

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2010

Étude du rôle de SMILE/TMTC3, une molécule surexprimée dans le sang de patients transplantés rénaux ayant une fonction stable de leur greffon en l'absence d'immunosuppression

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Maud RACAPÉ

Le 7 Octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Présidente du jury Françoise Bleicher, Professeur, France

Rapporteurs Jacques Pirenne, Professeur, Belgique

Alberto Sanchez-Fueyo, Docteur en Médecine et Docteur d'Etat, Espagne

Examineurs

Nicolas Pallet, Docteur en Médecine et Docteur d'Etat, France

Jean-Paul Duong Van Huyen, Docteur en Médecine et Docteur d'Etat,
France

Directeur de thèse :

Sophie Brouard, Docteur d'Etat et Directeur de Recherche, France

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION	10
1- Les nouveaux défis de la transplantation: induire la tolérance, éviter le rejet chronique	11
1-1 L'induction de la tolérance chez le primate non humain et dans le cadre clinique.....	11
1-1-1 Approches sans transplantation de cellules hématopoïétiques du donneur ..	12
1-1-2 Approches avec transplantation de cellules hématopoïétiques du donneur ..	16
1-2 Le concept de tolérance partielle ou <i>prope</i> tolérance chez l'homme	19
1-3 La tolérance opérationnelle chez l'homme	22
2- Etablir le profil des patients transplantés rénaux : les biomarqueurs	26
2-1 Les biomarqueurs : intérêts et limitations	27
2-2 Etudes mises en place chez les patients opérationnellement tolérants.....	30
3- SMILE/TMTC3 : TransMembrane and Tetratricopeptide repeat Containing 3.....	33
3-1 Les protéines à répétitions tetratricopeptides : des protéines conservées et ubiquitaires	33
3-2 Structure de SMILE.....	35
3-3 La découverte de SMILE	39
3-3-1 « Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance » <i>Brouard et al.</i> (PNAS 2007)	39

3-3-2 « Etude de deux nouvelles protéines impliquées dans la différenciation odontoblastique » <i>Carrouel et al.</i> (Les Cahiers de l'ADF, 2006)	40
4- La réponse au stress du réticulum endoplasmique	40
4-1 Le stress du RE en immunologie et en transplantation	40
4-1-1 Le stress du RE dans l'immunité et l'inflammation.....	42
4-1-2 Le stress du RE et la transplantation.....	46
4-2 Voie de signalisation	49
4-2-1 Définition du stress du RE	49
4-2-2 Le repliement protéique dans le RE	50
4-2-3 Reconnaissance des protéines mal repliées	51
4-2-4 Transduction des signaux de protéines mal repliées	52
4-2-5 Reprogrammation de la cellule lors d'un stress du RE.....	55
METHODOLOGIE	60
1- Objectif de l'étude 1.....	61
2- Objectif de l'étude 2.....	61
3- Description des patients.....	61
RESULTATS.....	64
Article 1	65
Article 2	77
DISCUSSION GENERALE	100
PERSPECTIVES	105
1- SMILE dans les lymphocytes B	106
2- NF- κ B et SMILE.....	107
3- SMILE est-il impliqué dans la présentation de la protéine MMP2 ?	108

4- Modèles animaux avec modulation de SMILE.....	110
4-1 Souris Knock-Out pour le gène SMILE	110
4-1-1 Présentation du modèle.....	110
4-1-2 Perspectives d'étude du modèle	112
4-2 Souris avec un Knock-Out conditionnel du gène SMILE.....	112
4-2-1 Présentation et intérêt du modèle	112
4-2-2 Perspectives d'étude du modèle	112
4-3 Rat transgénique pour le gène SMILE	114
4-3-1 Présentation du modèle.....	114
4-3-2 Perspectives d'étude du modèle	115
4-4 SMILE dans un modèle de souris XBP1^{-/-} : collaboration avec Laurie Glimcher, Harvard School of Public Health, Boston	115
4-5 SMILE dans un modèle de xélogreffe de neuroblastes porcins dans le cerveau.....	116
4-5-1 Modèle d'étude : collaboration avec Philippe Naveilhan, INSERM U643, Nantes	116
4-5-2 Résultats préliminaires	116
BIBLIOGRAPHIE	119
ANNEXES.....	137
Annexe 1.....	138
Annexe 2.....	148
Annexe 3.....	155
Annexe 4.....	156
Annexe 5.....	157

ABREVIATIONS

ADN/ADNc : Acide DésoxyriboNucléique/ADN complémentaire

ADP/ATP : Adenosine Di/TriPhosphate

AP1 : Activator Protein 1

ARE : Antioxidant Response Element

ARN : Acide RiboNucléique

ASK1 : Apoptosis Signal regulating Kinase 1

ATF4/6 : Activating Transcription Factor 4/6

ATG : antithymocyte globulin

BANK1 : B-cell scaffold protein with ANKyrin repeats 1

BAP31 : B-cell receptor-associated protein 31

Bcl2 : B-cell CLL/lymphoma 2

CD : Cellule Dendritique

CD : Cluster de Différentiation

CD40L : CD40 Ligand

CDR3-LD : complementary determining region 3-length distribution

CHOP : CCAAT/enhancebinding protein (C/EBP) HOmologous Protein

CNX : Calnexin

CPA : Cellule Presentatrice d'Antigène

CRE : cAMP Response Element

CRT : Calreticuline

CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

EDEM : ER Degradation Enhancing α -Mannosidase-like protein

EIF2 α : Eukaryotic translation Initiation Factor 2A

ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation

ERK1 : Extracellular signal-Regulated Kinase 1

Erp72 : Endoplasmic reticulum protein 72

ERSE : ER Stress response Element

FOXP3 : Forkhead Box p3

GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34

GITR : Glucocorticoid-Induced TNF Receptor

GRP : Glucose Regulated Protein

HLA : Human Leucocyte Antigen

HO-1 : Heme Oxygenase 1

HSP : Heat Shock Protein

ICOS : Inducible costimulator

IDO : Indoleamine 2,3-Deoxygenase

IFN γ : Interferon gamma

Ig : Immunoglobuline

IL-10 : Interleukin-10

IOT : Indice Of Tolerance

IR : Ischemie-Reperfusion

IRE1 : Inositol-REquiring protein 1

IS : Immunosuppression

ITN : Immune Tolerance Network

JNK : c-Jun N-terminal kinase 1

K $^{+}$: Ion Potassium

LIGHT = TNFSF14 : Tumor Necrosis Factor (ligand) SuperFamily, member 14

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

Na $^{+}$: Ion Sodium

NF-KB : Nuclear factor KB

ORP150 : 150 kDa Oxygen-Regulated Protein

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells, Cellules mononucléées du sang périphérique

PD-1: programmed cell death 1

PDI : Protein Disulfide Isomerase

PERK : double-stranded RNA-activated Protein kinase (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PP1 : Protein Phosphatase 1

PTP : Permabilization Transition Pore

RE : Réticulum Endoplasmique

RISSET : Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance

ROS : Reactive Oxygen Species

RT-PCR : Real Time-Polymerase Chain Reaction

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

TCR : T Cell Receptor

TGFβ : Transforming Growth Factor beta

Th1/2 : T helper 1/2

TLR4 : Toll-Like Receptor 4

TMO : Transplantation de Moëlle Osseuse

TMTC3 : TransMembrane and Tetratricopeptide repeat Containing 3

TNFα : Tumor Necrosis Factor alpha

TPR : Tetratricopeptide Repeat

TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2

UGGT : uridine diphosphate (UDP)-Glucose : Glycoprotein glucosyl Transferase

UPR : Unfolded Protein Response

XBP1 : X-Box-binding Protein 1

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des hélices du domaine TPR de la PP5.....	35
Figure 2 : Prédiction des caractéristiques de la séquence de SMILE.	36
Figure 3 : Représentation schématique de la protéine SMILE.	37
Figure 4 : Prédiction des domaines conservés de SMILE.	37
Figure 5 : Extrait de la séquence de prédiction des hélices transmembranaires de SMILE.....	38
Figure 6 : Représentation schématique de la protéine SMILE.	39
Figure 7 : Modèle d'activation de NF- κ B et JNK par la voie UPR.....	46
Figure 8: Liaison ADP-ATP de BiP.....	51
Figure 9 : Signalisation par ATF6.	52
Figure 10 : Signalisation par IRE1.	53
Figure 11 : Signalisation par PERK et Nrf2.....	54
Figure 12 : Récapitulatif de la réponse UPR.	55
Figure 13 : Stress du RE et métabolisme.	57
Figure 14 : Médiateurs de l'apoptose induite par le stress du RE.	59
Figure 15 : Développement des cellules B.....	107
Figure 16 : Expression des transcrits de SMILE dans des HAEC (Human Aortic Endothelial Cells) activées au TNF α pendant 0 à 24 heures.	108
Figure 17 : Choix de la stratégie de délétion du gène SMILE.	110
Figure 18 : Expression des transcrits de SMILE dans des cerveaux de rats à différents stades embryonnaires.....	111
Figure 19 : Séquence plasmidique du transgène SMILE.	115
Figure 20 : Expression des transcrits de SMILE dans des biopsies de cerveaux de rats lors d'une cinétique de rejet de neuroblastes porcins.....	117
Figure 21 : Expression des transcrits de SMILE dans des biopsies de cerveaux de rats ayant subi une greffe de neuroblastes porcins ou une co-greffe CSM de rat + neuroblastes.	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principales approches pour établir la tolérance chez le primate non humain et en transplantation clinique.	12
Tableau 2 : Maladies liées au stress du RE.	41
Tableau 3 : Contribution pathogénique du stress du RE dans les maladies rénales.....	42
Tableau 4 : Catégories de diagnostic Banff 1997 pour les biopsies d'allogreffes rénales – Mise à jour Banff 2009.	63

INTRODUCTION

1- Les nouveaux défis de la transplantation: induire la tolérance, éviter le rejet chronique

On dénombre aujourd'hui plus d'un million de patients transplantés dans le monde, et tout indique que ce nombre va continuer à croître dans les années à venir. Les traitements immunosuppresseurs actuels sont efficaces pour prévenir ou maîtriser le rejet aigu des greffes et permettent ainsi d'obtenir de bons résultats à court et moyen terme: notamment en transplantation rénale, 70 à 90 % des greffes sont encore fonctionnelles 1 an après la transplantation et au cours des années suivantes, 5 à 8 % des reins greffés sont perdus annuellement (Axelrod et al., 2010). Cependant, les résultats à long terme sont beaucoup moins favorables (Tantravahi et al., 2007). Ainsi, environ la moitié des greffons rénaux sont perdus 10 ans après avoir été mis en place, le plus souvent en relation avec un rejet chronique non maîtrisé par les médicaments immunosuppresseurs (Nankivell et al., 2003). Outre leur incapacité à prévenir le rejet à long terme, les médicaments immunosuppresseurs actuels entraînent différents effets secondaires qui altèrent la qualité de vie des patients greffés et les exposent à un risque accru d'infections opportunistes (Eid and Razonable, 2010), de désordres lymphoprolifératifs post-transplantation (Dantal and Soulillou, 2005) et de néphrotoxicité (Nankivell et al., 2003). Au plan pharmacoéconomique, on peut estimer que le coût global des médicaments immunosuppresseurs et de la prise en charge de leurs effets secondaires est de l'ordre de 2 milliards d'Euros par an au sein de l'Union Européenne (Veenstra et al., 1999). Il apparaît ainsi que les progrès futurs en transplantation dépendront de notre capacité à réduire ou éviter complètement l'immunosuppression à long terme, en adaptant l'immunosuppression à la réactivité immunologique du receveur de la greffe et en développant de nouvelles stratégies thérapeutiques pour induire la tolérance à long-terme et/ou maîtriser les rejets chroniques.

1-1 L'induction de la tolérance chez le primate non humain et dans le cadre clinique

Bien que les petits modèles animaux (rongeurs notamment) représentent des modèles utiles pour étudier la transplantation, ils ne reflètent pas parfaitement la situation clinique. Ceci est illustré par une certaine facilité à induire la tolérance chez les petits animaux, et si cela représentait précisément la situation humaine, la tolérance aurait été obtenue il y a de nombreuses années en clinique. Il y a des différences importantes entre le système immunitaire des petits animaux et celui de l'homme, ce qui oblige les chercheurs à utiliser des modèles animaux plus gros, en particulier les primates non humains, pour tester les théories et les thérapies développées chez les petits animaux. Chez le primate non humain et chez l'homme, les stratégies visant à induire une tolérance clinique peuvent

être divisées en deux catégories: les approches sans transplantation de cellules hématopoïétiques du donneur et les approches avec transplantation de cellules hématopoïétiques du donneur, reposant sur l'établissement d'un chimérisme chez le receveur (Tableau 1).

Tableau 1: Principales approches pour établir la tolérance chez le primate non humain et en transplantation clinique.

Source : Fehr et Sykes, 2004, *Transplant. Immunol.*

<i>Non-HCT-based approaches</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Intense and long-lasting T cell/lymphocyte depletion • Signaling blockade (combined with T cell depletion) • Costimulatory blockade • Donor antigen infusion 	<ul style="list-style-type: none"> • Total lymphoid irradiation (TLI) • Monoclonal antibodies: anti-CD52 (Campath-1H), anti-CD3 immunotoxin (FN18-CRM9) • STEALTH approach: anti-CD3 immunotoxin plus NF-κB inhibition (Deoxyspergualin) • Sirolimus (Rapamycin) • CD40–CD154 pathway: anti-CD154 • CD28–CD80/86 pathway: CTLA4-Ig, anti-CD80/86 • Donor lymphocytes • Donor bone marrow (or other hematopoietic cells)
<i>HCT-based approaches</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Sequential bone marrow and solid organ transplantation (kidney, liver, lung) • Combined bone marrow and solid organ transplantation (kidney) 	

HCT : Hematopoietic Cell Transplantation

1-1-1 Approches sans transplantation de cellules hématopoïétiques du donneur

Déplétion lymphocytaire –

Le rejet d'allogreffe étant principalement un processus dépendant des lymphocytes T, la déplétion des lymphocytes du receveur juste avant la transplantation a été utilisée pour induire une tolérance immunologique chez les primates non humains et chez l'homme. Cette déplétion a été réalisée notamment par irradiation lymphoïde totale, une approche précoce et non spécifique impliquant l'irradiation ciblée des tissus lymphoïdes, induisant une déplétion profonde des lymphocytes. Ce protocole a pu être appliqué avec succès chez le primate non humain par le groupe de Myburgh (Myburgh et al., 1980), et l'absence de réponse spécifique du donneur en réaction lymphocytaire

mixte a pu être démontrée chez certains de ces animaux (Myburgh et al., 1989). Une étude du même groupe a rapporté une augmentation des cas de tolérance quand l'irradiation lymphoïde totale était combinée avec des anticorps anti-CD3 ou -CD4 conjugués à l'idarubicine (drogue cytotoxique) pour la déplétion des lymphocytes T (Myburgh et al., 2001). Ces résultats corrént avec une étude de Strober et al. montrant une tolérance à une greffe de cœur chez le chien après irradiation lymphoïde totale en conjugaison avec des globulines anti-thymocytes polyclonales (ATG, anticorps anti-lymphocytes T) (Strober et al., 1984). Chez l'homme, Strober et al. ont publié une étude sur une cohorte de 28 patients transplantés rénaux ayant subi une irradiation lymphoïde totale et reçu de l'ATG avec de faibles doses de prednisonne (Strober et al., 1989). Les résultats ont été les suivants : 11 patients sur 28 n'ont pas eu de rejet la première année, 9 sur 28 ont présenté une absence de réponse spécifique du donneur en réaction lymphocytaire mixte et 3 sur 28 ont arrêté avec succès l'immunosuppression (Strober et al., 1989). Un de ces 3 patients avait en 2000 une fonction rénale normale, pas de microchimérisme dans le sang périphérique, pas d'anticorps anti-HLA mais une réponse anti-donneur vigoureuse en réaction lymphocytaire mixte, suggérant que dans ce cas au moins la délétion clonale n'était pas le mécanisme d'induction de tolérance (Strober et al., 2000).

Ces études prouvent que la tolérance immunologique à une allogreffe peut être obtenue par irradiation lymphoïde totale combinée à des anticorps anti-lymphocytes T. Cependant, ce protocole ayant induit la tolérance chez un faible pourcentage de patients et les complications potentielles de l'irradiation lymphoïde totale (complications infectieuses et cancers) n'étant pas acceptables pour la transplantation de routine, cette approche n'a pas été poursuivie.

L'approche de déplétion des lymphocytes T est une approche logique pour éviter l'allorésistance des cellules T étant donné la fréquence très importante de cellules T alloréactives dans le répertoire T naïf. Les premières préparations d'anticorps utilisées depuis les années 60 ont été les ATG (paragraphe ci-dessus), mais aucune étude d'induction de tolérance chez le primate non humain ou l'homme n'a été publiée à l'exception de celles mentionnées ci-dessus et ayant combiné l'ATG avec une irradiation lymphoïde totale. Il a été suggéré que la déplétion des cellules T avec l'ATG n'était pas assez profonde pour induire une tolérance. L'utilisation d'une immunotoxine anti-CD3 (un anticorps monoclonal anti-rhesus CD3 couplé à une toxine de la diphteria mutée) a également été testée chez des primates non humains afin d'induire une déplétion plus intense des cellules T, et une survie de l'allogreffe rénale supérieure à 200 jours a été observée chez la moitié de ces animaux dans une étude de Knechtle et al. en 1997 (Knechtle et al., 1997). Cependant, les biopsies rénales après 100 jours ont montré des infiltrations de cellules T et de l'hyperplasie néointimale dans les artérioles rénales, signes de rejet chronique. Certains animaux étaient également positifs pour les alloanticorps

(Armstrong et al., 1998). Aucune étude clinique n'a été menée avec ce composé. L'alemtuzumab (anticorps monoclonal anti-CD52 ou Campath-1H) a été introduit dans les essais cliniques à la place des immunotoxines anti-CD3. Il produit une déplétion en cellules T importante, insuffisante cependant pour induire une tolérance puisqu'un essai conduit sur 7 patients traités avec l'anticorps anti-CD52 seul a montré que les patients souffraient d'épisodes de rejets aigus réversibles par immunosuppression (Kirk et al., 2003). La fonction rénale est redevenue stable chez ces patients seulement après introduction d'un traitement à la cyclosporine (Kirk et al., 2003). Les traitements à l'immunotoxine anti-CD3 chez le primate ont montré un syndrome de production de cytokines pro-inflammatoires avec fuites vasculaires appelé syndrome de réponse inflammatoire systémique. Ce syndrome a conduit à la mort de certains singes et à des épisodes de rejets sévères chez certains autres, probablement via l'activation des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et des cellules T (Contreras et al., 1998). Des essais ont donc été menés chez le primate non humain combinant l'immunotoxine anti-CD3 avec des molécules interférant avec les voies de signalisation des cytokines, comme par exemple avec la déoxyspergualine (interférant avec NF- κ B) pendant 14 jours, des corticostéroïdes et de l'aspirine ayant été donnés en traitement d'appoint anti-inflammatoire. Ce protocole a conduit à une survie à long-terme de l'allogreffe rénale sans rejet pendant plus d'un an chez plus de 75% des singes, sans néphropathie chronique d'allogreffe (Thomas et al., 1999). Aucun essai clinique n'a été réalisé par cette approche. L'immunotoxine anti-CD3 chez le primate non humain (Jonker et al., 2002) ou l'anticorps anti-CD52 chez l'homme ont également été inclus dans des protocoles en conjugaison avec le sirolimus (rapamycine, interférant avec la voie de signalisation du récepteur de l'IL-2 et bloquant l'activation autocrine et paracrine des cellules T) (Knechtle et al., 2003). La tolérance à l'allogreffe à long terme n'a pu être établie dans aucun de ces protocoles. Dans l'étude avec les primates non humains, la survie a été prolongée de 29 à 200 jours, mais tous les animaux ont finalement développé des rejets chroniques ou des complications infectieuses (surtout à CMV). Dans l'étude chez l'homme, 8 patients sur 29 ont développé des épisodes de rejets, 7 ont donc été convertis à la triple thérapie et un transplant a été perdu. Cependant, 21 patients sur 29 ont eu une fonction stable du greffon et aucun signe de rejet dans les biopsies après 6 et 12 mois. Aucune infection systémique ne s'est développée en dépit de la déplétion intensive des cellules T.

Blocage de la co-stimulation –

Le blocage de la costimulation a principalement été exploité chez les primates non humains et l'homme au niveau des voies B7.1-B7.2/CD28 et CD40-CD154 à l'aide d'immunoglobulines (Ig) anti-CTLA4 et d'anticorps anti-B7 ou anti-CD40L (anticorps anti-CD154) comme pour les modèles de

rongeurs, suivant différentes combinaisons de ces anticorps. Chez les primates non humains, l'utilisation des Ig anti-CTLA4 en monothérapie est inefficace pour induire une survie à long terme de l'allogreffe (Kirk et al., 1997). Une étude récente de Poirier et al. a cependant montré qu'un anticorps humain chimérique antagoniste monovalent anti-CD28 (sc28AT, qui se fixe à B7.1-B7.2 sans induire de signal de costimulation et qui ne bloque pas l'interaction CTLA4/B7.1-B7.2) agissait en synergie avec des inhibiteurs de calcineurine pour promouvoir l'acceptation d'une allogreffe rénale ou cardiaque chez le primate non-humain (Poirier et al., 2010). De plus cette équipe a montré que le blocage sélectif de CD28 affectait directement les cellules T effectrices tout en induisant une régulation par les lymphocytes T régulateurs, le CTLA4 et d'autres molécules immunomodulatrices tels que l'IDO, l'HO-1 et le TGF β (Poirier et al., 2010). Aucune étude se focalisant sur l'application de ces stratégies d'induction de tolérance dans le cadre clinique n'a été publiée. Cependant, un essai clinique récent utilisant les Ig anti-CTLA4 en allotransplantation rénale a montré que quand les Ig anti-CTLA4 sont utilisées à dose suffisante, elles ne sont pas moins efficaces que la cyclosporine A pour prévenir le rejet aigu, et pourraient préserver le taux de filtration glomérulaire et réduire le taux de néphropathies chroniques d'allogreffes (administration à vie, en absence d'inhibiteurs de calcineurine, et en association avec le mycophénolate mofétil et les stéroïdes) (Vincenti et al., 2007). Ainsi, le belatacept (Ig anti-CTLA4, protéine de fusion entre le fragment Fc de l'IgG1 humaine et le domaine extracellulaire de CTLA4) est en essai clinique de phase III, mais le traitement est envisagé à long-terme pour l'instant. L'utilisation combinée d'anticorps anti-B7.1 et B7.2 a été plus efficace que les Ig anti-CTLA4 chez le primate non humain, mais la tolérance n'a pas été induite non plus (Kirk et al., 2001). La prolongation de survie d'une allogreffe rénale pendant plus de 150 jours a été obtenue chez le primate non humain par l'utilisation synergique des Ig anti-CTLA4 et des anticorps monoclonaux anti-CD154, administrés en péri-opératoire jusqu'à la quatrième semaine après greffe (Kirk et al., 1997). Ces animaux n'ont subi aucun épisode de rejet, ont conservé une fonction stable de leur rein et des réponses vigoureuses contre les cellules du donneur ou d'un autre animal en réaction lymphocytaire mixte (Kirk et al., 1997). L'utilisation des anticorps anti-CD154 a montré une bonne efficacité de prolongation de survie d'allogreffe chez le primate non humain (survie supérieure à 500 jours après 6 mois d'induction à l'anti-CD154) (Kirk et al., 1999). Cependant, les animaux ont tous développé des néphropathies chroniques d'allogreffes avec infiltration de cellules mononucléées dans le greffon et développement d'autoanticorps. L'introduction de l'anticorps anti-CD154 a été entravée dans les essais cliniques du fait de l'apparition d'évènements thromboemboliques et d'épisodes de rejet aigu (Knechtle et al., 2001). Les essais cliniques utilisant l'anti-CD154 ont donc été suspendus. Pour finir, un essai clinique de phase I/II mené par l'équipe de

Vincenti en transplantation rénale et utilisant un anticorps anti-LFA1 humanisé (Lymphocyte Function-associated Antigen, chaîne alpha L de l'intégrine; LFA1 a un rôle dans l'adhésion leucocytaire et dans la voie de costimulation des lymphocytes), l'efalizumab, apparaît prometteur pour la survie d'une allogreffe rénale et ouvre de nouvelles perspectives de blocage d'autres voies de costimulation (Vincenti et al., 2007).

