel, N., S. G. Tullius and A. Chandraker (2007). "Chronic allograft nephropathy." Semin Nephrol **27**(4): 414-29.
- 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 Berg, P. J., E. M. van Leeuwen, I. J. ten Berge and R. van Lier (2008). "Cytotoxic human CD4(+) T cells." Curr Opin Immunol **20**(3): 339-43.
- van Es, A. A., R. L. Marquet, J. J. van Rood, M. W. Kalff and H. Balner (1977). "Blood-transfusions induce prolonged kidney allograft survival in rhesus monkeys." Lancet **1**(8010): 506-9.
- Van Kaer, L. (2004). "Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells." Immunol Res **30**(2): 139-53.
- Vanaudenaerde, B. M., L. J. Dupont, W. A. Wuyts, E. K. Verbeken, I. Meyts, D. M. Bullens, E. Dilissen, L. Luyts, D. E. Van Raemdonck and G. M. Verleden (2006). "The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation." Eur Respir J **27**(4): 779-87.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-89.
- Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm and B. Stockinger (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." Nat Immunol **9**(12): 1341-6.
- Vendetti, S., J. G. Chai, J. Dyson, E. Simpson, G. Lombardi and R. Lechler (2000). "Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells." J Immunol **165**(3): 1175-81.
- 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.
- Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol **8**(7): 523-32.
- 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.
- Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breitmayer, 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.
- 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, Y., K. J. Han, X. W. Pang, H. A. Vaughan, W. Qu, X. Y. Dong, J. R. Peng, H. T. Zhao, J. A. Rui, X. S. Leng, J. Cebon, A. W. Burgess and W. F. Chen (2002). "Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies." *J Immunol* **169**(2): 1102-9.
- Watanabe, T., M. Yoshida, Y. Shirai, M. Yamori, H. Yagita, T. Itoh, T. Chiba, T. Kita and Y. Wakatsuki (2002). "Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4+ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver." *J Immunol* **168**(5): 2188-99.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli and K. M. Murphy (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* **24**(6): 677-88.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 207-14.
- Weiss, S. and B. Bogen (1991). "MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen." *Cell* **64**(4): 767-76.
- 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.
- 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.
- Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Prohl, M. Appleby and M. E. Brunkow (2001). "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy." *Nat Genet* **27**(1): 18-20.
- Wong, B. R., R. Josien and Y. Choi (1999). "TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function." *J Leukoc Biol* **65**(6): 715-24.
- Wood, K. J. and S. Sakaguchi (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." *Nat Rev Immunol* **3**(3): 199-210.
- Wyburn, K. R., M. D. Jose, H. Wu, R. C. Atkins and S. J. Chadban (2005). "The role of macrophages in allograft rejection." *Transplantation* **80**(12): 1641-7.
- Xia, Y. and J. L. Zweier (1997). "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6954-8.
- Xystrakis, E., A. S. Dejean, I. Bernard, P. Druet, R. Liblau, D. Gonzalez-Dunia and A. Saoudi (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." *Blood* **104**(10): 3294-301.
- 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.
- Yamagiwa, S., J. D. Gray, S. Hashimoto and D. A. Horwitz (2001). "A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood." *J Immunol* **166**(12): 7282-9.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba and R. M. Steinman (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." *J Exp Med* **198**(2): 235-47.

- 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.
- Yang, R., Z. Cai, Y. Zhang, W. H. t. Yutzy, K. F. Roby and R. B. Roden (2006). "CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells." Cancer Res **66**(13): 6807-15.
- Zaiss, A. K. and D. A. Muruve (2005). "Immune responses to adeno-associated virus vectors." Curr Gene Ther **5**(3): 323-31.
- Zhang, Y., Z. Yang, Y. Cao, S. Zhang, H. Li, Y. Huang, Y. Q. Ding and X. Liu (2008). "The Hsp40 family chaperone protein DnaJB6 enhances Schlafen1 nuclear localization which is critical for promotion of cell-cycle arrest in T-cells." Biochem J **413**(2): 239-50.
- Zhao, L., B. Neumann, K. Murphy, J. Silke and T. J. Gonda (2008). "Lack of reproducible growth inhibition by Schlafen1 and Schlafen2 in vitro." Blood Cells Mol Dis **41**(2): 188-93.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." Blood **112**(5): 1557-69.
- Ziegler, S. F. (2007). "FOXP3: not just for regulatory T cells anymore." Eur J Immunol **37**(1): 21-3.
- Zwijzen, 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.