Régulation lymphocytaire –

Finalement, une étude a montré une prolongation de la survie à long terme d'une allogreffe rénale chez 3 primates non humains sur 6 après transfusion de cellules T anergiques générées *ex vivo* (Bashuda et al., 2005). Cependant l'utilisation de cellules régulatrices n'a pas été rapportée en transplantation clinique jusqu'à maintenant. De plus, aucune augmentation de cellules régulatrices T CD4⁺ CD25⁺ n'a été rapportée dans le sang des patients tolérants une allogreffe rénale, même si une diminution de ces cellules est observée chez les patients en rejet chronique (Louis et al., 2006). Les cellules régulatrices présentent néanmoins un potentiel intéressant dans le contexte de l'induction de tolérance étant donné leur capacité à inhiber les réponses alloantigéniques des cellules T effectrices du receveur. Cette stratégie requiert donc une recherche plus approfondie dans le contexte clinique.

1-1-2 Approches avec transplantation de cellules hématopoïétiques du donneur

Ces approches diffèrent des approches sans transplantation de cellules hématopoïétiques sur un point majeur : les cellules hématopoïétiques dérivées du donneur peuvent atteindre le thymus du receveur et promouvoir la sélection négative de cellules T naissantes réactives au donneur. Les expériences variées menées dans les modèles animaux ont montré que l'établissement d'un chimérisme complet du donneur conduisait à la tolérance au transplant. Les deux premiers patients qui ont confirmé ces résultats dans le cadre clinique ont été publiés par Sayegh et al. en 1991 (Sayegh et al., 1991). Les deux patients ont reçu une transplantation de moëlle osseuse HLA-identique pour le traitement d'une leucémie aigüe. Plusieurs années après, ils ont développé une dysfonction rénale chronique et ont reçu une allogreffe rénale du donneur de moëlle osseuse. Les greffes ont été acceptées sans thérapie immunosuppressive (Sayegh et al., 1991). Par la suite, différentes études ont rapporté des résultats similaires en transplantation rénale (Helg et al., 1994; Butcher et al., 1999; Sellers et al., 2001; Hamawi et al., 2003). Trois cas ont également montré que la tolérance peut être obtenue quand un organe transplanté est suivi d'une transplantation de moëlle osseuse du même donneur (Matthes-Martin et al., 2000; Ringden et al., 2000), dont un en transplantation rénale (Gajewski et al., 2002). Dans ce dernier cas, un patient adulte a reçu une

transplantation de moëlle osseuse 14 ans après une allogreffe rénale du même donneur HLA-identique à cause d'une leucémie secondaire due à l'immunosuppression à long-terme par la cyclophosphamide (Gajewski et al., 2002). Ces « preuves de concept » suggèrent fortement que la transplantation de cellules hématopoïétiques peut conduire à une tolérance immunologique dans le cadre clinique et ont conduit à des essais chez les primates non humains. Certains protocoles ont combiné une induction de la tolérance centrale par irradiation thymique, une tolérance périphérique par irradiation totale, déplétion des cellules T par ATG, splénectomie et traitement à la cyclosporine et l'établissement d'un chimérisme mixte transitoire par transplantation de moëlle osseuse. La survie à long-terme du greffon rénal sans signes de néphropathie d'allogreffe et avec une absence de réponse aux cellules du donneur en réaction lymphocytaire mixte, a pu être obtenue grâce à ce type de protocole chez les animaux présentant un macrochimérisme lymphohématopoïétique mixte (Kawai et al., 1995; Kimikawa et al., 1997a; Kimikawa et al., 1997b). Le chimérisme établi était transitoire chez ces animaux, contrairement aux expériences chez le rongeur. Des résultats prometteurs ont pu être obtenus par ce type de protocole utilisant un régime conditionnant par irradiation lymphoïde totale et ATG chez 4 patients. Ceux-ci ont développé un chimérisme mixte persistant et une fonction stable de la greffe pendant 6 à 35 mois après arrêt des traitements (Scandling et al., 2008). La tolérance périphérique induite par l'ATG ou l'irradiation totale chez les primates non humains a également été remplacée par l'anticorps anti-CD154, moins toxique (Kawai et al., 2000). Cependant, la survenue de complications thromboemboliques dues à l'anticorps anti-CD154 comme mentionné précédemment, oriente maintenant les recherches vers un inhibiteur de l'activation plaquettaire afin de contrer les effets de l'anti-CD154 (Koyama et al., 2004). Deux centres seulement ont publié des résultats sur une approche de chimérisme mixte pour l'établissement d'une tolérance à l'allogreffe rénale. Millan et al. ont conditionné quatre patients avec une irradiation lymphoïde totale et de l'ATG, et les ont transplanté avec des reins haploidentiques ou HLA-identiques de donneurs vivants et des cellules hématopoïétiques CD34⁺ du même donneur. L'immunosuppression de maintenance (cyclosporine A et prednisone) a été ensuite graduellement arrêtée. Trois patients sur 4 ont développé un macrochimérisme qui a été perdu dans les 3 premiers mois. Aucune maladie du greffon contre l'hôte n'a été détectée. Deux patients ont arrêté leur immunosuppression après 12 mois. Ils ont développé des épisodes modérés de rejet aigu et l'immunosuppression a du être réintroduite (Millan et al., 2002). Ainsi, la tolérance n'a pas été atteinte. Une étude a également été menée sur 6 patients présentant un myélome et une dysfonction rénale terminale. Le protocole de tolérance incluait des traitements de déplétion cellulaire par la cyclophosphamide (remplaçant l'irradiation lymphoïde totale et la splénectomie des

études chez le singe), une déplétion des cellules T par l'ATG et une irradiation thymique, suivie d'une allotransplantation rénale et de moëlle osseuse du même donneur HLA-identique. Les 6 patients ont développé un macrochimérisme initial, et les résultats pour 2 d'entre eux sont publiés et montrent une tolérance après 3,5 à 5,5 ans de suivi (Spitzer et al., 1999; Buhler et al., 2002). D'autre part, Kawai et al. ont montré qu'un régime myéloablatif avant une transplantation rénale et une infusion de moëlle osseuse conduisait à une fonction rénale stable après arrêt des traitements immunosuppresseurs chez 4 patients sur 5, et une absence de réponse des cellules T aux alloantigènes du donneur. Les patients ont arrêté leur traitement pendant 3 à 6 ans, 9 à 14 mois après la transplantation tout en conservant une fonction stable de leur greffon (Kawai et al., 2008; Porcheray et al., 2009). A partir de la même étude, Porcheray et al. ont montré que deux de ces patients ont développé une réponse humorale dont un présentant des anticorps anti-donneur, sans pour autant rejeter leur greffon (Porcheray et al., 2009).

Pour finir, d'autres études ont montré que les cellules mémoires chez l'homme avaient une expérience antigénique que les rongeurs n'ont pas, et avaient un rôle important dans le rejet de l'allogreffe (Adams et al., 2003). Par exemple, il a été montré que le blocage de la costimulation par les anticorps anti-CD154 et anti-CD28/B7 permettaient l'induction d'un chimérisme mixte après transplantation de moëlle osseuse chez le primate non humain (Setoguchi et al., 2010). Cependant, le conditionnement non-myéloablatif résultant en une déplétion lymphocytaire a conduit à l'expansion de cellules T CD8⁺ mémoires-effectrices réactives aux antigènes du donneur et probablement responsables du rejet de la greffe de moëlle osseuse (Setoguchi et al., 2010). Ces cellules présentent des caractéristiques les rendant difficiles à contrôler en transplantation, comme une résistance au blocage de la costimulation (Yang et al., 2007), un faible seuil d'activation antigénique, une résistance aux thérapies de déplétion par anticorps (Gallon et al., 2006) et à l'apoptose (Wu et al., 2004), et des réponses de réactivation à l'antigène exacerbées qui nécessitent une costimulation minimale, voire nulle (Cho et al., 2000). De nouvelles stratégies visent à cibler ce groupe de cellules T mémoires afin de prolonger la survie de l'allogreffe (Bingaman and Farber, 2004; Habicht et al., 2006). Une des stratégies envisagée serait par exemple de perturber les récepteurs de costimulation de la famille des récepteurs du TNF α , qui semblent être important pour la génération de cellules mémoires à long-terme et la fonction des cellules T mémoires (Croft, 2003; Yuan et al., 2003), ou de perturber la molécule de costimulation ICOS (inducible-costimulator), qui stimule la production de cytokines et la prolifération des cellules T CD4⁺ mémoires (Khayyamian et al., 2002). Il pourrait aussi être possible d'inhiber spécifiquement les cellules mémoires en ciblant leurs molécules d'adhésion, par exemple par l'Ig anti-LFA3 (ciblant CD2) ou les anticorps anti-CD11a, qui sont

efficaces contre les cellules T mémoires-effectrices dans le traitement du psoriasis (Ellis and Krueger, 2001; Dedrick et al., 2002). Enfin, les autres cibles potentielles pour inhiber les réponses de réactivation des cellules mémoires incluent les cytokines et les chémokines (ou leurs récepteurs correspondants) contrôlant les fonctions, l'homéostasie et la survie des cellules T mémoires (Annexe 1 p.140: Racapé et al., Interleukin 7 receptor alpha as a potential therapeutic target in transplantation, 2009, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*). Ainsi, le blocage de la chaîne gamma des récepteurs de cytokines (partagée par les cytokines IL2, 4, 7, 15 et 21) inhibe fonctionnellement les cellules T mémoires autoréactives chez les souris NOD (Demirci et al., 2003). Une des seules études menées chez le primate non humain a ciblé les cellules mémoires par un anticorps monoclonal anti-CD8 humanisé, couplé à un protocole d'induction de tolérance comme ceux décrits précédemment, lors d'une transplantation rénale suivie d'une transplantation de moëlle osseuse (Koyama et al., 2007). Ce protocole a permis d'induire un chimérisme chez 3 primates sur 5, 2 d'entre eux ayant survécu plus de 500 jours sans rejet aigu ou chronique.

Ces résultats sont encourageants et montrent que la tolérance peut être intentionnellement obtenue chez les patients en utilisant une transplantation de cellules hématopoïétiques combinée à une transplantation rénale du même donneur vivant. Cependant, peu de patients en attente d'une allogreffe peuvent bénéficier d'une greffe de donneur vivant HLA-identique, mise en place dans la plupart de ces protocoles et donnant les meilleurs résultats. De plus, ce type de protocole est difficilement applicable dans la vaste majorité des cas à cause du coût d'une transplantation de moëlle osseuse ainsi que du risque important de maladie du greffon contre l'hôte associée à l'état de chimérisme total du receveur, complication non-acceptable chez les patients recevant une transplantation de moëlle osseuse dans le seul but d'induire une tolérance à une allogreffe.

1-2 Le concept de tolérance partielle ou *prope* tolérance chez l'homme

Les risques d'un conditionnement, même non myéloablatif, ne sont pas négligeables, et les cellules de la moëlle osseuse du donneur ne sont pas toujours disponibles. De plus, la sur-médication des patients transplantés survient fréquemment et les effets secondaires des drogues (particulièrement la néphrotoxicité des inhibiteurs de calcineurine) induisent une morbidité et une mortalité importantes des patients. La difficulté de ces protocoles a amené certains auteurs à rechercher, non pas un état de tolérance stricte, mais une fonction du greffon satisfaisante avec un traitement immunosuppresseur minimal, diminuant ainsi le risque de toxicité médicamenteuse et les complications infectieuses et tumorales. Calne et al. ont ainsi développé le concept de *prope* tolérance qui correspond à une survie prolongée du greffon avec une fonction stable chez un receveur parfaitement immunocompétent sous une dose minimale, non toxique,

d'immunosuppresseurs (Calne, 2005). Cette tolérance a également été appelée tolérance partielle (Cortesini and Suciu-Foca, 2004). Le groupe de Calne l'a appliqué à 33 patients transplantés rénaux. Le traitement d'induction reposait sur l'administration d'anticorps anti-CD52 (alemtuzumab) précédée d'une injection de prednisone. Une monothérapie par cyclosporine A a été ensuite maintenue à faible dose. L'incidence de rejet aigu était similaire après 5 ans dans le groupe traité par alemtuzumab (30%) et dans le groupe contrôle non traité par alemtuzumab (n=66 patients, tous sous triple thérapie sauf 5) (27%) (Watson et al., 2005). De même, il n'y avait pas de différence significative concernant l'incidence générale des infections entre les deux groupes (Watson et al., 2005). Avec un recul de 5 ans, 21% des greffes ont été perdues dans le groupe traité à l'alemtuzumab et 26% dans le groupe contrôle, à l'exclusion des pertes de greffons dues au décès des patients (Calne et al., 1998; Calne et al., 1999; Calne, 2004; Watson et al., 2005). Les auteurs concluent que cette stratégie de thérapie d'induction à l'alemtuzumab, avec maintenance à faible dose de cyclosporine, est aussi efficace et sûre que la triple thérapie standard après une transplantation rénale à partir d'un donneur cadavérique. Cette même stratégie utilisant la rapamycine à la place de la cyclosporine s'est cependant accompagnée d'un fort taux de rejet (27%), en particulier de rejet humoral (17%) (Knechtle et al., 2003). Avec un recul de 6 à 12 mois, 72% des sujets ont une bonne fonction rénale, sans signes histologiques de rejet, et sans aucune infection systémique sévère ou de pathologies tumorales (Knechtle et al., 2003). Les taux de rejet observés sont cependant supérieurs à ceux rencontrés actuellement avec une immunosuppression conventionnelle. L'association d'un traitement par ATG puis par sirolimus en monothérapie a été étudiée chez 12 patients : ils présentent tous une fonction rénale satisfaisante (malgré 3 rejets aigus), mais le recul est encore limité pour ce type de protocole (Swanson et al., 2002). Le sirolimus en monothérapie a également été testé par Arellano et al. en 2007 dans une étude pilote sur 50 patients transplantés rénaux (sans déplétion préalable par l'ATG). Ils ont noté une tendance non significative vers un déclin de la fonction rénale, mais n'ont observé aucun cas de rejet et ont même noté une diminution des incidences de néoplasie post-transplantation (Arellano et al., 2007). Cette recherche de tolérance « a minima » a également été appliquée à une cohorte plus importante de patients par l'équipe de Starzl. Quarante-deux patients ayant reçu une greffe d'organe (rein, foie, pancréas ou intestin) ont été traités par de l'ATG puis par tacrolimus en monothérapie. Des cellules de moëlle osseuse du donneur ont été injectées dans certains cas. Après 4 mois de greffe, l'administration de tacrolimus a été progressivement espacée si aucun rejet n'avait été observé. A 1 an, les survies des patients et des greffons étaient respectivement de 95% et 89%. Soixante pour cent des patients recevaient des doses réduites de tacrolimus (Starzl et al., 2003). La même équipe a traité 150 patients après une

transplantation rénale par ATG (et corticostéroïdes initialement) puis par tacrolimus seul en traitement d'entretien (Shapiro, Jordan et al. 2003). La prise de celui-ci a été progressivement espacée au bout de 4 mois en l'absence de complications. Des épisodes de rejets aigus ont été observés dans 37% des cas, ce qui n'est pas négligeable. La survie du greffon à 1 an est cependant satisfaisante (92%) avec seulement 7% des patients recevant plus d'un immunosuppresseur, et 63% des patients ayant des prises espacées de tacrolimus. Ces résultats rejoignent donc ceux mentionnés précédemment, même en l'absence d'injection de cellules du donneur. En transplantation rénale pédiatrique, le problème de faible observance au traitement multi-drogues des jeunes patients s'ajoute à la toxicité des immunosuppresseurs. L'équipe de Starzl a donc appliqué de façon péri-opératoire le protocole précédent de déplétion lymphocytaire à l'ATG ou au Campath-1H, puis le tacrolimus en monothérapie à 34 enfants âgés de 1 à 18 ans (Ellis et al., 2007). Les résultats encourageants de cette étude (seulement 9% de rejet aigu cellulaire et 10% d'hypertension, amélioration du taux de croissance des pré-adolescents (qui diminue lors de dysfonctions rénales chroniques)...) et le potentiel de ce protocole pour une amélioration de l'adhérence au traitement, une diminution de la toxicité des inhibiteurs de calcineurine et une meilleure tolérogénicité, incitent les chercheurs à déterminer si ce régime est efficace pour la prolongation à long-terme de la survie du greffon (Ellis et al., 2007). La monothérapie au tacrolimus après induction à l'alemtuzumab (anti-CD52) a été étudiée plus récemment en 2008 par l'équipe de Villanueva, qui a montré un taux de survie des transplants supérieur à 98% et un taux de rejet chronique histologiquement prouvé de 14% (Villanueva et al., 2008). L'équipe de Faendrich a également analysé 20 patients transplantés rénaux, suivis pendant 2 ans, sans immunosuppresseur pendant 72h après la transplantation, puis sous très faibles doses d'immunosuppresseurs (Dresske et al., 2006). Le rationnel de l'étude était de dégager une fenêtre d'opportunité pour un engagement immunologique non pathogène (WOFIE, window of opportunity for immunological engagement). La reconstitution immunologique devait se faire dans un contexte dénué de signaux de danger et le contact avec les alloantigènes devait induire un état de tolérance dont l'immunosuppresseur devait assurer le maintien. Ils ont alors constaté une diminution de l'incidence du rejet aigu et une meilleure fonction rénale (taux de créatinine faible) comparé aux patients sous traitement immunosuppresseur classique. Ces patients présentaient également une augmentation des lymphocytes T $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ suggérant un rôle potentiel de ces cellules dans la *propre* tolérance (Dresske et al., 2006). Ces études sont donc encourageantes pour envisager une réduction progressive des traitements immunosuppresseurs pour des patients à faible risque immunologique.

1-3 La tolérance opérationnelle chez l'homme

La tolérance opérationnelle correspond à une survie prolongée d'une allogreffe d'organe avec une fonction stable du greffon en l'absence de traitement immunosuppresseur chez un receveur immunocompétent (Ansari and Sayegh, 2004; Monaco, 2004). Certains critères sont parfois retenus pour compléter la définition de tolérance: l'absence d'anticorps anti-donneur, l'absence d'infiltration du greffon par des lymphocytes agressifs et une faible réponse dirigée contre le donneur *in vitro*, alors que la réponse contre les cellules d'une autre personne est conservée (Fehr and Sykes, 2004). Le terme de tolérance opérationnelle ne signifie pas forcément aucune réponse du système immunitaire contre les cellules du donneur, mais se réfère plutôt à une réponse immunitaire du receveur n'entraînant pas la destruction du greffon (Reding, Gras et al. 2006). Ces patients sont rares en transplantation rénale et les cas accidentels de tolérance opérationnelle ont souvent été dus à la non-observance au traitement des patients. La première cohorte de patients spontanément opérationnellement tolérants a été décrite en 2006 par notre groupe, qui a présenté l'historique médical et l'évolution clinique à long-terme d'une cohorte de 10 patients (Roussey-Kesler et al., 2006). Les transplants de ces patients, qui présentaient une fonction rénale stable, n'ont pas été biopsiés. De manière générale, les biopsies du greffon de ces patients sont souvent indisponibles parce que cet état de tolérance opérationnelle clinique a été observé par chance et pas dans un contexte de protocole d'induction de tolérance. De plus, les patients spontanément opérationnellement tolérants sont souvent non observant vis-à-vis des traitements et du suivi médical, et refusent les procédures d'investigation invasives telles que les biopsies (Roussey-Kesler et al., 2006). C'est ce qui fait la différence principale entre la tolérance induite, qui entre dans le cadre d'un protocole médical d'induction de tolérance avec un suivi du patient, et la tolérance opérationnelle, pour laquelle le « matériel » disponible est souvent limité puisque la tolérance est spontanée et n'entre pas dans le cadre d'un protocole précis. L'historique clinique de ces patients opérationnellement tolérants ne diffère pas de manière notable de celui des patients transplantés rénaux en général. Cependant certains points ont été notés: de manière commune, chez 4 patients sur 10, la maladie initiale était la glomérulopathie, comme pour 47% des patients de notre banque de données. D'autre part, 6 patients sur 9 présentent des immunisations anti-HLA après des transfusions sanguines, mais cette proportion est comparable aux proportions habituellement observées dans la littérature. De manière intéressante, 7 patients sur 10 ont arrêté leur traitement de manière progressive, avec plusieurs phases d'arrêt et de reprise du traitement, sans recommandation médicale particulière (Roussey-Kesler et al., 2006). Cette procédure progressive de non-observance, qui mime sous certains aspects la procédure parfois appliquée aux patients

transplantés hépatiques considérés à faible risque de rejet, pourrait sélectionner ces patients et favoriser la transition vers un état de tolérance opérationnelle. Ainsi, l'occurrence de la tolérance opérationnelle pourrait être sous-estimée puisque la non-observance du traitement est plus fréquente qu'actuellement confessée (Greenstein and Siegal, 1998; Butler et al., 2004). D'autre part, il a été montré que l'âge du donneur influait sur la survie du greffon, l'augmentation de l'âge du donneur étant associée à une diminution de la survie du greffon (Alexander et al., 1994; Carter et al., 2000). Or, les donneurs de ces patients étaient plus jeunes que la moyenne d'âge des donneurs de la même année et que les receveurs eux-mêmes. Enfin, ces patients ont conservé la capacité de répondre à d'autres sollicitations immunologiques telles que la vaccination (Ballet et al., 2006), et ne sont donc pas immuno-supprimés de manière non-spécifique. Ils présentaient cependant un taux d'anticorps réactifs avant greffe beaucoup plus faible que celui observé habituellement, suggérant un état de faible alloréponse de ces patients. Ce faible taux d'anticorps réactifs pré-transplantation a depuis été confirmé sur une cohorte plus importante de 27 patients opérationnellement tolérants dans une étude en cours menée par notre équipe (Brouard et al., en préparation). Nos études ont montré que ces patients avaient une augmentation du nombre de cellules régulatrices T CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ par rapport aux patients en rejet chronique (n=7 patients)(Article 1 p.66 : Braudeau, Racapé et al., Variation In Numbers of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T Cells With Normal Immuno-Regulatory Properties In Long-Term Graft Outcome, 2007, *Transpl. Int.*) et une diminution des transcrits de TLR4 et de MyD88 dans les PBMC (n=8 patients) (Braudeau et al., 2008) par rapport aux patients en rejet chronique. Cependant, ces patients opérationnellement tolérants présentent un nombre normal de cellules T CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ et de transcrits de TLR4 et de MyD88 dans les PBMC par rapport aux patients stables et aux volontaires sains, le problème d'un groupe d'individus représentant un comparateur adéquat restant non résolu dans les études sur ce type de patients, comme discuté plus bas (2-1 Les biomarqueurs : intérêts et limitations p.28). Cinq de ces patients opérationnellement tolérants présentent cependant une altération du CDR3-LD (région hypervariable de la chaîne du TCRβ) et une accumulation des transcrits du TCR dans les cellules T sélectionnées, cellules ne présentant pas d'accumulation de transcrits cytokiniques, suggérant une hypo-réponse de ces clones cellulaires (Brouard et al., 2005). Cependant ces patients ne présentent pas les symptômes d'une immunoincompétence inhabituelle contre des antigènes viraux humains après l'interruption de leur traitement. En fait, les patients opérationnellement tolérants ont l'incidence la plus faible d'infections (1 HCV et une infection bactérienne) en dépit d'une surveillance post-transplantation s'étendant souvent sur 10 ans, suggérant qu'ils sont spécifiquement tolérants à leur greffon. Une étude de notre équipe a également montré que le sous-type CD8⁺ CD28⁻ présentant des marqueurs

de cellules cytotoxiques différenciées (perforine, granzyme A) était augmenté chez les patients en rejet chronique par rapport aux patients opérationnellement tolérants (Baeten et al., 2006). La population lymphocytaire effectrice CD8⁺ présentait une tendance à l'augmentation chez les patients en rejet chronique, avec une diminution des marqueurs CD27 et CD28 sur ce sous-type cellulaire par rapport aux patients opérationnellement tolérants. Le niveau d'expression des marqueurs CD27, CD28 et granzyme A de cette sous-population T CD8⁺ CD28⁻ a permis de reclasser correctement les patients opérationnellement tolérants et en rejet chronique comme tels grâce à un modèle utilisant un logiciel de données PAM (Predictive Analysis of Microarray), et de classer une cohorte de patients stables selon un profil de tolérance ou de rejet (Baeten et al., 2006). Le phénotype de cette population lymphocytaire T CD8⁺ CD28⁻ permet donc de distinguer les patients tolérants des patients en rejet chronique. D'autre part, notre équipe avait déjà rapporté une augmentation du nombre de cellules B périphériques chez les patients opérationnellement tolérants par rapport aux patients en rejet chronique (Louis et al., 2006). Récemment, une nouvelle étude de notre équipe a également mis à jour une augmentation du nombre de cellules B mémoires et un enrichissement du profil transcriptomique des patients tolérants en gènes des cellules B (Pallier et al., 2010), enrichissement qui a été confirmé par deux autres groupes (Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010). D'autres cohortes de patients opérationnellement tolérants ont été décrites de manière sporadique : en 1976, Uehling et al. décrivent 5 patients ayant cessé leur traitement. Deux patients décèderont suite à l'arrêt du traitement, 2 reprendront leur traitement. Le dernier patient est resté sans traitement pendant 36 mois, mais son évolution clinique n'est pas connue (Uehling et al., 1976). Zoller et al. ont également décrit une cohorte de 32 patients ayant subi une transplantation d'un donneur vivant HLA-identique ou non et ayant stoppé leur traitement sans avis médical après environ 3 ans de traitement à la prednisone et à l'azathioprine. Parmi ces 32 patients, 12 ont perdu leur greffon. Parmi les 20 restants, 5 ont eu une fonction rénale stable pendant 1 à 3 ans, et 6 pendant plus de 3 ans. Parmi les 16 patients ayant subi une transplantation rénale d'un donneur cadavérique, 9 ont perdu leur greffon en un mois, et seulement quelques patients ont maintenu une fonction stable pendant plus d'un an; aucun n'a maintenu sa fonction pendant plus de 2 ans (Zoller et al., 1980). Dans une revue de 2004, Starzl et al. rapportent le cas de 7 patients ayant arrêté leur traitement pendant 3 à 38 ans. Ces patients avaient subi un pré-traitement journalier d'azathioprine pendant une ou deux semaines avant la transplantation puis le traitement avait été suivi après transplantation avec l'ajout de prednisone quand il y avait une détérioration des fonctions rénales post-opératoires initialement bonnes. Peu de données immunologiques ont été fournies concernant ces patients, mais de manière surprenante, la tolérance s'est établie chez ces patients en dépit de la non concordance au HLA pour

5 des 7 patients et de l'incompatibilité de groupe sanguin pour un des patients (Starzl et al., 2004). L'un des 7 patients est décédé à l'heure actuelle, et les autres conservent une bonne fonction rénale sans traitement (Berlanda et al., 2008). Certains travaux rapportent chacun le cas d'un patient présentant une tolérance opérationnelle, l'un présentant un microchimérisme avec présence de cellules T anergiques de la mère (donneuse), ce patient ayant maintenant rejeté son transplant après 10 ans de tolérance opérationnelle (Burlingham et al., 1995), un autre portant le rein de sa mère puis de son père qui avait stoppé son traitement depuis plus de 3 ans pour cause de désordre lymphoprolifératif post-transplantation et présentant une hypo-réponse aux cellules de ses parents et une diminution des transcrits de cytokines Th1 (Christensen et al., 1998). Un cas de grossesse d'une patiente transplantée avec arrêt des traitements pendant la grossesse a également été rapporté par Fischer et al. en 1996, avec une fonction rénale stable pendant 9 ans après arrêt des traitements (Fischer et al., 1996). Deux patients transplantés rénaux, dont un ayant un greffon de donneur vivant et l'autre de donneur cadavérique, et ayant respectivement aucune disparités HLA et 2 disparités, aucun traitement d'induction et un traitement d'induction à l'OKT3 (anticorps monoclonal murin anti-CD3) et une fonction stable de leur greffon après plus de 27 et 5 ans d'arrêt des traitements, ont été rapportés en 2000 par Vanbuskirk et al. Ces patients présentent une absence de réponse aux antigènes du donneur qui semblerait régulée par l'IL10 ou le TGF β (VanBuskirk et al., 2000). En 2005, l'équipe d'Alvarez a mené une étude sur le répertoire TCR de cellules T circulantes chez des patients transplantés rénaux présentant une survie de leur allogreffe rénale de plus de 9 ans avec (n=16) ou sans traitement (n=3), comparés à des patients avec une bonne fonction rénale à 1 an ou 3 ans post-transplantation, des volontaires sains ou des patients sous dialyse et des patients en rejet aigu ou chronique. L'étude a montré que ces patients présentant une survie à long-terme de leur allogreffe rénale présentaient une altération de leur répertoire TCR sous la forme d'une augmentation de l'oligoclonalité du profil CDR3 des gènes V β (traduisant une diminution de la diversité d'expression du TCR) et d'une polyclonalité diminuée par rapport aux patients en rejet (Alvarez et al., 2005), rejoignant les résultats de notre équipe (Brouard et al., 2005). Cette étude montre aussi que l'oligoclonalité chez ces patients n'est pas dépendante du traitement immunosuppresseur puisqu'elle est retrouvée chez les 3 patients sans immunosuppression. Les auteurs suggèrent que la réponse immune chez ces patients est diminuée du fait d'un épuisement de certains clones ou de la prédominance de famille de cellules T spécifiques aux dépens d'autres familles. Ils envisagent également l'hypothèse d'une perte des cellules effectrices ou d'une augmentation des cellules T particulières ayant des capacités régulatrices (Alvarez et al., 2005). Les cohortes de patients opérationnellement tolérants et en rejet chronique de l'étude de notre équipe

en 2005 ont récemment été augmentées et ont donné lieu à une nouvelle étude qui confirme les altérations du répertoire TCR-V β des patients tolérants, classées selon un « gradient TcLandscape » de classes 1 et 2 (Miqueu et al., 2010). Cependant, une altération plus importante du répertoire des patients en rejet chronique par rapport au répertoire des patients tolérants a été découverte, classée en « gradient TcLandscape » de classes 3 et 4, ces résultats étant en contradiction avec l'étude de 2005 et celle d'Alvarez et al. (Miqueu et al., 2010) qui ne montrent pas d'altérations significatives du répertoire TCR-V β chez les patients en rejet. Il est probable que l'augmentation du nombre de patients dans l'étude a permis de mettre à jour des altérations qui n'étaient pas significatives sur une cohorte plus petite. Dernièrement, l'équipe de Coelho a réalisé une étude sur le profil de cellules régulatrices T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ et sur la signalisation STAT chez 5 patients opérationnellement tolérants, comparés à des patients en rejet chronique. Ces patients, dont 4 ont un greffon de donneur vivant sans disparités HLA pour 2 d'entre eux, ont tous arrêté le traitement sans avis médical et présentent une fonction stable du greffon depuis 1,5 à 8 ans. L'étude montre que les patients tolérants présentent une diminution de l'activation de la voie IL4/STAT6 (en relation avec l'expression de FOXP3) dans les monocytes ainsi qu'une augmentation des cellules T CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ par rapport aux patients en rejet chronique (Moraes-Vieira et al., 2010).

En conclusion, la tolérance au greffon sans traitement, inimaginable il y a quelques années, est donc possible de manière spontanée (« tolérance opérationnelle ») et de manière induite. Les traitements immunosuppresseurs entraînant des effets secondaires néfastes sur le long terme et leur efficacité sur le développement du rejet tardif étant limitée, l'obtention d'une tolérance spécifique du greffon sans immunosuppression globale prolongée est le but ultime en transplantation. Un problème subsiste cependant ; malgré les études menées sur les cohortes de patients opérationnellement tolérants ou ayant subi une induction de la tolérance. En effet, il n'existe pas actuellement de marqueur prédictif de réussite lors de la réduction ou de l'arrêt du traitement, comme nous le verrons plus loin. La caractérisation des patients présentant une tolérance spontanée ou induite au greffon devient donc nécessaire, afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'établissement de cette tolérance, et pour mettre en place un « profilage » des patients stables sous immunosuppression qui pourraient présenter potentiellement un état de tolérance et bénéficier d'une diminution ou d'un arrêt des traitements immunosuppresseurs.

2- Etablir le profil des patients transplantés rénaux : les biomarqueurs

Le développement de nouveaux tests permettant de mesurer de façon reproductible et sensible la réactivité du patient transplanté vis-à-vis de son greffon, est une étape indispensable à la mise en oeuvre à large échelle d'études cliniques visant à réduire au minimum nécessaire

l'immunosuppression pour éviter le rejet. Il est probable que c'est le suivi des événements biologiques au sein même du greffon qui permettra le mieux de prévoir l'évolution de celui-ci et de classer les patients comme candidats ou non à un arrêt des traitements immunosuppresseurs. Il y a donc un besoin en biomarqueurs spécifiques de ces événements biologiques, biomarqueurs qui pourraient guider la décision clinique pour l'adaptation du traitement chez les patients à fort ou faible risque de rejet. La définition de ces biomarqueurs a été instaurée en 2001 par le Groupe de Travail sur les Définitions des Biomarqueurs (Biomarkers Definitions Working Group) comme une caractéristique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathologiques ou des réponses pharmacologiques aux interventions thérapeutiques (Atkinson et al., 2001).

2-1 Les biomarqueurs : intérêts et limitations

Objectif et apports potentiels du profilage transcriptomique des patients transplantés rénaux –

Le suivi des patients transplantés rénaux est réalisé en routine en clinique par la mesure des taux sanguins et urinaires de créatinémie et de protéinurie pour identifier une dysfonction du greffon, ainsi que par des biopsies rénales pour établir un diagnostic. Ce suivi permet une modulation du traitement mais ne permet pas de traiter des lésions de dysfonction chronique, de tels paramètres attestant souvent d'une altération établie et irréversible du greffon. Des paramètres plus précoces seraient ainsi utiles pour le suivi de l'état du greffon. D'autre part, un des éléments clés qui a fait le succès de la transplantation ces dernières décennies, le traitement immunosuppresseur permettant une survie à long terme du transplant, est remis en cause. La communauté de la transplantation s'attache depuis quelques années à induire une tolérance à long terme au greffon en s'affranchissant des traitements immunosuppresseurs, responsables à long terme d'infections opportunistes (Eid and Razonable, 2010), de désordres lymphoprolifératifs post-transplantation (Dantal and Souillou, 2005) et de néphrotoxicité (Nankivell et al., 2003). Pour parvenir à ce but, la caractérisation par typage pangénomique des patients présentant une tolérance spontanée ou induite peut s'avérer utile pour définir grâce à des biomarqueurs pronostiques ou diagnostiques, parmi les patients sous traitement, lesquels présentent ce profil de tolérance et seraient à même d'être candidats à des procédures de sevrage ou de diminution du traitement (Ashton-Chess et al., 2009b; Sawitzki et al., 2009). Ainsi, le but de tels biomarqueurs serait d'anticiper un rejet ou une réponse à une thérapie anti-rejet, ou de prédire une survie à long terme du transplant parmi les patients recevant un traitement immunosuppresseur minimal, permettant un suivi personnalisé du patient par rapport à son traitement (Anglicheau and Suthanthiran, 2008). Ce domaine de recherche sur les biomarqueurs est un des objectifs des consortiums Européens et Américains (IOT, Indices Of Tolerance, Riset,

Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance, ITN, Immune Tolerance Network) pour identifier les patients transplantés qui pourraient être candidats pour un arrêt des traitements immunosuppresseurs, avec le support d'études telles que le typage transcriptomique ou protéomique.

Limitations de l'outil de profilage transcriptomique –

Le typage de l'expression des gènes semble être une technique prometteuse pour l'identification de voies de signalisation biologiques impliquées dans la survie à long-terme du greffon et de biomarqueurs de cet état de stabilité. Pour cela, la technologie des puces à ADN est un outil permettant le criblage du génome entier en une expérience. La limite principale de cette technique correspond aux milliers de gènes mesurés avec seulement quelques échantillons. De nombreuses améliorations sont régulièrement proposées pour corriger les biais dus à l'analyse par puce à ADN (Malossini et al., 2006). Les principaux problèmes des analyses par puces à ADN concernent l'identification de faux positifs et la forte variation dans le nombre de gènes différentiellement exprimés selon la plateforme d'analyse, le traitement des données et les analyses statistiques utilisées (Benitez et al., 2009). Les résultats des puces à ADN doivent être confirmés avec d'autres technologies comme la PCR quantitative ou avec des outils protéiques sur des échantillons indépendants.

Choix des populations contrôles –

Depuis que les premiers cas de patients ayant une fonction stable de leur greffon sans immunosuppression ont été décrits en clinique (Roussey-Kesler et al., 2006), le problème de comparateurs adéquats est resté non résolu mais fondamental. Ce paradoxe est dû à la situation clinique de ces patients qui présentent une fonction stable du transplant mais ne reçoivent plus d'immunosuppression, un état qui, jusqu'à maintenant, n'avait pu être établi que chez les rongeurs. Les patients volontaires sains partagent avec les patients tolérants l'absence de traitement immunosuppresseur mais n'ont pas subi de transplantation. Les patients en rejet chronique ont un transplant mais sont sous immunosuppression et présentent une réponse inflammatoire contrastée; cependant, les biopsies rénales des patients opérationnellement tolérants n'étant habituellement pas disponibles, on ne peut pas exclure une forme minimale de rejet subclinique dans le greffon de ces patients. Ainsi, la comparaison des patients en rejet chronique avec les patients opérationnellement tolérants éviterait la détection de biomarqueurs potentiels de lésions de rejet subclinique. Les patients stables qui partagent la stabilité fonctionnelle du transplant avec les patients tolérants représentent probablement le meilleur contrôle mais sont sous immunosuppression. Cette cohorte de patients semble cependant être la plus cliniquement

pertinente puisque ces individus sont considérés comme les candidats pour une diminution de l'immunosuppression.

Choix du compartiment à analyser –

Une question se pose également au regard des différentes études menées dans le domaine du typage transcriptomique concernant le compartiment le plus approprié à analyser. Le standard pour évaluer le statut de la greffe est l'examen histologique de la biopsie. Le typage pangénomique des biopsies de patients en rejet a été étudié à de nombreuses reprises, afin d'ajouter une information pronostique de valeur sur l'état pathologique de la biopsie par rapport à des critères d'évaluation déjà existant comme la classification de Banff (Mengel et al., 2009), ou pour définir des sets de gènes et des biomarqueurs pronostiques ou diagnostiques de l'état de rejet (Mas et al., 2007; Mueller et al., 2007; Bunnag et al., 2009; Mengel et al., 2009). Des analyses de gènes par PCR ont souvent été réalisées sur des biopsies de patients en rejet (Suthanthiran, 1998) et le typage transcriptomique à grande échelle se développe de plus en plus pour définir des outils diagnostiques chez ces patients (Mengel et al., 2009; Einecke et al., 2010). Cependant, aucune analyse de ce type n'a été réalisée chez les patients opérationnellement tolérants. En effet, le prélèvement des biopsies est une procédure invasive, dont la portée est limitée notamment par l'échantillonnage, soumise aux erreurs de prélèvement et qui ne peut pas être facilement répétée (Thaunat et al., 2007). De plus, les patients spontanément tolérants sont souvent non-observant vis-à-vis du traitement et acceptent seulement les procédures les moins invasives pour le suivi de leur transplant. Ainsi, développer un suivi de la greffe grâce à des biomarqueurs non invasifs permettrait un meilleur suivi des patients et une intervention thérapeutique plus efficace et opportune. Plusieurs sources d'ARN sont possibles. En transplantation rénale, l'urine semble être le compartiment le plus approprié à étudier, ce compartiment étant directement en contact avec le rein greffé et le prélèvement étant non-invasif. Aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant le typage pangénomique des cellules urinaires chez les patients ayant une fonction stable du greffon sans immunosuppression, mais une étude récente de Newell et al. a présenté les résultats du profil d'expression de 18 gènes dans les cellules urinaires de patients opérationnellement tolérants comparés à des patients stables sous immunosuppression (Newell et al., 2010). Ils ont montré une augmentation significative du transcrit CD20 dans les cellules urinaires des patients tolérants par rapport aux patients stables, reflétant l'augmentation du nombre de cellules B en périphérie chez ces patients (voir partie 2-2 Etudes mises en place, page 30). Quelques études se sont intéressées au profil transcriptomique de molécules isolées telles que la perforine et le granzyme B dans les cellules urinaires de patients en rejet, ces molécules étant capables de diagnostiquer le rejet des allogreffes rénales, et notamment le rejet aigu

(Li et al., 2001; Mas et al., 2007; Manfro et al., 2008). Cependant la majorité des typages dans les urines sont de type protéomique car ce compartiment présente peu de cellules analysables pour un typage transcriptomique. Actuellement, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) constituent le compartiment le plus étudié pour le typage d'expression de gènes, en transplantation rénale comme en transplantation cardiaque ou hépatique (Horwitz et al., 2004; Brouard et al., 2007; Martinez-Llordella et al., 2007; Braud et al., 2008). Horwitz et al. ont ainsi démontré que le typage des gènes dans les PBMC corrélait avec le diagnostic histologique de rejet cellulaire aigu dans des biopsies endomyocardiques (Horwitz et al., 2004). Cependant, les PBMC ne reflètent pas toujours les mécanismes du greffon, comme il a été suggéré par l'étude d'Ashton-Chess et al. en 2009, montrant que les transcrits de granzyme B augmentent dans les biopsies de patients en rejet chronique humoral médié par les anticorps, alors qu'ils diminuent dans les PBMC comparés aux patients stables (Ashton-Chess et al., 2009a). Ces résultats n'excluent cependant pas l'utilisation des biomarqueurs du sang comme outils diagnostiques ou pronostiques, mais peuvent limiter l'interprétation mécanistique des résultats.

(Annexe 2 p.150: Danger, Racapé et al., What can we learn from the transcriptional characterization of spontaneously tolerant transplant recipients?, 2010, In Press dans *Curr. Opin. Organ. Transplant.*)

2-2 Etudes mises en place chez les patients opérationnellement tolérants

Les premiers travaux de typage transcriptomique ont été menés en 2007 par notre équipe, qui a déterminé un groupe de 49 gènes ségréant les patients opérationnellement tolérants des volontaires sains et des patients présentant des lésions de rejet chronique avec une haute spécificité et sensibilité (Brouard et al., 2007). Récemment, d'autres papiers ont fait état de typage pangénomique de patients transplantés rénaux présentant une tolérance opérationnelle. Deux de ces études ont été menées de manière collaborative entre le réseau américain ITN et le consortium européen IOT, notre équipe ayant participé à l'étude européenne. Les patients tolérants du réseau ITN (Newell et al., 2010) présentent une différence majeure avec ceux du consortium IOT (Sagoo et al., 2010). Dans l'étude de Newell et al., parmi les 25 patients tolérants choisis, seuls 5 ne présentent pas de transplant apparié pour le HLA, alors que les patients de l'étude de Sagoo et al. présentent un fort degré de disparité HLA entre donneur et receveur, comme c'est également le cas dans l'étude princeps (Brouard et al., 2007). Cette caractéristique des deux cohortes de patients, qui pourrait sembler essentielle dans la prise en compte de la réponse humorale, ne semble finalement pas avoir un impact majeur chez les patients tolérants puisque la plupart des patients de Newell et al. ne présentent pas d'anticorps anti-HLA du donneur détectables (1/20), tout comme ceux de l'étude de

Sagoo et al. (0/11). D'autres différences sont également à noter concernant les caractéristiques cliniques des patients, comme la disparité entre donneurs cadavériques (Sagoo et al., 2010) ou vivants (Newell et al., 2010), le sexe du receveur et les causes primaires de dysfonction rénale. Malgré ces différences entre les deux cohortes de patients tolérants pour chaque étude, le typage transcriptomique de ces patients a révélé dans les deux cas un enrichissement en gènes impliqués dans les voies de signalisation des cellules B par rapport aux autres cohortes de patients. Une étude récente de notre groupe en 2010 (Pallier et al., 2010) va également dans ce sens, les trois papiers montrant que ces signatures de gènes associés aux LB sont aussi corrélées à une augmentation du nombre de cellules B périphériques chez ces patients comme déjà rapporté dans une étude de notre équipe en 2006 (Louis et al., 2006). Il est intéressant de constater que parmi les différentes signatures de la tolérance, une des seules molécules communes aux différents sets de gènes définissant l'état de tolérance est la molécule CD20 (MS4A1), marqueur des cellules B surexprimé dans le sang (Brouard et al., 2007; Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010) et les urines des patients tolérants (Newell et al., 2010). Dans leur étude, Pallier et al. ont caractérisé cette population lymphocytaire B et ont montré qu'elle était principalement due à une augmentation du nombre de lymphocytes B mémoires présentant un caractère activé et à une augmentation d'une population de cellules B transitionnelles CD19⁺ CD1d⁺ CD5⁺ décrite comme une population B régulatrice chez la souris (Watanabe et al., 2010) et chez l'homme (Yanaba et al., 2008). Enfin, cette signature est associée à un profil « inhibiteur » avec l'augmentation du ratio CD32a/CD32b ou encore l'expression de molécules telle que BANK1, une molécule inhibitrice de la voie AKT dans l'activation des cellules B via CD40 (Hauer et al., 2005). Les deux autres équipes montrent également une augmentation du nombre de cellules B transitionnelles. L'équipe de Newell montre un pourcentage significativement plus élevé de ces sous-types cellulaires chez les tolérants avec une significativité par rapport aux patients stables, alors que l'équipe de Sagoo note une tendance non significative à leur augmentation chez les tolérants et une diminution concomitante des cellules B mémoires par rapport aux patients stables sous inhibiteurs de calcineurine, tendance qui devient significative en terme de rapport cellules B transitionnelles / cellules B mémoires chez les patients tolérants comparés aux patients en rejet. L'équipe de Sagoo conclut donc qu'il existe une diminution significative de la proportion de cellules B mémoires et une augmentation significative de la proportion de cellules B transitionnelles chez les patients tolérants comparés aux patients en rejet, confirmant ainsi les travaux de Newell et al. et de Pallier et al.. L'équipe de Newell montre également que le nombre de cellules B transitionnelles permet de classer correctement les patients tolérants de la cohorte d'entraînement de l'ITN et les patients tolérants de la cohorte de test IOT comme tolérant

avec une excellente sensibilité et spécificité. Les trois papiers ont également regardé la production en cytokines de ces cellules B. L'équipe de Sagoo montre que les cellules B totales des patients tolérants produisent plus de TGF β que celles des autres groupes, et qu'il n'y a pas de différence dans la production d'IL10. Ce résultat est à rapprocher de celui de Brouard et al., qui n'observaient pas d'augmentation des transcrits du TGF β chez les patients opérationnellement tolérants, mais dont les analyses montraient que le TGF β régulait plus d'un quart des gènes distinguant les patients opérationnellement tolérants par rapport à ceux identifiant les patients en rejet chronique (Brouard et al., 2007). De plus, en utilisant une analyse non-statistique basée sur l'identification de gènes leaders, ils ont confirmé le réseau de gènes modulés par le TGF β et son rôle potentiel dans la tolérance opérationnelle au niveau périphérique (Braud et al., 2008; Sivozhelezov et al., 2008). L'équipe de Newell trouve quant à elle une augmentation significative d'expression de l'IL10 par les cellules B transitionnelles des patients tolérants comparés aux autres groupes, et pas de différence dans l'expression du TGF β . Cette différence de résultats peut s'expliquer par les différentes données cliniques des patients, ou bien d'un point de vue technique; l'équipe de Sagoo étudie la sécrétion cytokinique de B totaux, alors que l'équipe de Newell étudie la sécrétion de sous-types cellulaires précis. L'équipe de Newell a étudié une sous-population précise afin de conserver un phénotype de surface permettant l'identification du sous-type sécrétoire. Cette sélection cellulaire d'une petite population résulte en une sécrétion très faible, le résultat étant à interpréter avec prudence, comme mentionné par les auteurs. Cependant cette même tendance est rapportée par Pallier et al. sur sang total.