Caractérisation de nouvelles molécules impliquées dans la tolérance immune

La connaissance approfondie des mécanismes immunologiques menant au rejet ou à la tolérance d'une allogreffe représente un enjeu capital pour améliorer le succès de la transplantation d'organes chez l'homme, avec pour objectif de pouvoir mettre en place de nouveaux traitements permettant de remplacer les traitements immunosuppresseurs. La première partie de cette thèse a été consacrée à l'étude de deux molécules identifiées comme surexprimée dans un modèle de tolérance à une allogreffe cardiaque chez le rat : la Follistatin-Like 1 (FSTL1) et TORID. Nous avons pu montrer que FSTL1 est produit par les lymphocytes T CD8⁺ infiltrant le greffon et a la capacité d'induire une prolongation de la survie de la greffe associé à une diminution de la production de cytokines proinflammatoires tel que l'IL6, l'IFN γ et l'IL17. Dans l'étude du rôle de la molécule TORID (Tolerance Related and InduceD transcript), nous avons pu montrer qu'elle joue un rôle dans le processus de maturation des cellules dendritiques (DC) et qu'elle a la capacité de réguler l'expression d'enzymes décrites comme ayant un rôle immunomodulateur dans les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). De plus, dans un modèle d'induction de tolérance à une greffe de peaux où un rôle des MDSC a été décrit, nous avons montré qu'il n'est pas possible d'induire une tolérance dans les souris déficientes pour TORID. La deuxième partie de cette thèse a été consacrée à l'étude de l'expression et de la régulation de la molécule schlafen-3 (SLFN3) dans le système immunitaire et plus particulièrement dans les cellules T régulatrices (Treg). Nous avons montré que cette molécule est plus fortement exprimée dans les Tregs que dans les cellules T effectrices et que, suite à l'activation des cellules, SLFN3 est diminué dans les Tregs mais augmenté dans les cellules effectrices.

Mots clés : Allogreffe, Tolérance, Lymphocytes T régulateurs, cellules dendritiques, FSTL1, TORID, SLFN3.

Characterization of new molecules involved in immune tolerance

A better understanding of immune mechanisms involved in allograft rejection or tolerance has to be considered as a major research goal. This knowledge could lead to the design of new therapeutical approach that could be used in the future to replace immunosuppressive treatment. In the first part of this thesis, we have study the potential role of two molecules upregulated in a model of cardiac allograft tolerance in the rat: The Follistatin-Like 1 (FSTL1) and TORID. We have shown that FSTL1 is produced by graft infiltrating CD8⁺ T cells in this model and that FSTL1 could induce a prolonged allograft survival in association with inhibition of the proinflammatory cytokines, IL6, IL17 and IFN γ . In the study of the molecule TORID, we have been able to show a role of this molecule in the maturation of dendritic cells (DC) and a role on the regulation, of previously described, immunomodulatory enzymes in myeloid derived suppressor cells (MDSC). In addition, in a model of skin graft tolerance induction involving MDSC, we have shown that we can not induce a tolerance in TORID deficient mice. In the second part of this thesis, we have study the expression and regulation of the molecule Schlafen-3 (SLFN3) in the immune system and in particular in regulatory T cells (Tregs). We have been able to show that this molecules was strongly expressed in Tregs in comparison to effectors T cells and that, following stimulation, the expression of SLFN3 is downregulated in Tregs but increased in effectors T cells.

Keywords: Allograft, Tolerance, regulatory T cells, dendritic cells, FSTL1, TORID, SLFN3.

CONDAMINE Thomas
INSERM U643 – ITERT
CHU Hotel-Dieu, 30 Bld Jean Monnet
44093 Nantes cedex 1