Ces études transcriptomiques démontrent que les patients opérationnellement tolérants sans immunosuppression exhibent des profils de gènes périphériques différents comparés aux patients en rejet chronique, stables ou même aux volontaires sains pour certains marqueurs. Ces résultats encouragent les études permettant l'identification de biomarqueurs du sang pour détecter les patients stables dont les traitements pourraient être arrêtés, ou ceux nécessitant une maintenance du traitement. Dans le but de créer un score composite diagnostique ou prédictif de la tolérance opérationnelle, l'association avec des paramètres cliniques (Foucher et al., 2010, In Press) et l'utilisation de biomarqueurs de patients « non tolérants » tels que ceux des rejets aigu et chronique devraient être inclus (Anglicheau and Suthanthiran, 2008). En effet, la création d'un score composite, basé sur les biomarqueurs transcriptomiques potentiels de la tolérance opérationnelle et les paramètres cliniques comme le temps post-transplantation tel que mentionné par Benitez et al. (Benitez et al., 2009) mais aussi les paramètres prédisant le devenir du greffon comme la créatinémie à 6 mois ou le nombre d'épisodes de rejet aigu dans la première année (Danger et al., 2008) semble

une voie prometteuse. La limite majeure de ces études transcriptomiques est le petit nombre de patients qui restreint le pouvoir statistique des analyses et augmente le risque d'observation d'un évènement isolé et/ou non significatif. Ainsi, la constitution de plus grandes cohortes de patients pour identifier et valider les biomarqueurs moléculaires est nécessaire et ne pourra être obtenue que grâce à la collaboration de grands consortiums.

3- SMILE/TMTC3 : TransMembrane and Tetratricopeptide repeat Containing 3

3-1 Les protéines à répétitions tetratricopeptides : des protéines conservées et ubiquitaires

La protéine SMILE est une protéine appartenant à la famille des protéines à répétitions tetratricopeptides ou TPR (Tetratricopeptide Repeat). Le TPR est un motif dégénéré de 34 acides aminés très conservé dans l'évolution et dans les organismes (Grbavec et al., 1999), et découvert dans de nombreux compartiments subcellulaires tels que le noyau (Yu et al., 2007; Crevel et al., 2008; Galigniana et al., 2010), la mitochondrie (Serasinghe et al., 2010), le réticulum endoplasmique (RE) (Nakagawa et al., 2007) et le cytoplasme (Hwang et al., 2005). Les protéines à TPR sont impliquées dans de nombreuses fonctions comme le contrôle du cycle cellulaire (Crevel et al., 2008), la répression de la transcription (Grbavec et al., 1999), la réponse au stress (Yan et al., 2002; Hwang et al., 2005), l'inhibition de protéines kinases (Yan et al., 2002), le transport de protéines peroxisomales (Stanley et al., 2006) et mitochondriales (Wu and Sha, 2006), le développement (Ohno et al., 2002) et la neurogenèse (Rachidi et al., 2000). Huit acides aminés consensus ont une fréquence plus importante que les autres dans la séquence TPR, générant des consensus en position 4 (W/L/F), 7 (L/I/M), 8 (G/A/S), 11 (Y/L/F), 20 (A/S/E), 24 (F/Y/L), 27 (A/S/L), et 32 (P/K/E) (Sikorski et al., 1990). Sur la base de prédictions de structures secondaires, le motif TPR forme deux domaines A et B en hélices alpha; le premier domaine s'étend sur les résidus consensus 4, 7, 8, 10 et 11, et le deuxième domaine sur les résidus consensus 20, 24 et 27. Dans l'exemple de la PP5 (Protein Phosphatase 5, 3 domaines TPR) (Das et al., 1998), chaque motif TPR est structurellement identique et composé d'une paire d'hélices alpha anti-parallèles (Figure 1A p.37, A orange et B bleue). Chaque motif TPR est arrangé de manière parallèle de façon à ce que les hélices alpha séquentiellement adjacentes soient anti-parallèles (Figure 1A). Dans une répétition en tandem de motifs TPR, l'emballage des hélices dans et entre des motifs TPR adjacents est identique de manière à ce que chaque hélice alpha soit entourée de deux hélices alpha immédiatement voisines. Cette répétition régulière d'hélices alpha est liée par un angle de 24° générant une conformation en hélice droite qui crée un canal amphipathique (Figure 1B). La surface du canal est principalement formée par les chaînes latérales des acides aminés de l'hélice A de chaque motif TPR, et le côté opposé du canal est formé par les

acides aminés des hélices A et B. Il a également été proposé que l'intérieur du sillon hélicoïdal (canal amphipathique) était formé par l'hélice A de chaque motif TPR, et que l'hélice B était localisée sur la surface extérieure du sillon (Figure 1B) (Das et al., 1998). La structure des motifs TPR de la PP5 fournit une explication pour les petits et les gros résidus hydrophobiques de la séquence consensus des TPR (Das et al., 1998). Ces résidus consensus apparaissent être importants pour l'intégrité structurale du domaine TPR. Les petits résidus hydrophobiques 8, 20 et 27 sont localisés en position de contact proche entre les hélices alpha A et B du motif TPR. Les gros résidus hydrophobiques, comme celui en position 24, forment l'interface entre des hélices adjacentes (Figure 1C, D). Cinq à six motifs TPR peuvent accommoder les hélices alpha d'une protéine cible. Les résidus consensus dans les 34 acides aminés définissant le motif TPR sont conservés en termes de taille, d'hydrophobicité et d'espacement, mais la conservation de séquence en dehors de ces 8 acides aminés n'est retrouvée que lorsque des motifs TPR fonctionnellement équivalents sont comparés, ce qui suggère une spécialisation fonctionnelle des motifs TPR (Blatch and Lassle, 1999). Ainsi, la diversité de séquence importante observée dans les TPR correspond à la diversité de fonction des protéines à TPR. La comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine SMILE avec le génome humain entier n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque homologie de séquence avec une autre protéine, ce qui ne nous permet pas de rapprocher SMILE d'une famille de protéines et/ou d'une fonction particulière.

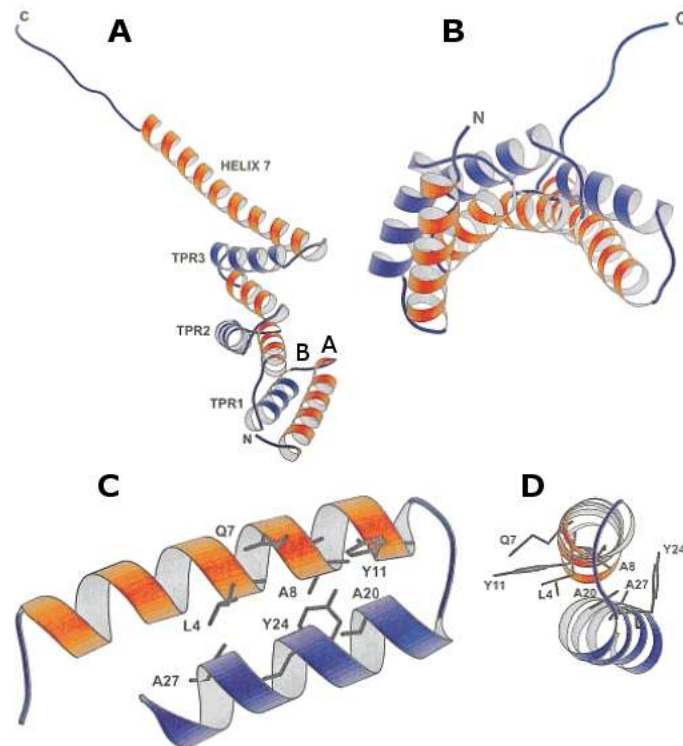


Figure 1 : Représentation des hélices du domaine TPR de la PP5.

(A) Vue perpendiculaire de l'axe hélicoïdal du domaine TPR pour illustrer l'emballage anti-parallèle des hélices adjacentes A et B.

(B) Vue parallèle de l'axe hélicoïdal du domaine TPR pour illustrer que la surface du sillon hélicoïdal est formée par l'hélice A de chaque motif TPR.

(C) Vue de côté (C) et bout-à-bout du 1^{er} motif TPR pour illustrer le rôle des résidus TPR hautement conservés dans l'emballage inter-hélice. Les résidus sont notés en utilisant le code à une lettre et la numérotation se réfère à la numérotation des motifs TPR consensus.

N, N-terminal ; C, C-terminal

Adapté de Blatch and Lässle, 1999, BioEssays

3-2 Structure de SMILE

Chez l'homme, SMILE est un gène de 57592 paires de bases (NG_021187) localisé sur le chromosome 12, codant pour un ARNm de 7203 paires de bases (NM_181783) et pour une protéine de 914 acides aminés (NP_861448). Cette protéine présente 9 domaines transmembranaires, et sa particularité réside dans sa séquence intracellulaire composée de 10 domaines à répétition tétratricopeptide (Figures 2 et 3 p.38-39). Cependant, suivant le site internet et la méthode de modélisation utilisés, le nombre de domaines transmembranaires peut varier de 9 (Figure 2 p.38) à 11 (Figure 5 et 6 p.40-41) (Tusnady and Simon, 2001) et le nombre de répétitions tétratricopeptides de 4 (Figure 4 p.39) à 10 (Figure 2 p.38).

Regions					
Transmembrane	9 – 29	21	Helical;	Potential	
Transmembrane	94 – 114	21	Helical;	Potential	
Transmembrane	136 – 158	23	Helical;	Potential	
Transmembrane	167 – 187	21	Helical;	Potential	
Transmembrane	194 – 214	21	Helical;	Potential	
Transmembrane	232 – 252	21	Helical;	Potential	
Transmembrane	318 – 338	21	Helical;	Potential	
Transmembrane	354 – 374	21	Helical;	Potential	
Transmembrane	377 – 397	21	Helical;	Potential	
Repeat	412 – 445	34	TPR 1		
Repeat	446 – 479	34	TPR 2		
Repeat	481 – 513	33	TPR 3		
Repeat	528 – 562	35	TPR 4		
Repeat	563 – 596	34	TPR 5		
Repeat	597 – 631	35	TPR 6		
Repeat	669 – 702	34	TPR 7		
Repeat	704 – 736	33	TPR 8		
Repeat	737 – 771	35	TPR 9		
Repeat	773 – 805	33	TPR 10		
Amino acid modifications					
Modified residue	503	1	Phosphotyrosine	Ref 5	
Glycosylation	117	1	N-linked (GlcNAc...)	Potential	
Glycosylation	494	1	N-linked (GlcNAc...)	Potential	

Figure 2 : Prédiction des caractéristiques de la séquence de SMILE.

Source : site internet de modélisation Uniprot, UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6ZXV5>)

Prédiction à partir de la séquence en acides aminés Q6ZXV5 de TMTC3. Ce type de modèle prédit 9 domaines transmembranaires et 10 domaines TPR

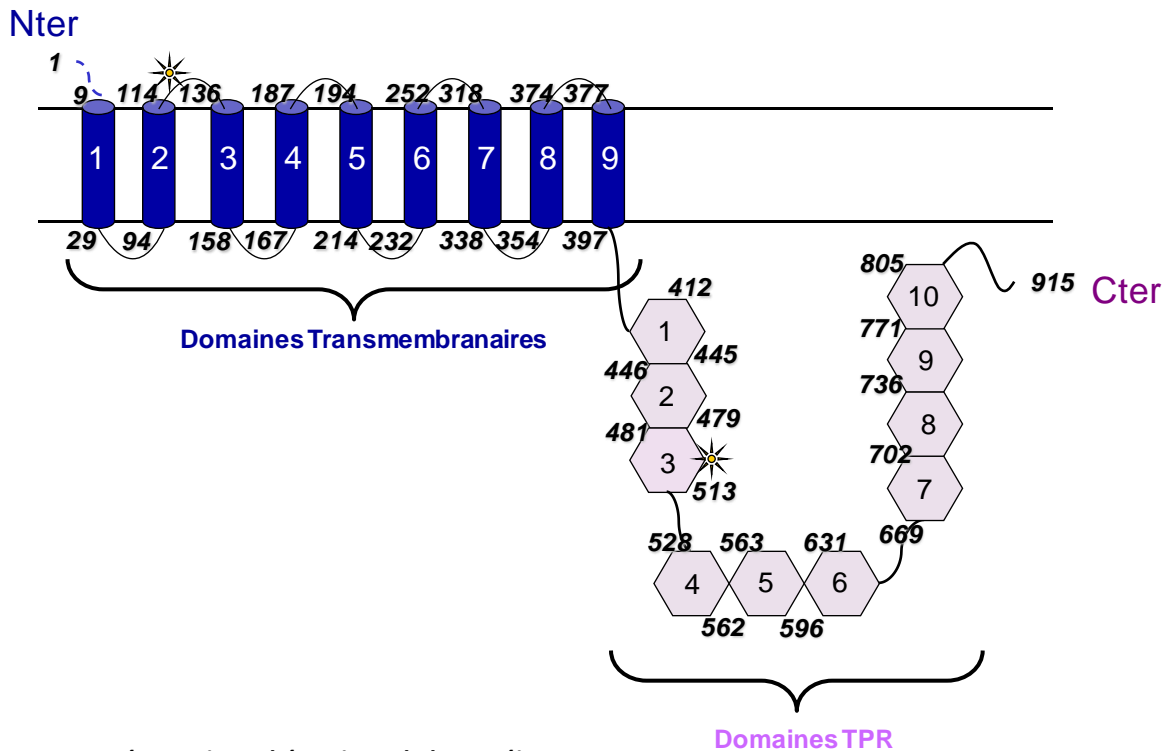


Figure 3 : Représentation schématique de la protéine SMILE.

Source : site internet de modélisation Uniprot, UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6ZXV5>)

Prediction à partir des caractéristiques de la séquence en acides aminés Q6ZXV5 de SMILE (voir Figure 2).

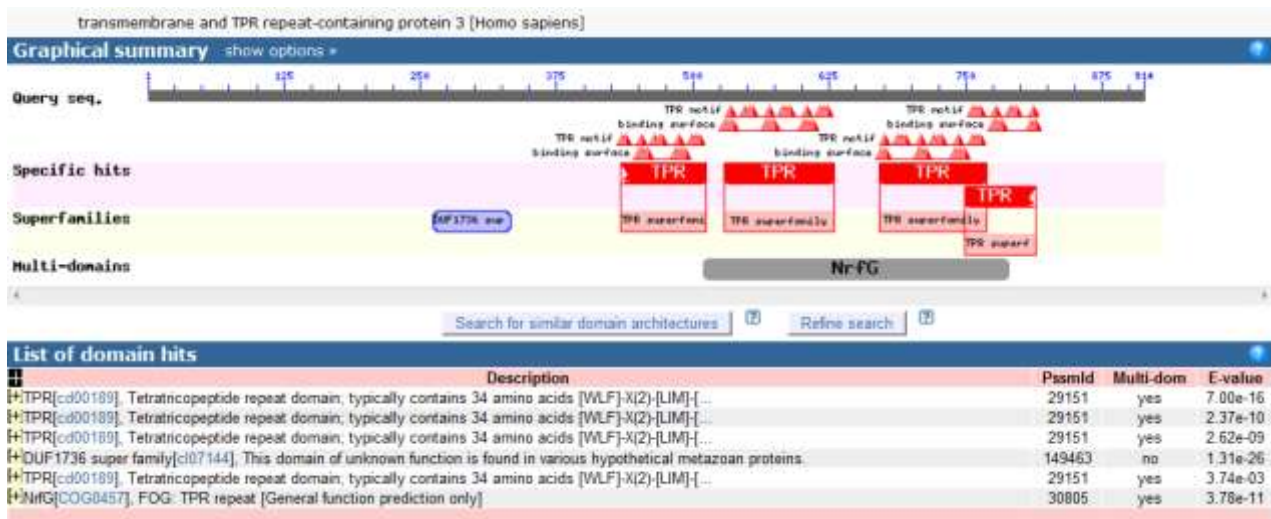


Figure 4 : Prédiction des domaines conservés de SMILE.

Source : Site internet NCBI conserved domains.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP_861448.2)

Modélisation des domaines TPR de SMILE à partir de la séquence en acides aminés NP_861448.2 de SMILE. Ce type de modèle prédit 4 domaines TPR.

```

Protein: SMILE
Length: 914
N-terminus: IN
Number of transmembrane helices: 11
Transmembrane helices: 9-26 93-110 139-156 167-184 195-212 235-252
                        281-298 321-338 349-366 377-394 405-422
Total entropy of the model: 17.0242
Entropy of the best path: 17.0251

The best path:

seq  MANINLKEIT LIVGVVTACY WNSLFCGFVF DDVSAILDNK DLHPSTPLKT 50
pred  IiiiiiiiHH HHHHHHHHHH HHHHHHoooo oooooooooo oooooooooo

seq  LFQNDFWGTP MSEERSHKSY RPLTVLTFRL NYLLSELKPM SYHLLNMIFH 100
pred  oooooooooo oooooooooo oooooooooo oooooooooo ooHHHHHHHH

seq  AVSVVIFLKV CKLFLDNKSS VIASLLFAVH PIHTEAVTGV VGRAELLSSI 150
pred  HHHHHHHHHH iiiiiiiiii iiiiiiiiii iiiiiiiiiH HHHHHHHHHH

seq  FFLAAFLSYT RSKGPDNSII WPIALTVFL VAVATLCKEQ GITVVGICCV 200
pred  HHHHHHoooo ooooooHHHH HHHHHHHHHH HHHHiiiiii iiiHHHHHHH

seq  YEVFIAQGYT LPLLCTTAGQ FLRGKGSIPF SMLQTLVKLI VLMFSTLLL 250
pred  HHHHHHHHHH HHoooooooo oooooooooo oooHHHHHHH HHHHHHHHHH

seq  VIRVQVIQSQ LPVFTRFDNP AAVSPTPTRQ LTFNYLLPVN AWLLLNPSEL 300
pred  HHiiiiiii iiiiiiiiii iiiiiiiiii HHHHHHHHHH HHHHHHHHoo

seq  CCDWTMG TIP LIESLLDIRN LATFTFFCF L GMLGVFSIRY SGDSSKTVLM 350
pred  oooooooooo oooooooooo HHHHHHHHHH HHHHHHHHi iiiiiiiiiH

seq  ALCLMALPFI PASNLFFPVG FVVAERVLYV PSMGFCILVA HGWQKISTKS 400
pred  HHHHHHHHHH HHHHHHoooo ooooooHHHH HHHHHHHHHH HHHHiiiiii

seq  VFKKLSWICL SMVILTHSLK TFHRNWDWES EYTLFMSALK VNKNNAKLWN 450
pred  iiiHHHHHH HHHHHHHHHH HHoooooooo oooooooooo oooooooooo

seq  NVGHALENEK NFERALKYFL QATHVQPDDI GAHMNVGRY KNLNRTKEAE 500
pred  oooooooooo oooooooooo oooooooooo oooooooooo oooooooooo

```

Figure 5 : Extrait de la séquence de prédiction des hélices transmembranaires de SMILE.

Source : Site internet de prédiction des hélices transmembranaires et de la topologie des protéines HMMTOP.

(http://www.enzim.hu/hmmtop/html/adv_submit.html)

Prédiction à partir de la séquence en acides aminés NP_861448.2 de SMILE (i = inside, o = outside, H = helix). Ce type de modèle prédit 11 domaines transmembranaires.

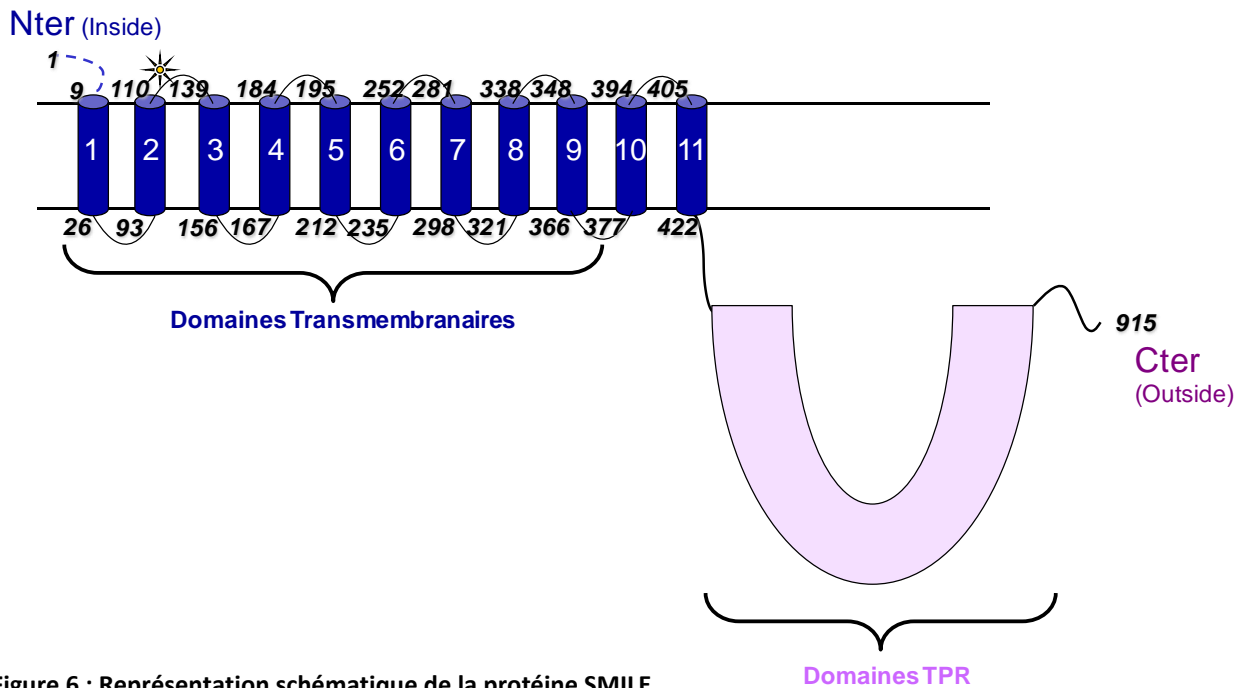


Figure 6 : Représentation schématique de la protéine SMILE.

Source : Site internet de prédiction des hélices transmembranaires et de la topologie des protéines HMMTOP.
(http://www.enzim.hu/hmmtop/html/adv_submit.html)

Prédiction à partir de la séquence en acides aminés NP_861448.2 de SMILE (Voir Figure 5).

3-3 La découverte de SMILE

3-3-1 « Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance » *Brouard et al. (PNAS 2007)*

En 2007, notre équipe, en collaboration avec l'Université de Stanford, réalise des puces à ADN à partir de différents groupes de patients transplantés rénaux sur un nombre total de 75 patients transplantés et 16 patients contrôles (Brouard et al., 2007). Les ARNm des PBMC du sang périphérique de volontaires sains, de patients opérationnellement tolérants, de patients stables sous immunosuppression et de patients en rejet chronique sont passés sur puces à ADN afin de déterminer une signature de la tolérance opérationnelle. Les analyses statistiques définissent un set de 49 gènes associés à l'état de tolérance opérationnelle permettant de classer les différents groupes de patients selon leur profil clinique. Parmi ces 49 gènes, 33 sont confirmés par RT-PCR, et parmi ces 33 gènes, SMILE (TMTC3) est une molécule de fonction inconnue surexprimée dans le sang des patients opérationnellement tolérants (Annexe 3 p.157 : Brouard et al., Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance, 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*)

3-3-2 « Etude de deux nouvelles protéines impliquées dans la différenciation odontoblastique » Carrouel et al. (Les Cahiers de l'ADF, 2006)

La protéine SMILE a été découverte par l'équipe de Françoise Bleicher (UFR Médecine Odontologie UMR 5242 – IGFL, Lyon) comme une protéine impliquée dans la différenciation odontoblastique (Carrouel et al., 2006, *Les Cahiers de l'ADF*). A partir de cellules précurseurs pulpaire humaines (permettant la différenciation en cellules odontoblastiques) et d'odontoblastes, cette équipe a réalisé une banque d'ADNc par PCR d'hybridation soustractive suppressive enrichie en ADNc d'odontoblastes. Cette équipe a montré que SMILE était surexprimé dans les odontoblastes, et localisé de manière intracellulaire dans la couche odontoblastique, les nerfs et les vaisseaux. Cette équipe suggère également que la protéine SMILE est clivée après interaction des domaines TPR avec d'autres protéines du cytoplasme, résultant en une forme d'environ 60 kDa correspondant aux domaines TPR de la molécule.

4- La réponse au stress du réticulum endoplasmique

L'implication du stress du réticulum endoplasmique (RE) en transplantation d'organes est peu documentée, mais cette réponse cellulaire adaptative est retrouvée dans le contexte de plusieurs maladies rénales et pourrait avoir de multiples conséquences biologiques telles que l'induction de lésions au niveau de l'allogreffe. L'étude *in vitro* de la molécule SMILE a révélé que celle-ci était impliquée dans les réponses au stress du RE. L'absence de SMILE sensibilise les cellules à un stress du RE et augmente l'expression d'une molécule de la voie de réponse aux protéines mal repliées (voie UPR, Unfolded Protein Response), XBP1 (Article 2 page 78 : Racapé et al., Deciphering the Role of SMILE, Over-Expressed in the Blood of Operationally Tolerant Kidney Recipients, 2010, En soumission dans *PLoS ONE*).

4-1 Le stress du RE en immunologie et en transplantation

Le stress du RE est impliqué dans de nombreuses réponses cellulaires et a été reconnu dans la physiopathologie de nombreuses maladies, notamment dans les désordres neurodégénératifs (Parkinson, Alzheimer), le diabète, l'obésité, certains cancers, des désordres immunologiques, l'athérosclérose ou les ischémie-reperfusions cardiaques et cérébrales (Tableau 2 p.43) (Kim et al., 2008). La plupart de ces maladies prennent leur origine dans le RE, où toute une machinerie est mise en place pour assurer la synthèse, la modification et la délivrance correcte de protéines biologiquement actives à leur site dans la cellule et dans le milieu extracellulaire.

Tableau 2 : Maladies liées au stress du RE.Source : Kim et al., 2008, *Nat. Rev. Drug. Discov.*

Disease	Role of ER stress	Target protein*	Refs
Alzheimer's disease (AD)	<ul style="list-style-type: none"> Exact implications of ER stress in AD is unclear (AD brains show increase of protective UPR proteins) AD-associated mutant Presenilin 1 induces ER stress response with suppression of protective UPR signalling 	Presenilin, PERK-EIF2 α .	89-93
Parkinson's disease (PD)	<ul style="list-style-type: none"> Unclear whether ER stress in PD is mainly protective or contributory to disease Parkin suppresses ER-stress-induced cell death Parkin expression is controlled by ER stress Parkin mutants associated with PD 	Parkin, α -synuclein and others	94-98
Amyotrophic lateral sclerosis	<ul style="list-style-type: none"> Mutant SOD interferes with ER-assisted degradation machinery and activates ASK1 	SOD, ASK1	100
Polyglutamine disease	<ul style="list-style-type: none"> Polyglutamine induces the UPR and suppresses proteasomal activity 	Huntingtin [§] , SCA [§] , androgen receptor [¶]	101,102
Prion disease	<ul style="list-style-type: none"> Brains affected with prions show induction of ER chaperones, implying protective UPR against ER stress 	Prion protein	109-111
Stroke	<ul style="list-style-type: none"> Ischaemia induces ER stress in neurons, activates the UPR and finally leads to neuronal apoptosis associated with CHOP induction and ASK1 activation 	PERK-EIF2 α , ASK1	131-137
Bipolar disease	<ul style="list-style-type: none"> Medications for treating bipolar disease induce the UPR 	XBP1 polymorphisms (controversial)	152-154
Heart disease	<ul style="list-style-type: none"> Induction of ER stress by ischaemia in the heart leads to degeneration of cardiac myocytes Transaortic constriction induces expression of ER stress Myocardial infarction induces the UPR 	ASK1	158-163
Atherosclerosis	<ul style="list-style-type: none"> Oxidized lipids and homocysteins induce ER stress in vascular cells, cholesterol in macrophages 	IRE1 pathway	173-176
Type 1 diabetes	<ul style="list-style-type: none"> Impaired PERK pathway is responsible for type 1 diabetes (Wolcott-Rallison syndrome) 	PERK-EIF2 α .	46, 177-183
Type 2 diabetes	<ul style="list-style-type: none"> Obesity (a cause of type 2 diabetes) induces ER stress, leading to insulin resistance 	XBP1, JNK	10
Type 2 diabetes	<ul style="list-style-type: none"> Fatty acids (palmitate) induce apoptosis of β cells 	CHOP	186
Cancer	<ul style="list-style-type: none"> Protective UPR proteins are upregulated in cancer cells subjected to hypoxic environments 	GRP78, XBP1, PERK	187-191
Autoimmune disease	<ul style="list-style-type: none"> ER protein overload may contribute to autoantigen production GRP78 can be an autoantigen 	GRP78, HLA-B27 and others	22,207,208

*Agonists or antagonists of target desired, depending on context. [§]For Huntington's disease. [¶]For spinocerebellar ataxia. ^{¶¶}For spinobulbar muscular atrophy. ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1 (also known as MAP3K5); CHOP, C/EBP-homologous protein (also known as DDIT3); EIF2 α , eukaryotic translation initiation factor 2 α ; ER, endoplasmic reticulum; IRE1, inositol-requiring kinase 1 (also known as ERN1); JNK, Jun N-terminal kinase; PERK, PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (also known as EIF2AK3); SOD, superoxide dismutase 1; UPR, unfolded protein response; XBP1, X-box-binding protein 1.

De plus, de nombreuses preuves indiquent que le stress du RE contribue aux dommages glomérulaires (Liu et al., 2001; Cybulsky, 2002; Bek et al., 2006; Nakajo et al., 2007; Inagi et al., 2008) et tubulaires (Zinsner et al., 1998; Kimura et al., 2008; Kitamura, 2008; Lindenmeyer et al., 2008) chez les patients atteints de maladies aiguës et chroniques des reins (Dickhout and Krepinsky, 2009). Le parenchyme rénal est la cible de nombreuses agressions chimiques et physiques qui activent des réponses au stress dans tous les types cellulaires. La réponse UPR a été impliquée dans cette réponse en protégeant les cellules contre l'agression, mais peut également être un médiateur de la mort

cellulaire. Le stress du RE a été décrit dans plusieurs situations pathologiques rénales (Tableau 3) et commence à émerger comme un acteur de la perte de structure et de fonction du greffon dans les transplantations d'organes solides et notamment de reins (Pallet et al., 2009b).

Tableau 3 : Contribution pathogénique du stress du RE dans les maladies rénales.

Source : Inagi et al., 2009, *Nephron. Exp. Nephrol.*

Sites	ER stress states
Podocyte	Passive Heymann nephritis Puromycin nephrosis Mislocalization of slit diaphragm components (mutation of nephrin) Megsin overexpression Advanced glycated BSA
Mesangium	Thy-1 nephritis
Tubular epithelium	Puromycin nephropathy Chronic BSA-overload nephropathy Ischemia-reperfusion Established diabetic nephropathy Minimal-change disease Nephrotoxic drugs (antibiotics, immunosuppressants, and anticancer drugs)

4-1-1 Le stress du RE dans l'immunité et l'inflammation

Cellules B –

La réponse aux protéines mal repliées a été reconnue comme jouant un rôle dans le système immunitaire dans un premier temps au niveau de la lymphopoïèse des cellules B. Etant donné leur activité sécrétoire importante, les cellules plasmocytaires produisant des immunoglobulines sont particulièrement dépendantes de la signalisation UPR. Les souris chimérique $Xbp1^{-/-}$ se développent normalement, avec un nombre normal de cellules B et T, des niveaux normaux de B220, IgM ou IgD et des réponses prolifératives normales à l'anticorps anti-CD40 et à l'IL4 ou au LPS. Cependant les cellules B de ces souris ne présentent pas le marqueur CD138 des cellules plasmocytaires, ont une diminution générale des différents isotypes d'immunoglobulines et ne sont pas capables de générer des réponses anticorps correctes contre des antigènes dépendants ou indépendants des cellules T (Reimold et al., 2001). Dans les cellules B normales, la stimulation au LPS ou à l'anti-CD40/IL4 induit

l'expression et l'épissage de l'ARNm XBP1, un processus coordonné à l'accumulation de chaînes lourdes d'immunoglobulines dans le RE de la cellule se développant en cellule sécrétrice d'anticorps. De plus, les gènes cibles de la réponse UPR comme BiP et GRP94 sont induits par les cellules B stimulées au LPS (Gass et al., 2002; Iwakoshi et al., 2003). En outre, les cellules B déficientes en IRE1 α (Inositol Requiring Kinase 1 alpha, un des trois acteurs précoces de la réponse UPR) sont incapables de progresser au-delà du stade cellule pro-B (Zhang et al., 2005), et le clivage d'ATF6 (Activating Transcription Factor 6, un autre des trois acteurs précoces de la réponse UPR) intervient dans les cellules B stimulées (Gass et al., 2002), suggérant des contributions des différents bras de la réponse UPR au développement des cellules B. Une opportunité thérapeutique pour exploiter cette dépendance de la voie UPR réside dans l'utilisation de l'inhibiteur du protéasome Bortezomib[®], qui élimine les cellules plasmocytaires en déclenchant le stress du RE (comme pour le myélome multiple). Dans les modèles murins de maladies autoimmunes, le Bortezomib[®] prolonge la survie, réduit les niveaux d'auto-anticorps et protège contre les maladies autoimmunitaires du rein. Cette stratégie commence à être testée chez les patients subissant un rejet dépendant des anticorps afin de diminuer la quantité de cellules B plasmocytaires et donc la production d'anticorps spécifiques du donneur (Perry et al., 2009; Walsh et al., 2010). Il existe également un lien entre la façon dont un antigène est traité dans un lymphocyte B (ciblé vers la voie de sécrétion, vers le compartiment cytosolique ou retenu dans le RE), le déclenchement d'une réponse de stress, la réponse cytokinique fournie par la cellule présentatrice d'antigènes (CPA) et la qualité de la réponse T engendrée par l'activation de la CPA. Wheeler et al. ont montré que la rétention de l'antigène dans le RE du lymphocyte B augmente l'expression de gènes de réponse au stress, l'activation transcriptionnelle des cytokines IL23p19, IL6, TNF α et IL2 et la diminution d'OX40L, important pour la génération de cellules T mémoires. La sécrétion d'IL23p19 en réponse au stress est même retrouvée pour différentes CPA, telles que les cellules dendritiques (CD) et les macrophages, et l'équipe a montré que cet environnement cytokinique, en réponse au stress, influençait la réponse des cellules T CD4⁺ qui produisaient alors de plus grandes quantités de TNF α et d'IFN γ (Wheeler et al., 2008). Cette observation est en accord avec un rôle central émergent du stress du RE dans la régulation du microenvironnement immun, car des cytokines telles que le TNF α peuvent soutenir une réponse UPR (Xue et al., 2005).

Cellules Dendritiques –

Comme les cellules plasmocytaires, les CD sont dépendantes de la voie UPR pour leur survie in vivo, sans doute à cause de leur production considérable de peptides pour la présentation antigénique et la sécrétion de cytokines. Les souris chimériques Xbp1^{-/-} sont déficientes en CD conventionnelles et

plasmacytoïdes (diminutions respectives de 50% et 75%), et celles qui sont présentes ont une survie moindre après stimulation par les ligands TLR (Iwakoshi et al., 2007). De plus, l'axe IRE1 est activé de manière constitutive dans les CD en conditions physiologiques normales (détection de transcripts XBP1 épissés), comme pour les cellules plasmocytaires (Iwakoshi et al., 2007). Ainsi, les agents pharmacologiques induisant plus de stress dans le RE pourrait réduire la fonction des CD, ce qui pourrait être avantageux ou désavantageux selon les circonstances. Certaines bactéries ont développé des mécanismes exploitant la dépendance des cellules immunitaires vis-à-vis de l'UPR. Par exemple, les toxines AB₅ –qui incluent les toxines *Shigella*, cholera et *Pertussis* – et la cytotoxine subtilase clivent BiP, qui stimule la mort cellulaire induite par le stress.

Cellules endothéliales –

Une publication a montré que le processus d'ischémie-reperfusion après transplantation hépatique induisait l'activation d'IRE1 et PERK (le 3^e acteur précoce de la réponse UPR), l'activation de PERK principalement au niveau des cellules endothéliales sinusoidales du greffon (Emadali et al., 2005), les cellules endothéliales étant l'interface principale entre le greffon et l'hôte. Ces cellules endothéliales sont sensibles au traitement par la cyclosporine qui induit des changements phénotypiques au niveau de la cellule, changements qui semblent en partie dépendants du stress du RE (Bouvier et al., 2009). Le stress du RE et la réponse UPR ont également été déterminés comme des régulateurs importants des gènes de l'inflammation dans les cellules endothéliales d'aires de lésions athérosclérotiques. Le traitement des cellules endothéliales à la 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-glycero-phosphorylcholine oxydée (oxPAPC), qui s'accumule dans les lésions athérosclérotiques, entraîne l'augmentation des transcrits XBP1 et ATF4 (signalisation en aval de PERK) de la voie UPR, qui sont eux-même responsables de l'induction d'IL6, d'IL8, de MCP1 et également de CXCL3 pour XBP1. Les phospholipides oxydés induisent un stress oxydatif qui déclenche la réponse UPR. De plus en plus d'études montrent que le stress du RE, le stress oxydatif et la réponse inflammatoire sont liés et que la modulation d'une des voies affecte les autres (Zhang and Kaufman, 2008; Inagi, 2010). Ces résultats suggèrent fortement que les cellules endothéliales pourraient être un vecteur de la réponse au stress du RE en transplantation.

Le stress du RE et la fonction cellulaire au niveau immunitaire –

Le stress du RE a également des conséquences sur la structure et la fonction de certaines cellules. Ainsi, le stress du RE a été associé *in vitro* au dépôt de hyaluronan sur des cellules musculaires lisses et à l'adhésion des leucocytes à ces cellules (Majors et al., 2003). Cette approche, répétée *in vivo* sur des tissus de souris et chez l'homme, a confirmé le dépôt de hyaluronan dans les tissus stressés et inflammés (Majors et al., 2003). Une autre étude a montré que la calpaïne des cellules endothéliales,

une protéase activée par le calcium et impliquée notamment dans la réponse au stress du RE (Muruganandan and Cribb, 2006), était requise pour une transmigration endothéliale efficace des lymphocytes périphériques du sang (Hussain et al., 2005). L'inhibition de la calpaine empêche les lymphocytes ayant rejoint les jonctions cellulaires inter-endothéliales d'étendre leurs pseudopodes entre et en dessous les cellules endothéliales (Hussain et al., 2005). Ces résultats suggèrent fortement que lors d'un stress déclenché par exemple par une ischémie-reperfusion pendant une transplantation rénale, l'activation de la calpaine dans les cellules endothéliales du greffon pourrait augmenter la transmigration endothéliale et l'infiltration lymphocytaire au niveau du greffon. De manière plus générale, le déclenchement d'un stress du RE au niveau du greffon pourrait être en partie à l'origine d'une infiltration lymphocytaire (par exemple par activation de la calpaine) et potentiellement de la destruction du greffon à long-terme.

Voies de signalisation qui connectent le stress du RE à l'inflammation –

Les voies de signalisation de la réponse UPR et de l'inflammation sont interconnectées par des mécanismes variés, notamment les signalisations NF- κ B et JNK mais aussi via le relargage du calcium du RE et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) (Inagi, 2010). La réponse UPR peut directement induire l'activation de NF- κ B via une atténuation de la traduction protéique médiée par PERK/EIF2 α , qui augmente le ratio NF- κ B/I κ B (I κ B ayant une demi-vie plus courte que NF- κ B), libérant NF- κ B qui peut alors être transloqué vers le noyau en réponse au stress du RE (Deng et al., 2004) (Figure 7 p.48). IRE1 α est important pour intégrer les signaux de stress du RE avec la signalisation de la réponse inflammatoire. Le complexe IRE1 α /TRAF2, formé en réponse à un stress du RE, peut recruter I κ K, conduisant à la dégradation d'I κ B et à la translocation de NF- κ B vers le noyau (Hu et al., 2006). Ceci a été étudié dans des expériences montrant que les dominants négatifs d'IRE1 et de TRAF2 peuvent inhiber l'activation d'NF- κ B (Leonardi et al., 2002; Kaneko et al., 2003). Ce complexe IRE1 α /TRAF2 peut aussi recruter la protéine kinase JNK, qui devient activée et induit l'expression de gènes inflammatoires via la phosphorylation de la protéine AP1 (Davis, 2000) (Figure 7 p.48). Il a également été démontré que l'activation de NF- κ B pouvait dépendre de la charge en protéines mal repliées du RE (par exemple pendant une infection virale). Cette activation semble résulter d'une production de ROS due au repliement protéique excessif (Tu and Weissman, 2004) et/ou d'un relargage du calcium vers le cytosol médié par le stress du RE, qui conduit également à la production de ROS par la mitochondrie (Gorlach et al., 2006). De plus, en activant la signalisation NF- κ B, le stress du RE peut induire un milieu pro-inflammatoire, augmentant ainsi l'immunogénicité de la greffe (Figure 7 p.48).

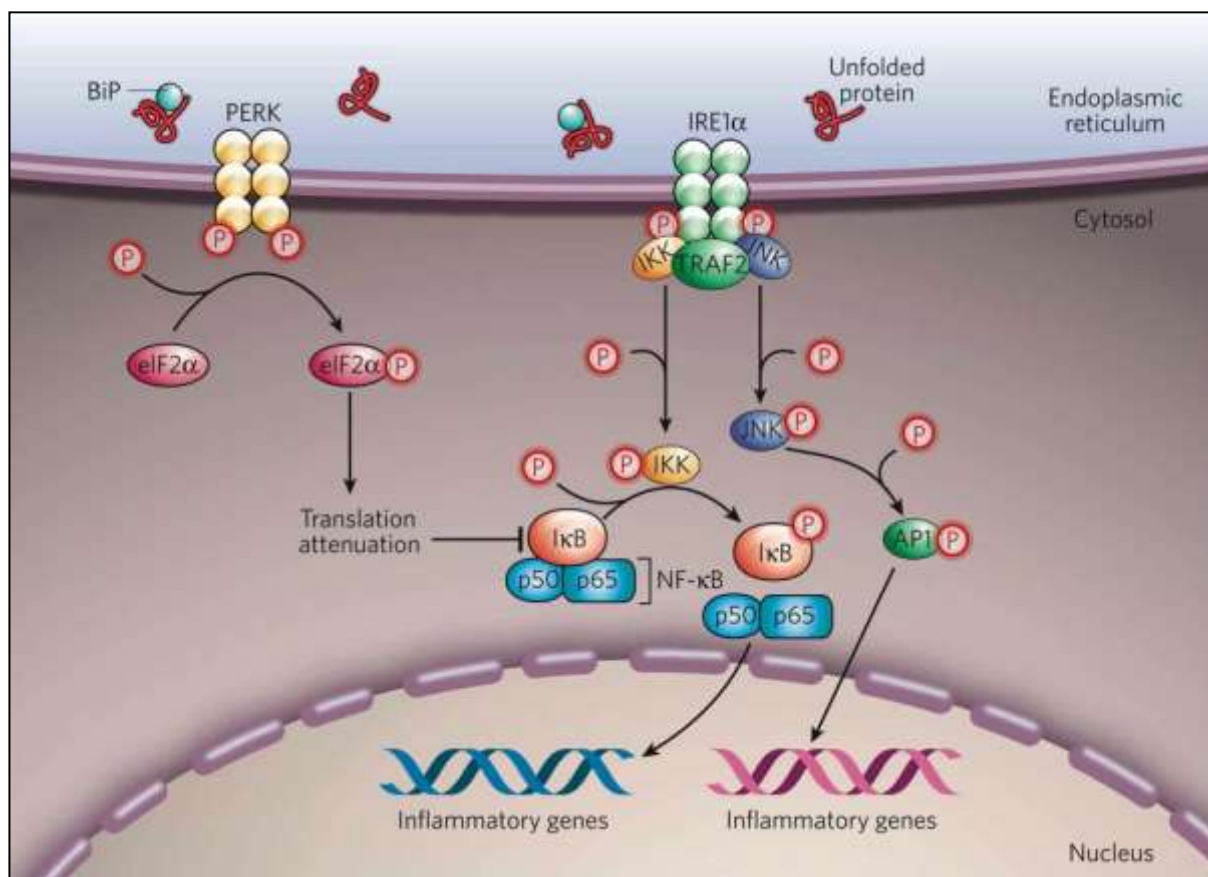


Figure 7 : Modèle d'activation de NF-κB et JNK par la voie UPR.

PERK induit une répression générale de la traduction des ARNm en phosphorylant EIF2α. IκB ayant une demi-vie plus courte que NF-κB, cette répression de la traduction diminue le ratio NF-κB/IκB, ce qui libère NF-κB qui est dirigé vers le noyau. De plus, en réponse au stress du RE, IRE1α recrute TRAF2 et le complexe interagit avec JNK ou IKK, activant ces kinases. JNK phosphoryle AP1, ce qui l'active. IKK phosphoryle IκB, ce qui initie sa dégradation et libère NF-κB. NF-κB et AP1 activés migrent vers le noyau et induisent la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire.

Adapté de Zhang et al., 2008, Nature

4-1-2 Le stress du RE et la transplantation

L'ischémie-reperfusion (IR) –

Les lésions des cellules rénales dues à l'IR sont souvent accompagnées par une dysfonction rénale aiguë, et l'IR est associée à une augmentation du taux de rejets aigus, à l'absence de fonction primaire, au délai de fonction ou à une fonction initiale pauvre du greffon, ainsi qu'à des dysfonctions tardives corrélées au rejet à long-terme du greffon (Kelly and Molitoris, 2000; Mehrabi et al., 2007). L'IR, observée notamment au moment de la transplantation d'un organe solide, est une cause importante de lésions endothéliales et épithéliales qui aboutissent à des altérations structurales, comme la dépolarisation cellulaire, la désorganisation du cytosquelette d'actine, la perte des jonctions serrées mais également la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Au niveau biochimique, l'ischémie et la reperfusion qui suit se manifestent par une variété de changements incluant un déclin rapide et sévère des niveaux cellulaires d'ATP, des altérations de l'état redox de la

cellule et des perturbations des taux de Na^+/K^+ , du pH intracellulaire et de l'homéostasie intracellulaire du calcium (Ishida et al., 1988; Gonzalez-Flecha et al., 1993). Ces conditions ischémiques induisent un mauvais repliement ou une dénaturation des protéines cellulaires, directement ou via la perturbation de leur voie de biosynthèse ou de repliement (Kuznetsov and Nigam, 1998; Bush et al., 1999). Plusieurs publications ont déjà fait état du développement d'un stress du RE et de l'induction de protéines de stress (notamment les protéines chaperonnes HSP) après IR. Notamment, alors que les effets de l'hypoxie chronique sur le stress du RE tubulaire n'ont pas été élucidés, d'autres investigations ont montré l'induction d'un stress du RE dans les cellules tubulaires soumises à une ischémie aiguë (Kuznetsov et al., 1996; Bando et al., 2004). Kutnesov et al. rapportent une augmentation des transcrits de BiP, GRP94 et Erp72 dans des reins de rats ayant subi une ischémie par ligation artérielle rénale. (Kuznetsov et al., 1996). En 2005, Emadali et al. montrent chez l'homme le lien direct entre l'IR et la réponse au stress en transplantation hépatique. Ils observent que les niveaux de phosphorylation de PERK et EIF2 α diminuent durant la phase ischémique et augmentent durant la phase de reperfusion ; les transcrits de BiP sont augmentés durant la phase ischémique alors que les transcrits de CHOP et de GADD34 (induits par PERK/ATF4) sont diminués, et augmentés durant la phase de reperfusion, ce qui reflète l'activation de la voie PERK et suggère la mise en place d'une réponse UPR (Emadali et al., 2005). De même, JNK1, ERK1 et p38^{MAPK}, des kinases activées par le stress du RE, sont phosphorylées de manière moins importante en phase ischémique et plus importante en phase de reperfusion (Emadali et al., 2005). IRE1 et EDEM sont également augmentées de manière biphasique, précocément lors de l'ischémie et de la reperfusion (Emadali et al., 2005). La phase tardive de l'IR, qui s'accompagne d'une activation de PERK et d'une phosphorylation d'eIF2 α et inhibe l'activité traductionnelle, est potentiellement délétère si elle est profonde et prolongée (Hossmann, 1993). Bando et al. ont déterminé que l'expression de ORP150 (oxygen regulated protein 150, ou HSP12A) est augmentée dans un modèle de lésions rénales par IR chez le rongeur et dans des cellules épithéliales en culture exposées à des conditions hypoxiques ou hyperosmotiques, et que cette surexpression permet une protection contre la dysfonction rénale (Bando et al., 2004). Des niveaux élevés de chaperonnes cytosoliques, et particulièrement les membres de la famille des HSP70 comme ORP150, corrént avec une augmentation de la survie des cellules sujettes à des lésions plus tardives comme l'IR et la privation d'énergie (Gabai and Kabakov, 1993). De manière similaire, les chaperonnes moléculaires du RE ont des propriétés cytoprotectives ; le pré-traitement de cellules épithéliales rénales déplétées en ATP par la tunicamycine, qui induit l'accumulation de chaperonnes du RE, augmente leur survie en culture (Bush et al., 1999). La réponse primaire de surexpression des protéines de réponse au stress

ischémique et d'inhibition de la voie de sécrétion des protéines est donc protectrice et adaptatrice. La phase de reperfusion rétablit un environnement du RE fonctionnel qui restaure la sécrétion protéique mais déclenche une seconde phase d'activation UPR due à la surcharge protéique du RE (Emadali et al., 2005). Cette seconde phase active à la fois IRE1 et PERK (Emadali et al., 2005), la voie PERK pouvant mener à l'apoptose cellulaire et aux lésions tissulaires et structurelles de l'organe greffé. Ainsi, les travaux d'Emadali et al. montrent que l'activation de PERK s'effectue principalement au niveau des cellules endothéliales sinusoidales du greffon (Emadali et al., 2005), les cellules endothéliales étant l'interface principale entre le greffon et l'hôte. La minimisation du temps d'IR, le stockage de l'organe (Moers et al., 2009) ou son conditionnement pour induire un effet protecteur de la réponse au stress sont autant de pistes à exploiter en transplantation rénale, dont certaines sont déjà en cours d'étude. Ainsi, Jassem et al. ont étudié le profil transcriptomique de patients transplantés hépatiques soumis ou non à un préconditionnement ischémique. Les premiers résultats montrent une diminution des gènes impliqués dans la mort cellulaire, l'inflammation et les réponses immunitaires, le stress et la modulation du cycle cellulaire dans des biopsies de foie soumis à un préconditionnement ischémique (Jassem et al., 2009).

Néphrotoxicité des inhibiteurs de calcineurine –

La cyclosporine est responsable d'une néphrotoxicité aiguë, réversible et liée principalement à des phénomènes vasoconstricteurs, et d'une néphrotoxicité chronique, irréversible, responsable d'une néphropathie tubulo-interstitielle (Busauschina et al., 2004; Bobadilla and Gamba, 2007). Le stress du RE est impliqué dans la médiation de cette néphrotoxicité *in vitro* et *in vivo* (Pallet et al., 2008a; Pallet et al., 2008c). La cyclosporine induit un stress dans les reins dont l'expression est maximale à une semaine de traitement chez le rat, avec induction de BiP, de CHOP et de la caspase 12, puis absente après un mois avec diminution de l'expression de BiP et augmentation de l'expression de CHOP et de la caspase 3 (Han et al., 2008). L'activation de la voie de réponse au stress et de la voie apoptotique à une semaine, et l'augmentation des molécules de la voie pro-apoptotique à 28 jours, renforce l'idée selon laquelle le stress du RE est un phénomène adaptatif transitoire, précédant la mort cellulaire (Han et al., 2008). La cyclosporine induit la mort cellulaire, le stress du RE et les changements phénotypiques de cellules endothéliales d'artères ombilicales humaines (HUAEC) en culture, suggérant une transition endothélium-mésenchyme partielle (Bouvier et al., 2009). La même équipe a montré que le stress du RE a un rôle actif dans la transition épithélio-mésenchymateuse tubulaire et la fibrose rénale, induites par la cyclosporine indépendamment de la voie de signalisation du TGF β , et peut constituer une cible thérapeutique. En effet, le salubrinal, une molécule limitant les effets du stress du RE en diminuant l'activité traductionnelle, protège les reins

de rats de la néphrotoxicité induite par la cyclosporine (Pallet et al., 2008a). Des études récentes ont montré que la cyclosporine A induisait un stress du RE dans les cellules tubulaires rénales, qui activaient l'autophagie comme mécanisme de protection contre la mort cellulaire (Ding et al., 2007; Pallet et al., 2008b).

4-2 Voie de signalisation

4-2-1 Définition du stress du RE

Le réticulum endoplasmique (RE) est le premier compartiment d'un réseau membranaire ordonné appelé voie de sécrétion. Cette voie est responsable de la synthèse, de la modification et de la délivrance de protéines biologiquement actives à leur site cible dans la cellule et dans le milieu extracellulaire. Comme beaucoup d'autres voies biochimiques, les flux de la voie de sécrétion sont contrôlés aux étapes les plus précoces. Le RE a développé des mécanismes protecteurs élaborés pour s'assurer que seules les protéines correctement repliées et assemblées quittent le RE, un processus appelé « contrôle qualité ». Le transit du RE au complexe de Golgi est l'étape limitante de la sécrétion pour beaucoup de glycoprotéines. Le RE est la voie d'entrée pour la vaste majorité des protéines passant par la voie de sécrétion. Les étapes précoces dans la maturation des protéines sécrétées, c'est-à-dire le repliement des chaînes polypeptidiques naissantes et les modifications post traductionnelles importantes pour le repliement et la fonction de la protéine, prennent place dans le RE. Si le flux de polypeptides naissants et non repliés excède la capacité de repliement et de prise en charge du RE, l'état physiologique normal du RE est perturbé. Dans ces conditions, des voies de signalisations appelées « réponse aux protéines mal repliées » (UPR, Unfolded Protein Response), sont activées pour faire retrouver au RE son état physiologique normal. Pour ramener la capacité de repliement du RE au niveau de la demande, la demande de repliement est diminuée par la diminution de la transcription de gènes, le codage de protéines sécrétées et la traduction (Harding et al., 1999). De plus, la clairance de protéines repliées de manière trop lente ou mal repliées est augmentée via la voie de dégradation associée au RE (ERAD, ER-Associated Degradation pathway) (Travers et al., 2000). Dans le même temps, la capacité de repliement du RE est développée par augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes et résidentes chargées du repliement (Kozutsumi et al., 1988). De plus, la taille du RE augmente pour diluer la charge en protéines mal repliées (Dorner et al., 1989). La charge en protéines mal repliées dans le RE pourrait être liée de façon intime au statut nutritionnel (Pouyssegur et al., 1977; Schroder et al., 2000), infectieux (Dimcheff et al., 2003) ou de différenciation de la cellule (Calfon et al., 2002; Schroder et al., 2004), et il n'est donc pas surprenant que la signalisation UPR s'étende au-delà de la simple maintenance de

l'homéostasie du RE et qu'elle contribue aux décisions impliquant ces événements cellulaires importants.

4-2-2 Le repliement protéique dans le RE

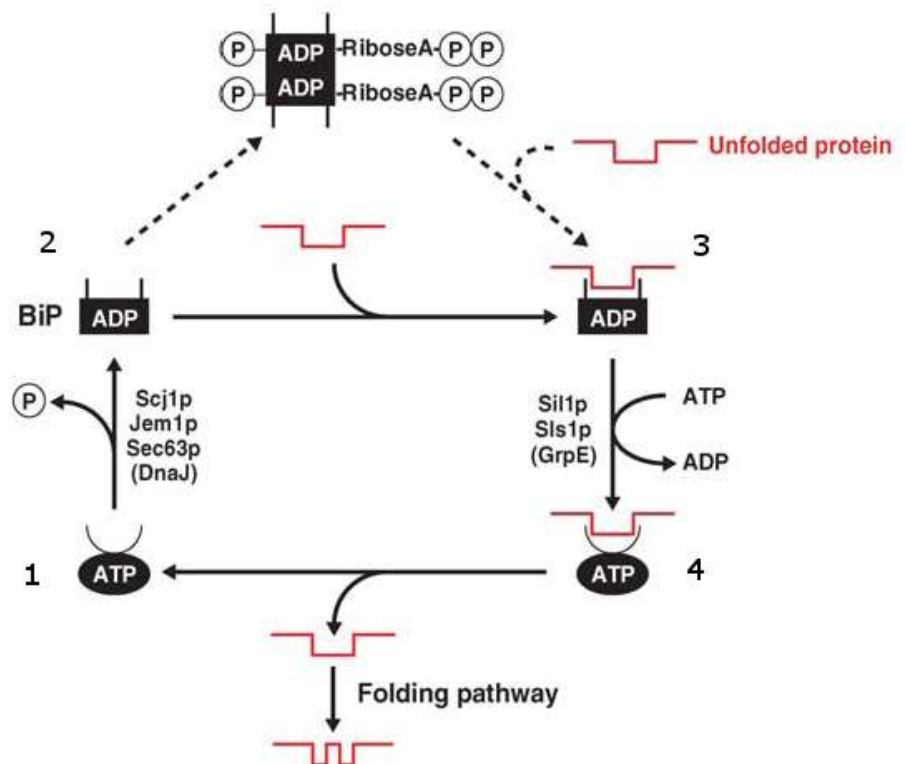
Le RE est un compartiment majeur de repliement protéique dans les cellules eucaryotes, en deuxième position derrière le cytosol. Beaucoup de principes gouvernant le repliement protéique dans le cytosol s'appliquent au RE, mais le repliement dans le RE est plus complexe car les polypeptides naissants subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la N-glycosylation et la formation de ponts disulfures entre autres. L'inhibition de chaque modification peut entraîner la perturbation du repliement protéique. D'autre part, la réaction de repliement protéique, comme n'importe quelle réaction chimique, doit remplir un certain nombre de conditions thermodynamiques et cinétiques. Toutes ces contraintes font que le repliement protéique peut être aisément bouleversé et entraîner une réponse UPR. La machinerie de repliement protéique du RE consiste en trois classes de protéines : les foldases (protéines de repliement), les chaperonnes moléculaires, les lectines (Calnexine CNX, Calréticuline CRT et l'ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein EDEM) et les enzymes de traitement des N-oligosaccharides. Les foldases catalysent les étapes de repliement protéique (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérases et PDI, Protein Disulfide Isomerase, qui catalysent la formation des ponts disulfures), les chaperonnes moléculaires agissent de manière coordonnée et facilitent le repliement en protégeant les régions non repliées des protéines environnantes (chaperonnes HSP70 telles que Bip ou LHS1, cochaperonnes DnaJ et GrpE, chaperonne HSP90 (GRP94), Calnexine et Calreticuline). Les lectines surveillent la conformation des protéines et dictent l'export d'une molécule au Golgi ou sa direction vers la machinerie ERAD. Elles agissent en même temps que l'UGGT (UDP-glucose glycoprotein glucosyl transferase), qui reconnaît et glycosyle partiellement les glycoprotéines mal repliées. La forme monoglycosylée effectue des cycles de glycosylation/déglycosylation, la forme partiellement glycosylée étant retenue dans le RE par le complexe CNX/CRT jusqu'à sa démannosylation. Si la protéine est toujours mal repliée, elle est orientée vers EDEM par la CNX pour être dégradée par le protéasome (Ellgaard and Helenius, 2003). L'interaction préférentielle de protéines mal repliées avec des chaperonnes moléculaires résidant dans le RE et la rétention de ces protéines dans le RE par de telles interactions constitue le second bras de la machinerie de contrôle qualité du RE. En plus de ces chaperonnes et foldases avec de larges spécificités de substrat, de nombreuses autres chaperonnes spécifiques de protéines clientes se sont développées.

4-2-3 Reconnaissance des protéines mal repliées

La manière dont une protéine mal repliée est reconnue est identifiée seulement pour BiP et partiellement pour UGGT. La liaison de BiP à une protéine mal repliée ne facilite pas le repliement protéique mais maintient plutôt la protéine dans un état permettant son repliement. BiP contient un domaine ATPase et un domaine de liaison au substrat. La forme de BiP liée à l'ATP présente une faible affinité pour les substrats présentant des régions hydrophobiques, la marque thermodynamique d'une protéine mal repliée (Figure 8.1). La liaison de BiP au substrat et des cochaperonnes DnaJ-like à Bip stimule l'activité d'hydrolyse de l'ATP et l'échange ADP-ATP de BiP, ce qui génère une forme liée à l'ADP (Figure 8.2) qui a une forte affinité pour le peptide lié (Gething, 1999) (Figure 8.3). L'échange de l'ADP par de l'ATP relargue le substrat de BiP qui peut continuer à se replier, et le cycle recommence (Figure 8.4). Le cycle d'une protéine mal repliée entre les formes ADP-ATP de BiP consomme de l'énergie (Dorner and Kaufman, 1994). Le repliement de beaucoup de protéines est inhibé par la déplétion de l'ATP cellulaire (Gething, 1999). Ces événements seraient les premiers dans la transduction de signal en réponse à l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE.

Figure 8: Liaison ADP-ATP de BiP.

Adapté de Schröder and Kaufman, 2005, Annu. Rev. Biochem.



4-2-4 Transduction des signaux de protéines mal repliées

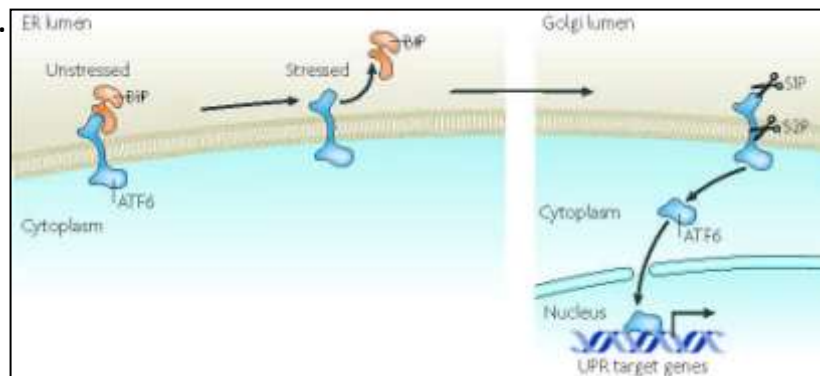
L'interaction prolongée d'une protéine en repliement avec la machinerie de molécules chaperonnes active trois protéines transmembranaires résidant dans le RE : ATF6 (Activating Transcription Factor 6), IRE1 (inositol requiring kinase 1) et PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase), qui transmettent un signal de protéine mal repliée à travers la membrane du RE.

Le trafic d'ATF6 semble être entravé par la liaison de BiP à son domaine luminal (Figure 9). Quand le repliement protéique est inhibé dans le RE, la liaison de BiP et d'ATF6 est perturbée et la protéine ATF6 est orientée vers le complexe de Golgi (Chen et al., 2002), où elle est clivée dans son domaine luminal et dans sa partie ancrée dans la membrane par deux protéases, S1P et S2P (Haze et al., 1999; Ye et al., 2000). Il s'ensuit un relargage du domaine cytosolique du facteur de transcription bZIP d'ATF6, qui est transloqué dans le noyau pour activer la transcription. bZIP se lie aux éléments de réponse CRE (ATF/cAMP response element) (Wang et al., 2000) et ERSE (ER stress response element) au niveau des gènes (Kokame et al., 2001).

Figure 9 : Signalisation par ATF6.

Un stress du RE dissocie BiP d'ATF6. Puis ATF6 est clivé et devient un facteur de transcription bzip qui gagne le noyau et active la transcription de gènes cibles de la voie UPR.

Adapté de Ron and Walter, 2007, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.



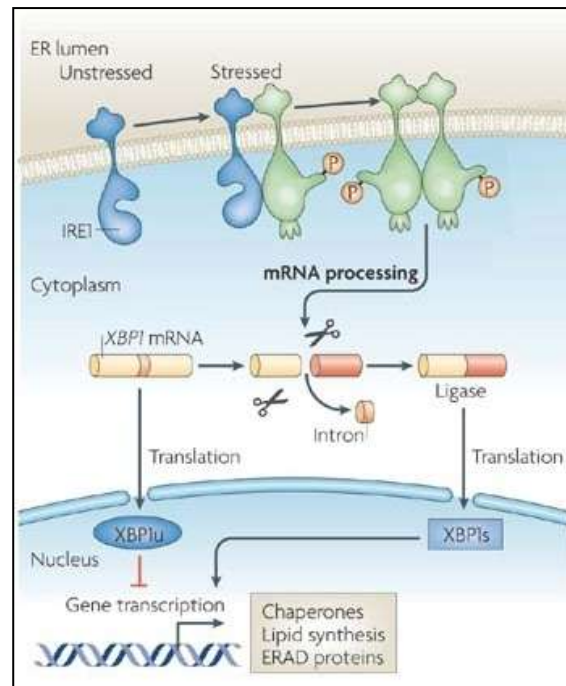
IRE1 est une protéine kinase endoribonucléase transmembranaire de type I (Cox et al., 1993) possédant un domaine de dimérisation dans la lumière du RE et des domaines cytosoliques kinase et endoribonucléase. La dimérisation d'IRE1 provoque son autophosphorylation et active son domaine endoribonucléase (Sidrauski and Walter, 1997) (Figure 10 p.55). Le substrat de ce domaine est l'ARNm encodant le facteur de transcription bZIP XBP1 (Calfon et al., 2002), dont un intron est épissé. Les deux bouts d'ARNm sont ligués, ce qui conduit à un décalage du cadre de lecture de la séquence codante (Figure 10, changement de couleur du jaune au rouge après épissage de l'intron). L'ARNm épissé encode XBP1s (spliced), un puissant activateur transcriptionnel, alors que l'ARNm non épissé encode XBP1u (unspliced), un inhibiteur de la réponse UPR. Chez les mammifères, XBP1 régule un sous-type de gènes UPR qui promeuvent la voie ERAD (ER associated degradation) des protéines mal

repliées et la biogenèse du RE. XBP1 est un facteur de transcription bZIP contrôlant les gènes qui contiennent un élément X-box. Tout comme ATF6, XBP1 se lie aux motifs ERSE (ER stress response elements). De plus, XBP1 et ATF6 sont requis pour la transcription d'XBP1, XBP1 autostimulant sa propre transcription (Lee et al., 2002).

Figure 10 : Signalisation par IRE1.

Lors d'un stress du RE, IRE1 se dimérise et s'autophosphoryle, ce qui active son domaine RNase. L'ARNm d'XBP1 est épissé par IRE1, ce qui encode une molécule XBP1s (spliced) active qui gagne le noyau et active la transcription de gènes de la voie UPR.

Adapté de : Ron and Walter, 2007, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.



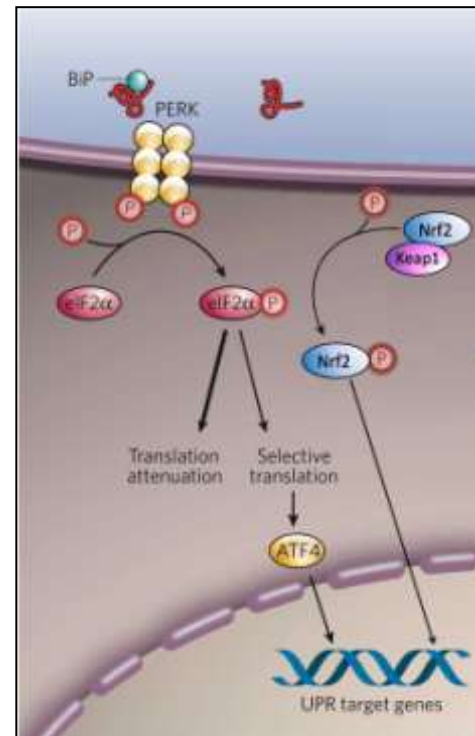
L'activation de PERK a deux conséquences majeures : la phosphorylation de la sous unité α du facteur de transcription eucaryotique 2 (EIF2 α) (Harding et al., 1999), et la phosphorylation du facteur de transcription bZIP Cap 'n' Collar Nrf2 (Cullinan et al., 2003) (Figure 11 p.56). La phosphorylation d'EIF2 α par PERK diminue la traduction générale de la cellule en inhibant l'assemblage du ribosome 80S, permettant la survie de la cellule en prévenant l'influx de polypeptides naissants additionnels dans la lumière du RE déjà saturée. La phosphorylation d'EIF2 α est requise pour la traduction de certains ARNm contenant des séquences régulatrices telles que le cadre de lecture court dans la région 5' non traduite de l'ARNm encodant le facteur de transcription ATF4. ATF4 induit la transcription de gènes cibles de la réponse UPR impliqués dans le métabolisme des acides aminés, la réponse anti-oxidante et l'apoptose induite par le stress du RE (Vattem and Wek, 2004). Dans les cellules non stressées, Nrf2 appartient à un complexe cytoplasmique inactif avec une ancre cytosquelettique Keap1 (Cullinan et al., 2003). Lors d'un stress du RE, PERK phosphoryle Nrf2, ce qui dissocie le complexe Nrf2-Keap1 et provoque la localisation nucléaire de Nrf2 qui active la transcription grâce à un élément de réponse antioxidante (ARE, Antioxidant Response Element) (Nguyen et al., 2003) (Figure 11 p .56). Nrf2 active la transcription via ARE en tant

qu'hétérodimère en collaboration avec d'autres facteurs de transcription bZIP : ATF4, c-Jun, Jun-B et Jun-D (Nguyen et al., 2003). Les ARE contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de phase II des xénobiotiques comme par exemple les substances électrophiliques thiol-réactives qui miment une perturbation oxydative. Ces gènes régulés par les ARE incluent les sous unités A1 et A2 de la glutathione S-transférase, l'oxido-reductase NAD(P)H :quinone, la γ -glutamylcystéine synthétase, l'hème oxygénase 1 et l'UDP-glucuronosyl transférase (Nguyen et al., 2003).

Figure 11 : Signalisation par PERK et Nrf2.

Lors d'un stress du RE, BiP se dissocie de PERK, qui phosphoryle EIF2 α et Nrf2. La phosphorylation d'EIF2 α réduit la traduction protéique mais permet l'encodage d'ATF4 qui permet la transcription de gènes de la voie UPR. La phosphorylation de Nrf2 le dissocie de Keap1, ce qui provoque sa délocalisation nucléaire et la transcription de gènes présentant des motifs ARE (Antioxidant Response Element).

Adapté de Zhang et al., 2008, Nature



Pour permettre un retour à la normale après un stress du RE et une réponse efficace à un stress prolongé, l'inhibition de la traduction par PERK est transitoire. Deux phosphatases d'EIF2 α , GADD34 et CreP, régulent l'activité phosphatase de la protéine phosphatase 1 (PP1) qui permet la déphosphorylation d'EIF2 α . CreP est un régulateur constitutif de PP1 (Jousse et al., 2003) alors que GADD34 est induite par ATF4 de manière tardive pendant le stress du RE (Ma and Hendershot, 2003). De plus, PERK est inhibé par sa liaison à P58^{IPK}, une cochaperonne HSP40 dont l'expression est induite par IRE1/XBP1 de manière tardive pendant le stress du RE (Yan et al., 2002). Ainsi, l'activation tardive de GADD34 et P58^{IPK} est un mécanisme de feedback négatif qui évite l'inhibition de la traduction de manière trop prolongée.

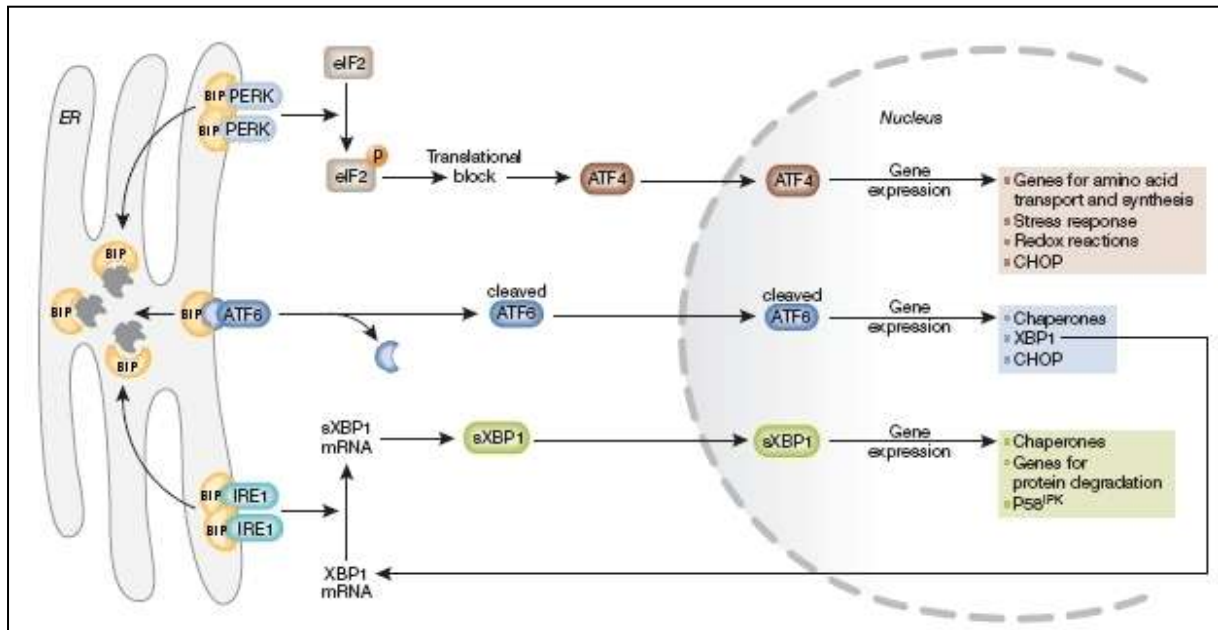


Figure 12 : Récapitulatif de la réponse UPR.

Lors d'un stress du RE, BiP se dissocie des 3 molécules senseurs PERK, ATF6 et IRE1 pour s'associer avec les protéines mal repliées. PERK phosphoryle EIF2 α qui réduit la traduction protéique et induit la transcription d'ATF4, ATF6 est clivé et devient un facteur de transcription et IRE1 épisse l'ARNm d' XBP1 qui devient également un facteur de transcription des gènes cibles de la voie UPR.

Adapté de Szegezdi et al., 2006, EMBO reports

4-2-5 Reprogrammation de la cellule lors d'un stress du RE

Toutes les voies de signalisation de la réponse UPR activent des facteurs de transcription bZIP qui peuvent être des activateurs ou des répresseurs compétitifs ou bien interagir avec les machineries de répression transcriptionnelle. Les réponses physiologiques ultimes régulées par la réponse UPR sont l'induction de chaperonnes moléculaires, l'induction de gènes de la voie ERAD et de la voie de synthèse des phospholipides et l'apoptose.

Induction des chaperonnes moléculaires –

Chez les mammifères, la contribution de chacun des 3 bras de signalisation de la voie UPR pour l'induction de gènes spécifiques a été déterminée. Toutes les études de typage transcriptomique ont identifié les chaperonnes du RE, les foldases et les gènes ayant des fonctions dans la voie de sécrétion comme des cibles majeures de la réponse UPR. ATF6 (Okada et al., 2002) et XBP1 (Lee et al., 2003) en particulier contribuent à l'induction de ces gènes. PERK semble suffisant pour l'induction effective de certains gènes cibles, alors qu'ATF6 et XBP1 ont des fonctions d'induction de ces gènes qui se chevauchent partiellement (Lee et al., 2003).

Induction de la voie ERAD –

Les gènes impliqués dans la voie de dégradation ERAD ont été identifiés comme la seconde classe de gènes cibles de la voie UPR chez la levure. La voie ERAD induit la rétro-translocation des protéines mal repliées de la lumière du RE vers le cytosol pour dégradation par le protéasome et diminue ainsi la charge du RE pendant le stress. Ainsi, la voie ERAD est complémentaire des autres cibles de la voie UPR (comme les chaperonnes et les enzymes de modification des protéines) en évacuant les protéines mal repliées du RE. Chez les mammifères, ATF4 et 6 ont été impliqués dans l'induction de Herp/Mif1 (Ma and Hendershot, 2003), une protéine suspectée de recruter le protéasome 26S à la membrane du RE durant le stress (van Laar et al., 2001). Plusieurs gènes impliqués dans la voie ERAD seulement, et incluant EDEM et UGGT, nécessitent la voie IRE1/XBP1 pour leur induction (Yoshida et al., 2003). EDEM peut également être induit par la voie UPR (Hosokawa et al., 2003). Les protéines entrant dans la voie ERAD doivent traverser la membrane en sens inverse et le font via des complexes multi-protéiques dans la membrane du RE (Hoseki et al., 2010). Les protéines vraiment mal repliées et les agrégats protéiques sont difficiles à dégrader par ce mécanisme. Cependant, les cellules possèdent un mécanisme alternatif pour dégrader de telles protéines, l'autophagie (Ogata et al., 2006). Par ce processus, les organelles peuvent être dégradées de façon indépendante de leur taille ou du statut de repliement de leurs constituants protéiques. La plupart des composants induisant l'autophagie ont récemment été identifiés comme des gènes cibles de l'UPR et sont importants pour que la cellule survive à un stress du RE sévère (Bernalles et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006).

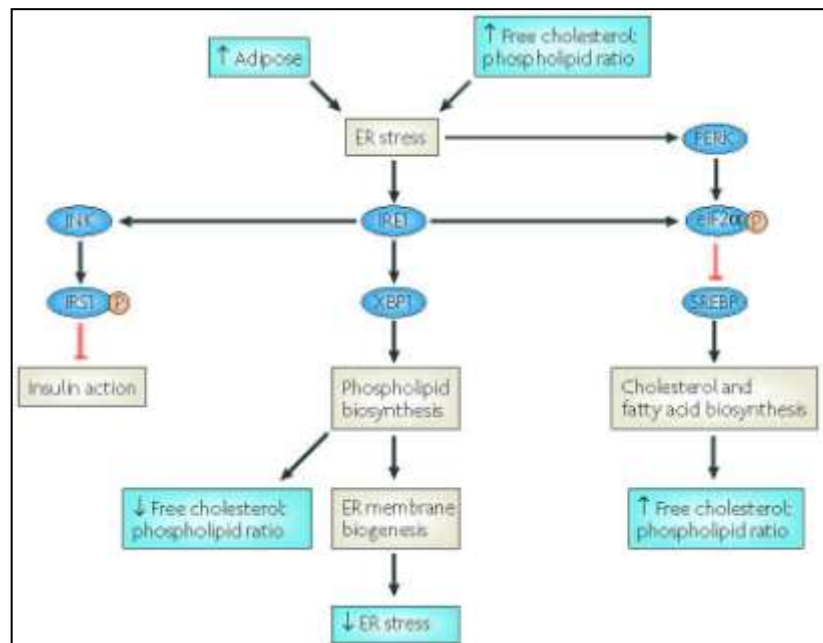
Augmentation de la taille du RE –

Schuck et al. ont montré que la levure *Saccharomyces Cerevisiae* induisait une expansion du RE via la génération de feuillettes membranaires de manière dépendante de la voie UPR, puisque des levures mutantes pour *hac1* et *ire1* ne pouvaient pas générer un RE morphologiquement normal en réponse à un stress du RE. De même, cette équipe a découvert que les facteurs de transcription Ino2 et 4 (contrôlant les enzymes de synthèse des phospholipides) avaient un rôle dans le contrôle de la taille du RE lors d'un stress, mais de manière indépendante de l'expression des protéines chaperonnes. Il semble que sans signalisation UPR, l'induction de gènes de synthèse lipidique via Ino2/4 est réduite, résultant en un apport insuffisant de lipides pour supporter l'expansion membranaire complète du RE (Schuck et al., 2009). Cependant, dans les levures, l'expression d'une version épissée de l'ARNm *hac1* conduit à l'expansion du RE. De plus, les rôles d'IRE1 et XBP1 dans la prolifération des endomembranes et dans la biosynthèse des phospholipides sont conservés chez les mammifères. Ceci explique sûrement le rôle essentiel d'XBP1 dans le développement de plusieurs types de cellules

sécrétrices (Reimold et al., 2001) et l'observation qu'une expression dérégulée d'XBP1 peut à elle-seule promouvoir la biosynthèse des phospholipides et l'expansion membranaire dans les cellules de mammifères (Shaffer et al., 2004). Toutefois, on ne sait pas si la signalisation UPR est suffisante pour induire la remarquable expansion du RE observée dans les cellules sécrétrices professionnelles. De même, la déplétion en phospholipides active la réponse UPR (Cox et al., 1997; van der Sanden et al., 2003), mais on ne sait pas si cela reflète une perturbation indirecte de l'environnement de repliement protéique dans la lumière du RE ou si IRE1 (ou PERK ou ATF6) peut directement sentir les changements dans la composition lipidique de la bicouche du RE. De façon intéressante, les SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein), qui régulent la voie principale pour la détection de lipides dans les cellules animales, sont aussi contrôlés via une connexion au RE et partagent des composants de leur machinerie d'activation avec la voie UPR. Cependant, il y a peu de preuves de cibles partagées ou de chevauchement de circonstances dans lesquelles les deux voies sont activées (Ye et al., 2000). Par exemple, la dérégulation d'XBP1 n'augmente pas les stocks de cholestérol (Sriburi et al., 2004), ce qui est cohérent avec l'idée que la voie UPR augmente la production des membranes du RE pauvres en stérols (Figure 13).

Figure 13 : Stress du RE et métabolisme.

L'accumulation de cholestérol dans les membranes du RE peut causer un stress du RE. Le stress du RE active IRE1, qui conduit à l'augmentation de la biosynthèse lipidique dépendante d'XBP1, ce qui augmente la biogenèse de la membrane. Cette caractéristique de la voie UPR est conservée chez les eucaryotes. L'activité d'XBP1 réduit le cholestérol libre en ratio phospholipidique (un fort ratio peut compromettre la fonction du RE et induire un stress). La phosphorylation d'EIF2 α par PERK inhibe l'activation de SREBP pour diminuer la synthèse de cholestérol.



Adapté de Ron et al., 2007, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*

L'apoptose induite par le stress du RE –

Les évènements proximaux de la transduction des signaux apoptotiques à travers la membrane du RE ne sont pas connus. Le mécanisme de libération du calcium de la lumière du RE pendant le stress est analogue à l'action des membres de la famille Bcl2 à la membrane de la mitochondrie. La protéine anti-apoptotique Bcl2, la protéine inhibitrice de Bax (BI-1) et les protéines pro-apoptotiques Bak, Bax, Bid et Spike sont localisées dans la membrane du RE (Figure 14 p.61). Lors d'un stimulus apoptotique, Bid induit un changement conformationnel de Bak et Bax, ce qui déclenche l'oligomérisation de ces protéines (Eskes et al., 2000). L'oligomère Bax forme un pore dans la membrane mitochondriale, ce qui induit le relargage du cytochrome *c* (Rutkowski and Kaufman, 2004). De manière analogue, lors d'un stress du RE, Bax et Bak sont oligomérisés à la membrane du RE et s'insèrent dans cette membrane, ce qui résulte en un efflux de calcium du RE (Zong et al., 2003). L'augmentation de la concentration cytosolique de calcium active la calpaïne (Nakagawa and Yuan, 2000), qui clive et active la procaspase 12 localisée dans le RE (Nakagawa and Yuan, 2000). La procaspase 12 activée clive la procaspase 9, et la caspase 9 activée active la procaspase 3 (Rao et al., 2002). La libération de calcium du RE est rapidement détecté par la mitochondrie, ce qui conduit à l'effondrement du potentiel de la membrane interne. L'influx de calcium dans la mitochondrie ouvre les pores de transition de la perméabilité (PTP, Permabilization Transition Pore), formés de complexes de canaux anioniques dépendant du voltage (Crompton, 1999). Le cytochrome *c* est relargué via PTP dans le cytoplasme, où un apoptosome est formé, et la procaspase 3 est activée. De plus, le PTP recrute Bax à la membrane mitochondriale externe (Crompton, 1999), ce qui permet le relargage de protéines apoptogéniques clés telles que le cytochrome *c*, AIF (Apoptosis Inducing Factor) et la procaspase 9 (Figure 14 p.60). La surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L en réponse au stress bloque la dépolarisation de la membrane interne de la mitochondrie (Boya et al., 2002). Le stress du RE active ATF6 et la synthèse d'ATF4 après la phosphorylation d'EIF2 α par PERK, ce qui induit l'expression du facteur de transcription bZIP pro-apoptotique CHOP (Ma et al., 2002). CHOP réprime la transcription de Bcl2 et ainsi modifie la balance des membres pro- ou anti apoptotiques de la famille Bcl2 vers les membres pro-apoptotiques (McCullough et al., 2001). Cette voie de signalisation présumée indépendante des récepteurs de surface et répondant à des dommages intracellulaires est référée comme la voie d'apoptose intrinsèque. La voie d'apoptose extrinsèque répond à des stimuli extracellulaires et est déclenchée par l'association de récepteurs de surface. La surexpression de la kinase inhibitrice de c-Jun (JIK) augmente la phosphorylation de TRAF2 (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 2) et l'interaction de TRAF2 avec IRE1 (Yoneda et al., 2001), ce qui active ASK1 (Apoptosis Signal regulating Kinase 1) (Nishitoh et al., 2002) et la kinase amino-terminale c-Jun,

qui phosphoryle Bcl2 et déclenche la mort cellulaire (Bassik et al., 2004) (Figure 14). TRAF2 promeut le clustering de la pro-caspase 12 en cas de stress du RE, probablement en séquestrant IRE1 (Yoneda et al., 2001), qui a été proposé comme un pré-requis à l'activation de la pro-caspase 12 (Yoneda et al., 2001). Des signaux apoptotiques additionnels sont générés à la membrane du RE, par exemple via la protéine membranaire intégrale BAP31 (Mund et al., 2003) et par des transducteurs de signaux conventionnels tels qu'IRE1. La manière dont ces signaux sont générés et dont la signalisation spécifique d'IRE1 est régulée n'est pas connue.

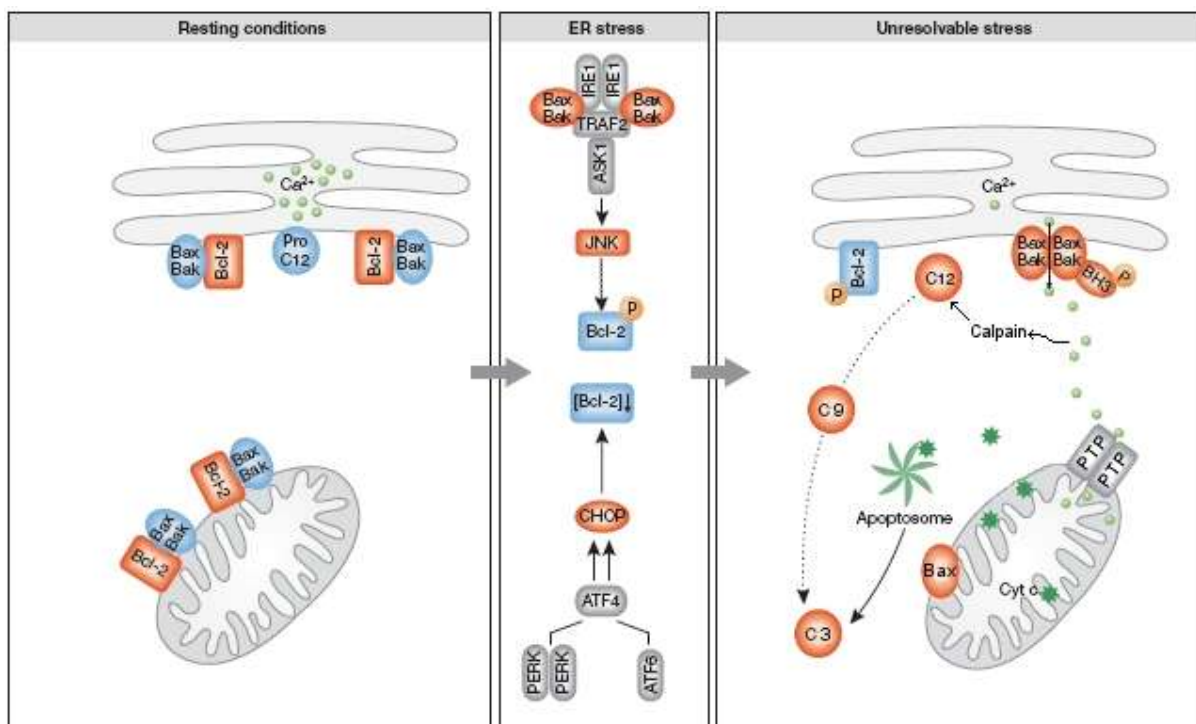


Figure 14 : Médiateurs de l'apoptose induite par le stress du RE.

Au repos, Bax/Bak sont inactivés par leur interaction avec Bcl2 à la membrane du RE et à celle de la mitochondrie. Un stress du RE conduit à l'activation de JNK et à l'induction de CHOP, qui inhibent Bcl2. Bax et Bak sont activés et forment un pore dans la membrane du RE, ce qui provoque la libération du calcium du RE. Le calcium relargué active la caspase 3 en bout de chaîne et la libération du cytochrome c par la mitochondrie.

Adapté de Szegezdi et al., 2006, EMBO reports

METHODOLOGIE

1- Objectif de l'étude 1

Dans cette optique de caractérisation de l'état de tolérance opérationnelle, mon travail de DEA a consisté à analyser les cellules du sang périphérique (analyses phénotypique, transcriptionnelle et fonctionnelle) de patients opérationnellement tolérants, comparés à des patients en rejet chronique, des patients avec une fonction rénale stable sous immunosuppresseurs et des volontaires sains non greffés. Notre équipe avait déjà montré en 2006 que les patients opérationnellement tolérants présentaient un nombre de cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ normal par rapport aux patients sains, alors que les patients en rejet chronique présentaient une diminution du nombre de cellules T régulatrices par rapport aux patients sains et opérationnellement tolérants (Louis et al., 2006). L'étude suivante à laquelle j'ai participé a montré que les cellules T régulatrices des patients en rejet chronique présentaient une activité suppressive normale par rapport à des individus sains contre une population autologue T CD4⁺ CD25⁻, tout comme celles des patients opérationnellement tolérants (Braudeau et al., 2007). Ces données suggèrent que le nombre de cellules T régulatrices plutôt que leur capacité suppressive intrinsèque pourraient contribuer au devenir à long-terme des transplants rénaux.

2- Objectif de l'étude 2

L'étude de Brouard et al. en 2007, qui a permis d'identifier un set de gènes caractéristiques de la tolérance opérationnelle (Brouard et al., 2007), a mis à jour une molécule inconnue jusqu'alors, surexprimée chez les patients opérationnellement tolérants et pouvant potentiellement être un biomarqueur pronostique ou diagnostique, ou une cible thérapeutique permettant l'établissement d'un profil de tolérance. Le but de cette étude a été d'étudier la fonction de cette protéine au niveau moléculaire et cellulaire afin de déterminer si elle jouait un rôle passif ou actif dans l'état de tolérance. Nous avons pu déterminer que SMILE module la protéolyse et l'activité du protéasome, sensibilise les cellules HeLa à un stress du RE dépendant du protéasome et module l'expression d'XBP1 lors d'un stress du RE, XBP1 jouant un rôle majeur dans la réponse au stress du RE et dans la voie UPR.

3- Description des patients

Mes travaux de DEA et de thèse ont consisté pour partie à analyser les cellules mononucléées du sang périphérique de différents groupes de patients transplantés rénaux :

1- Patients opérationnellement tolérants –

Il s'agit de patients recrutés avec la participation de nombreux centres français de transplantation rénale. Ces patients sont très rares, et les études portant sur les mécanismes impliqués dans la survenue de cet état de tolérance opérationnelle sont donc limités. Les détails cliniques de certains

de ces patients ont été publiés en 2006 (Roussey-Kesler et al., 2006). Ce sont des patients qui ont arrêté tout traitement immunosuppresseur depuis au moins 1 an (médiane 12,5 ans, gamme entre 5 et 30 ans), qui ont une fonction rénale stable avec une clairance de la créatinine > 40ml/min et une protéinurie < 1g/24h. Ces patients ne présentent pas de signes cliniques d'immunosuppression, puisque depuis l'arrêt des traitements immunosuppresseurs, ils n'ont pas eu d'infections sévères. Ballet et al. ont montré que la majorité de ces patients présentaient une réponse similaire à celle de sujets sains (Ballet et al., 2006). Le jeune âge des donneurs et une reprise de fonction du greffon pas ou peu retardée reflètent par ailleurs probablement la bonne qualité des greffons rénaux (Roussey-Kesler et al., 2006). Ce paramètre, associé à l'arrêt progressif de l'immunosuppression, constitueraient des éléments favorisant potentiellement la survenue d'un état de tolérance opérationnelle (Roussey-Kesler et al., 2006). A ce jour, nous avons réuni le matériel et la description clinique de 27 patients (Brouard et al., en préparation)

2- Patients greffés présentant un rejet chronique dépendant des anticorps –

Ces patients sous immunosuppression standard présentent une dégradation progressive de leur fonction rénale déterminée par biopsie selon les critères de la classification de Banff (Tableau 4 p.65) (Sis et al., 2010): positivité pour les anticorps anti C4d et/ou les anticorps anti HLA du donneur, glomérulopathie du transplant (feuilletage des membranes basales des capillaires péri-tubulaires) et/ou doubles contours glomérulaires et/ou fibrose interstitielle/atrophie tubulaire et/ou épaissement fibreux intimal des artères. Si le C4d (en présence d'anticorps anti HLA du donneur) ou les anticorps (C4d⁺) ne sont pas démontrés en présence d'évidences morphologiques de lésion des tissus, le rejet chronique dépendant des anticorps est considéré comme « suspecté ». Les patients en rejet chronique médié par les anticorps ont été diagnostiqués sur des biopsies réalisées dans le contexte d'une détérioration progressive de la fonction rénale (créatinémie médiane : 23,2 ml/min, protéinurie : 4g/24h).

Notre groupe a choisi de travailler sur les patients présentant un rejet chronique dépendant des anticorps, car les mécanismes immunologiques responsables des lésions chroniques dépendantes des anticorps sont pour le moment inconnus. De plus, les traitements actuels sont focalisés sur les rejets de type cellulaire et ce type de pathologie chronique dépendante des anticorps n'a pour l'instant pas de traitement. Une étude pilote a cependant montré des résultats encourageants sur la clairance des anticorps spécifiques du donneur par le Bortezomib® chez 2 patients atteints de rejet dépendant des anticorps (Walsh et al., 2010).

3- Patients greffés ayant une fonction rénale stable, sous immunosuppression standard.

4- Individus sains non greffés –

Ces volontaires sont sans infection connue depuis au moins 6 mois avant le prélèvement et ont servi de groupe contrôle.

Tableau 4 : Catégories de diagnostic Banff 1997 pour les biopsies d'allogreffes rénales – Mise à jour Banff 2009.

Source : *Sis et al., Am J Transplant*

-
1. Normal
 2. Antibody-mediated changes (may coincide with categories 3, 4 and 5 and 6)
Due to documentation of circulating antidonor antibody, C4d,¹ and allograft pathology
C4d deposition without morphologic evidence of active rejection
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, no signs of acute or chronic TCMR or ABMR (i.e. g0, cg0, ptc0, no ptc lamination (<5 layers by electron microscopy), no ATN-like minimal inflammation). Cases with simultaneous borderline changes are considered as indeterminate
 - Acute antibody-mediated rejection²
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of acute tissue injury, such as (Type/Grade)
I. ATN-like minimal inflammation
II. Capillary and/or glomerular inflammation (ptc/g >0) and/or thromboses
III. Arterial – v3
 - Chronic active antibody-mediated rejection²
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of chronic tissue injury, such as glomerular double contours and/or peritubular capillary basement membrane multilayering and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy and/or fibrous intimal thickening in arteries
 3. Borderline changes: 'Suspicious' for acute T-cell mediated rejection (may coincide with categories 2 and 5, and 6)
This category is used when no intimal arteritis is present, but there are foci of tubulitis (t1, t2 or t3) with minor interstitial infiltration (i0 or i1) or interstitial infiltration (i2, i3) with mild (t1) tubulitis
 4. T-cell mediated rejection (TCMR, may coincide with categories 2 and 5 and 6)
Acute T-cell mediated rejection (Type/Grade:)
IA. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of moderate tubulitis (t2)
IB. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of severe tubulitis (t3)
IIA. Cases with mild to moderate intimal arteritis (v1)
IIB. Cases with severe intimal arteritis comprising >25% of the luminal area (v2)
III. Cases with 'transmural' arteritis and/or arterial fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells with accompanying lymphocytic inflammation (v3)
 - Chronic active T-cell mediated rejection
'chronic allograft arteriopathy' (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell infiltration in fibrosis, formation of neo-intima)
 5. Interstitial fibrosis and tubular atrophy, no evidence of any specific etiology
(may include nonspecific vascular and glomerular sclerosis, but severity graded by tubulointerstitial features)
Grade
I. Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy (<25% of cortical area)
II. Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy (26–50% of cortical area)
III. Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy/ loss (>50% of cortical area)
 6. Other: Changes not considered to be due to rejection- acute and/or chronic (For diagnoses see table 14 in (49); may include isolated g, cg, or cv lesions and coincide with categories 2, 3, 4, and 5)
-

ATN, acute tubular necrosis.

The 2009 updates are underlined. All existing scoring categories (g, t, v, i, ptc, cg, ct, ci, cv, ah, mm) remain unchanged (45, 49).

¹Please refer to Banff 2007 classification paper (45).

²Suspicious for antibody-mediated rejection if C4d (in the presence of antibody) or alloantibody (C4d+) not demonstrated in the presence of morphologic evidence of tissue injury.

RESULTATS

Article 1

VARIATION DU NOMBRE DE CELLULES T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ AYANT DES PROPRIETES
IMMUNOREGULATRICES NORMALES DANS LE DEVENIR DU GREFFON A LONG TERME

Par: Cécile Braudeau, Maud Racapé, Magali Giral, Stéphanie Louis, Anne Moreau, Laureline Berthelot, Michèle Heslan, Joanna Ashton-Chess, Jean-Paul Souillou, and Sophie Brouard

Publié dans *Transplant International*, 2007, 20(10):845-55.

Titre Original: Variation In Numbers of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T Cells With Normal Immuno-Regulatory Properties In Long-Term Graft Outcome

ORIGINAL ARTICLE

Variation in numbers of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome

Cécile Braudeau,^{1,2} Maud Racape,¹ Magali Giral,^{1,2} Stéphanie Louis,¹ Anne Moreau,² Laureline Berthelot,¹ Michèle Heslan,¹ Joanna Ashton-Chess,¹ Jean-Paul Souillou^{1,2,3,*} and Sophie Brouard^{1,*}

1 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

2 CHU, Nantes, F44000 France

3 Université de NANTES, Faculté de médecine, Nantes, F44000 France

Keywords

chronic rejection, kidney, operational tolerance, regulatory cells, suppression.

Correspondence

Sophie Brouard, INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01 France. Tel.: +33 2 40 08 74.10; fax: +33 2 40 08 74 11; e-mail: sophie.brouard@univ-nantes.fr

*Authors contributed equally to this work.

Received: 13 June 2007

Revision requested: 2 July 2007

Accepted: 18 July 2007

doi:10.1111/j.1432-2277.2007.00537.x

Introduction

Despite improvements in immunosuppressive therapy over the last decade, chronic graft injury remains a major cause of graft loss in the long term [1–3]. A portion of such injury is thought to arise from late allo-immune chronic rejection (CR) [4]. CR is characterized by progressive renal dysfunction and is diagnosed on a histological basis by the presence of transplant glomerulopathy and/or interstitial fibrosis, tubular atrophy and/or vascular occlusive changes [4–6]. Moreover, CR is only poorly influenced by currently used immunosuppressors, and long-term exposure to immunosuppression (IS) leads to post-transplant infections [7], malignancies and lymphoproliferative diseases [8,9], all of which contribute to the high level of morbidity and mortality observed in transplant patients [10]. Thus, ways of inducing long-term allograft acceptance in the absence of IS, i.e. transplant

Summary

Chronic rejection (CR) is a major cause of long-term graft loss that would be avoided by the induction of tolerance. We previously showed that renal transplant patients with CR have lower numbers of peripheral CD4⁺CD25^{high} T cells than operationally tolerant patients, patients with stable graft function and healthy volunteers (HV). We explored here the profile of CD4⁺CD25^{high} blood T cells in these patients focusing on their expression of the regulatory T cells (Treg) gene Forkhead Box P3 (FOXP3) and their suppressive function. We show that CR is associated with a decreased number of CD4⁺CD25^{high} FOXP3⁺T cells with normal regulatory profile, whereas graft acceptance is associated with CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺T cell numbers similar to HVs. These data suggest that Treg numbers, rather than their intrinsic suppressive capacity, may contribute to determining the long-term fate of renal transplants.

tolerance, are being actively sought after. Although tolerance to allografts is difficult to induce in the clinical setting, some rare patients display well-functioning grafts despite having stopped their immunosuppressive medication, a state referred to as operational tolerance [11].

In rodents, there is a mounting evidence that transplant tolerance is driven at least in part by CD4⁺CD25⁺ cells with suppressive activity, so-called regulatory T cells (Treg) [12]. In humans, these cells have been shown to play a key role in controlling autoimmunity [13] and allergic diseases [14]. Both a decrease in Treg number with normal regulatory function [15,16] and a deficit in Treg function have been described in the induction or evolution of these various pathologies [17]. Nevertheless, relatively little is known thus far of the Treg population in human transplant recipients and whether Tregs influence long-term graft acceptance or rejection. A study of direct pathway alloresponses in stable kidney recipients by

Game *et al.* using mixed lymphocyte culture, limiting dilution assay, and IFNg ELISPOT before and after the depletion of CD4⁺CD25⁺ cells revealed no preferential regulation to donor antigen when compared with third party. The authors suggested that regulation by CD4⁺CD25⁺ cells does not account for the direct pathway hyporesponsiveness that occurs in the majority of renal transplant recipients [18]. On the other hand, Velthuis *et al.* studied the presence and function of CD4⁺CD25^{bright+} Tregs in 33 renal transplant recipients more than 5 years after transplantation. They concluded that in a subset of CNI-free kidney allograft recipients a long time after transplantation, functional CD4⁺CD25^{bright+} Tregs are present in the peripheral blood and are at least partially responsible for the state of proliferative donor nonresponsiveness [19].

In a previous study [20], we reported for the first time that patients with CR display a lower number of CD4⁺CD25^{high} blood T cells than patients with long-term stable graft function and healthy volunteers (HV), but that these cells expressed normal levels of CTLA4, GITR, CCR4 and CD103 markers associated with Treg activity [21,22]. Operationally tolerant patients, on the other hand, had numbers similar to HVs, indicating that operational tolerance is not characterized by an increase in peripheral blood Treg numbers. Here, we further explored the profile of CD4⁺CD25^{high} blood T cells in renal transplant patients with late graft acceptance or rejection,

focusing on their expression of the Treg master gene Forkhead Box P3 (FOXP3) as well as their suppressive function.

Materials and methods

Patients

Peripheral blood samples were collected from 44 adult renal transplant recipients and 10 normal adult controls. The protocol was approved by the University Hospital Ethical Committee. All patients gave informed consent. The clinical history of the patients is outlined in Table 1. Note that because of the rarity of some patients (those with operational tolerance patients) and because the experiments span several years, the different analyses were not performed on all patients.

Drug-free operationally tolerant recipients (DF-Tol)

Drug-free operationally tolerant recipients (*n* = 7) were patients with a stable kidney graft function (blood creatinemia <150 µmol/l and proteinuria <1 g/24 h) in the absence of IS for at least 1 year (range: 2–17). Immunosuppressive treatment was stopped due to noncompliance (*n* = 5), post-transplant lymphoproliferative disorder (*n* = 1) or calcineurin inhibitor toxicity (*n* = 1). The clinical parameters of these patients have been described in detail elsewhere [11]. Because of their normal and stable

Table 1. Patient demographics and clinical data: recipients with chronic rejection (CR) and patients with long-term graft survival with (Sta) or without immunosuppression (IS) (drug-free operationally tolerant patients) were matched for age. Cockroft creatinine clearance and proteinuria were measured on the day of blood sampling. Data are presented as median (range).

Group	CR	Stable	Operationally tolerant
<i>n</i>	22	15	7
Recipient age in years: mean ± SD (range)	51.9 ± 13 (28–76)	50.4 ± 8.9 (33–66)	54.6 ± 16.3 (38–76)
Gender ratio (M:F)	7:15	6:9	5:2
Cockroft Creatinine clearance ml/min: mean ± SD (range)	26.4 ± 13.9 (10.4–69.3)	75.2 ± 35.9 (46.9–135)	66.3 ± 23 (38–97)
Proteinuria g/24 h: mean ± SD (range)	2.1 ± 2.2 (0.12–7.75)	0.1 ± 0.2 (0–0.48)	0.4 ± 0.5 (0–1)
Time post-transplantation in yrs: mean ± SD (range)	7.3 ± 4.4 (2–17)	7.6 ± 3.3 (4–17)	15.4 ± 6.1 (5–33)
C4d+ biopsy	Yes 11/20 NA 2/22	NA	NA
Circulating HLAAb	Yes 14/22	0/22	Yes 1/6 NA1/7
Transplant Glomerulopathy	Yes 20/22	NA	NA
Banff c grade	Ib-IIIb	NA	NA
IS protocol	Anti-metabolite: MMF: 17/22 CNI: CsA: 22/22 Steroids: 8/22	Anti-metabolite: Aza: 2/15 MMF: 11/15 CNI: CsA: 15/15 Steroids: 1/15	None for 8.9 ± 5.3 years (2–17)

NA, not applicable; Aza, azathioprine; MMF, mycophenolate mofetil; CNI, calcineurin inhibitor; CsA, cyclosporin A.

graft function and in the light of recommendations made by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks, no biopsies were taken from these patients (Table 1).

Patients with stable graft function under standard IS (Sta) (n = 15)

Stable patients had stable graft function under standard IS with a creatinemia <150 µM/l and proteinuria <1 g/24 h for at least 3 years. No biopsies were available for these patients as they presented no deterioration of graft function (Table 1).

Patients with CR (n = 22)

These patients exhibited a progressive deterioration of their renal function under standard IS with a proteinuria >1 g/24 h and a creatinemia >150 µM/l. CR, including chronic active antibody-mediated rejection and T-cell mediated CR, was diagnosed on a graft biopsy according to the updated Banff classification criteria [4,5]. CR was defined by histological signs of chronic allograft arteriopathy (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell infiltration) and/or transplant glomerulopathy with glomerular double contours. Twenty of 22 patients had a transplant glomerulopathy, nine of 22 had an active humoral component as demonstrated by the presence of C4d together with circulating anti-HLA antibodies.

Healthy volunteers

Age-matched HVs (n = 10; mean age: 47.4 ± 7.5 years; range: 36–61; sex 2 M/8 F) were included as controls (Table 1). All had a normal blood formula and no infectious or other concomitant pathology for at least 6 months prior to the study.

Materials

Isolation and purification of blood cell subsets from PBMC

Venous blood samples were collected in EDTA test tubes and processed for analysis within 6 h. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll hypaque gradient (Eurobio, Les Ulis, France). CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{low} T cells were either sorted with microbeads (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) or using a high throughput FACSaria cytofluorometer (BD Biosciences) using CD25-alexa 647, CD4-FITC, and CD127-PE antibodies (BD Biosciences). Purity was systematically >95%.

Reagents and FACS analysis

All patients and healthy individuals were first examined for complete blood count and screened for the presence of CD4⁺CD25^{high} T cells by flow cytometry as described elsewhere [20]. Antibodies were purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) (CD25-PE and PC5) Beckman Coulter (Marseille, France) (CD4-FITC) and BD Biosciences (Mountain View, CA, USA) (CD3-PC7 and PC5, CD4-APC). Staining for intracellular FOXP3 protein was performed on PBMC with the PE-conjugated FOXP3 (PCH101) antibody according to the manufacturer's instructions (eBioscience, Clinisciences, San Diego, CA, USA). Peripheral CD4⁺CD25^{high} T cells were analyzed by direct whole blood staining (Beckman Coulter Marseille, France). Flow cytometry was performed on a FACSCalibur with CELL QUEST PRO software (BD Biosciences).

CD4⁺CD25^{high} T cell proliferation

Experiments were performed on seven Sta (mean age: 51.7 ± 7.2 years; range: 45–63; sex: 4 M/3 F; Cockcroft creatinine clearance 67.2 ± 12 ml/min; proteinuria: 0.1 ± 0.2 g/24 h), nine CR (mean age: 51.9 ± 14 years; range: 28–75; sex 2 M/7 F; Cockcroft creatinine clearance 33.1 ± 17.4 ml/min; proteinuria: 2.4 ± 2.2 g/24 h), five DF-Tol (mean age: 52.8 ± 16 years; range: 38–76; sex: 4 M/1 F; Cockcroft creatinine clearance 67.5 ± 26.7 ml/min; proteinuria: 0.4 ± 0.5 g/24 h) and eight HV (mean age: 48.7 ± 8.8 years; range: 36–61; sex 2 M/6 F). Proliferation assays were performed by stimulating CD4⁺CD25^{high} T cells with autologous irradiated (35 Gy) PBMC. Autologous-irradiated PBMC (20 000 cells) were cocultured for 72 h with CD4⁺CD25^{high} T cells (20 000 cells) in duplicate wells in round bottom 96-well plates previously coated overnight at 4°C with 1 µg/ml CD3 monoclonal antibody (mAb) (Orthoclone OKT3[®], Janssen-Cilag, Neuss, Germany). Cells were pulsed for the final 8 h of culture with 1 µCi per well of [3H] thymidine (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Cells were harvested and counted in a scintillation counter.

Autologous CD4⁺CD25^{high} T cell suppressive activity [autologous mixed lymphocyte reaction (MLR)]

Experiments were performed on seven Sta (mean age: 51.7 ± 7.2 years; range: 45–63; sex: 4 M/3 F; Cockcroft creatinine clearance 67.2 ± 12 ml/min; proteinuria: 0.1 ± 0.2 g/24 h), nine CR (mean age: 51.9 ± 14 years; range: 28–75; sex 2 M/7 F; Cockcroft creatinine clearance 33.1 ± 17.4 ml/min; proteinuria: 2.4 ± 2.2 g/24 h) five DF-Tol (mean age: 52.8 ± 16 years; range: 38–76; sex:

4 M/1 F; Cockcroft creatinine clearance 67.5 ± 26.7 ml/min; proteinuria: 0.4 ± 0.5 g/24 h) and eight HV (mean age: 48.7 ± 8.8 years; range: 36–61; sex 2 M/6 F). Patients were included according to the number of available PBMC. CD4⁺CD25⁻ T cells (20 000 cells) were stimulated in the presence of 20 000-irradiated autologous PBMC in duplicate in round bottom 96-well plates previously coated overnight at 4°C with 1 µg/ml CD3 mAb (Orthoclone OKT3®). CD4⁺CD25^{high} T cells were added at CD25⁻: CD25^{high} T-cell ratios ranging from 1:1 to 1:4. Cultures were performed in medium alone or in the presence of recombinant human IL2 (Proleukin®, Chiron Corporation, Emeryville, CA, USA), anti-IL10 (R&D Systems, Abingdon, UK) or anti-TGFβ (clone 2 G7) at a final concentration of 100 U/ml, 1 µg/ml, and 10 µg/ml, respectively. After 72 h of coculture, cells were pulsed for 8 h with 1 µCi per well of [³H] thymidine (Amersham Biosciences). Cells were harvested and counted in a scintillation counter. Culture medium consisted of RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 10% heat-inactivated human serum (Sigma, St Louis, MO, USA). Absence of activated cells within the CD4⁺CD25^{high} population was confirmed by their inability to proliferate or produce IFNγ, or absence of expression of CD127.

Cytokine production

IFNγ, IL1β, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, TNFα and TNFβ protein levels were measured in supernatants of CD4⁺CD25⁻ MLRs before and after addition of CD4⁺CD25^{high} T cells (ratio 1:1; stimulation with irradiated autologous PBMC cells and CD3 mAb) after 24 h of culture, using a multiplex fluorescent bead immunoassay, the FlowCytomix Multiplex human Th1/Th2 Kit II (Bender MedSystems, Tebu-bio, France). Samples were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. For each cytokine, the minimum detectable level was indicated by the manufacturer (BD Biosciences).

Statistical analysis

Data were presented as mean ± SD. The comparisons among the three groups of patients were performed by using a nonparametric one-way ANOVA Kruskal–Wallis' test and Dunn's test for multiple comparisons. The Mann–Whitney test was used for comparisons between two groups. Values of $P < 0.05$ were considered as significant.

Results

Contrasting peripheral blood CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cell numbers in long-term graft acceptance versus rejection: decreased numbers in CR

We previously showed that patients with CR have lower CD4⁺CD25^{high} blood T-cell numbers than patients with drug-free operational tolerance and HVs, but that these cells display the same phenotype as the two other groups in terms of expression of the classical Treg markers CTLA4, GITR, CCR4 and CD103 [20]. Given that CD25 is also a marker of activated T cells; here, we additionally analyzed the number of cells co-expressing the Treg master gene FOXP3. We found a decrease in the number of CD4⁺ T cells co-expressing CD25⁺ and FOXP3 in CR patients (CR: 10.4 cells/µl of blood) compared with operationally tolerant patients (DF-Tol: 26.5 cells/µl of blood, $P < 0.01$) healthy individuals (HV: 24.3 cells/µl of blood, $P < 0.007$) (Fig. 1a) and patients with stable graft function (Sta: 18.2 cells/µl of blood, $P < 0.01$). Nevertheless, no difference was observed in actual FOXP3 expression within the purified CD4⁺CD25^{high} blood T-cell population itself (Fig. 1b), suggesting that the difference observed within the CD4⁺ T-cell population simply reflects a difference in the corresponding cell numbers between the different groups.

Thus, patients with CR display fewer CD4⁺CD25^{high}-FOXP3⁺ blood T cells, but these cells have the same amount of intracellular FOXP3 as those from operationally tolerant patients, patients with stable graft function under standard IS and healthy individuals.

Normal capacity of peripheral blood CD4⁺CD25^{high} T cells from patients with CR to suppress proliferation of autologous CD4⁺CD25⁻ T cells

A lack of viable donor cells for the patients included for study precluded the possibility of testing anti-donor specific responses. We thus used a conventional approach to examine the functional regulatory capacity of CD4⁺CD25^{high} T cells of the different patients by assessing their ability to suppress the proliferation and cytokine production of anti-CD3-stimulated autologous CD4⁺CD25⁻ T cells. CD4⁺CD25^{high} T cells were purified either using immuno-magnetic beads, a technique routinely used to purify potent Treg [23], or by high throughput cell sorting with a FACSAria cytofluorometer using the CD4, CD25, and CD127 markers. Lack of CD127 expression has recently been identified as a hallmark of Treg [24]. As shown in Fig. 2, the level of proliferation of the CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} T cell populations did not significantly differ between the different groups of patients. A strong CD4⁺CD25⁻ T cell

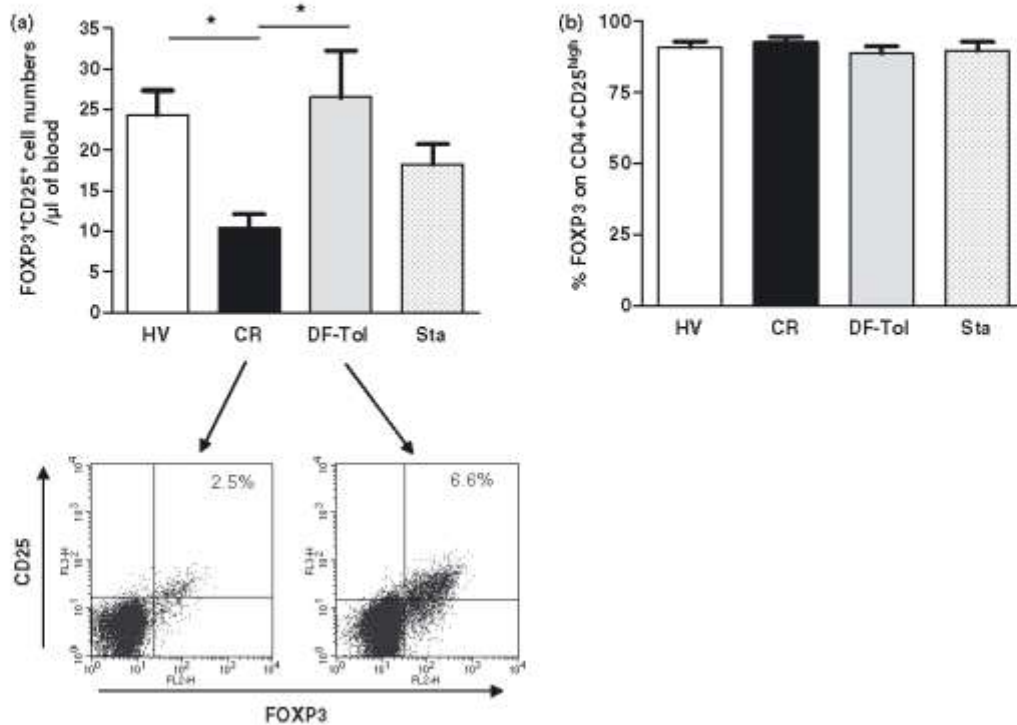


Figure 1 Forkhead Box P3 (FOXP3) expression by FACS analysis: FOXP3 protein was measured on CD4⁺CD25⁺ T cells by intracellular staining. (a) CD4⁺ T cells were double stained with anti-CD25 and anti-FOXP3 antibodies. Absolute numbers of CD25⁺FOXP3⁺ T cells were calculated for healthy individuals (HV, $n = 10$), patients with chronic rejection (CR, $n = 22$), patients with drug-free operational tolerance ($n = 7$) and patients with stable long-term graft survival under immunosuppression (Sta, $n = 15$). (b) Percentage of FOXP3 protein expression by CD4⁺CD25^{high} T cells. *, indicates $P < 0.05$.

proliferative response was obtained by day 3 of activation whereas the CD4⁺CD25^{high} population of the different patient groups poorly proliferated in the same culture conditions. CD4⁺CD25^{high} unresponsiveness was reversed in all cases by addition of IL2, suggesting a state of anergy (Fig. 2).

Analysis of the global percentage of inhibition for each group revealed no statistically significant variations, with an average of $67 \pm 11.1\%$ for HVs, $69.7 \pm 7.4\%$ for operationally tolerant patients, $78.6 \pm 13.7\%$ for patients with stable graft function under standard IS and $65.6 \pm 19.5\%$ for CR patients (Fig. 3a). Thus, on a per cell basis (effector:responder ratio of 1:1), CD4⁺CD25^{high} T cells from patients with CR display no intrinsic deficit in their suppressive properties compared with the same cells from kidney transplant recipients with long-term graft survival and HVs. Moreover, operationally tolerant patients display no increase in suppressive capacity compared with the HVs and the different groups of transplant patients.

The inhibitory capacity of the CD4⁺CD25^{high} T cells was dose-dependent (almost maximal suppression at a 1:1 ratio; Fig. 3b), and independent of IL10 and TGF β , as

blocking antibodies had no effect (Fig. 3c). Finally, this suppressive activity was stable over time (Fig. 4).

Normal capacity of peripheral blood CD4⁺CD25^{high} T cells from patients with CR to suppress IFN γ production by autologous CD4⁺CD25⁻ T cells

We next analyzed the ability of CD4⁺CD25^{high} T cells to suppress cytokine production by CD4⁺CD25⁻ responder cells in the different groups of patients. After 24 h of culture, CD4⁺CD25^{high} T cells from the different groups of patients produced no detectable levels of the cytokines analyzed. Similarly, no detectable levels of IL12p70, IL2, IL4, IL5 and TNF β were produced by CD4⁺CD25⁻ T cells. On the other hand, IL8, IL10, IL1 β , IL6 and TNF α were variably secreted by CD4⁺CD25⁻ T cells, but this production was unaltered by coculture with the CD4⁺CD25^{high} population in the different groups (*data not shown*).

Whereas CD4⁺CD25^{high} T cells produced undetectable levels of the Th1 cytokine IFN γ , the amount of IFN γ secreted by the CD4⁺CD25⁻ T-cell population did not

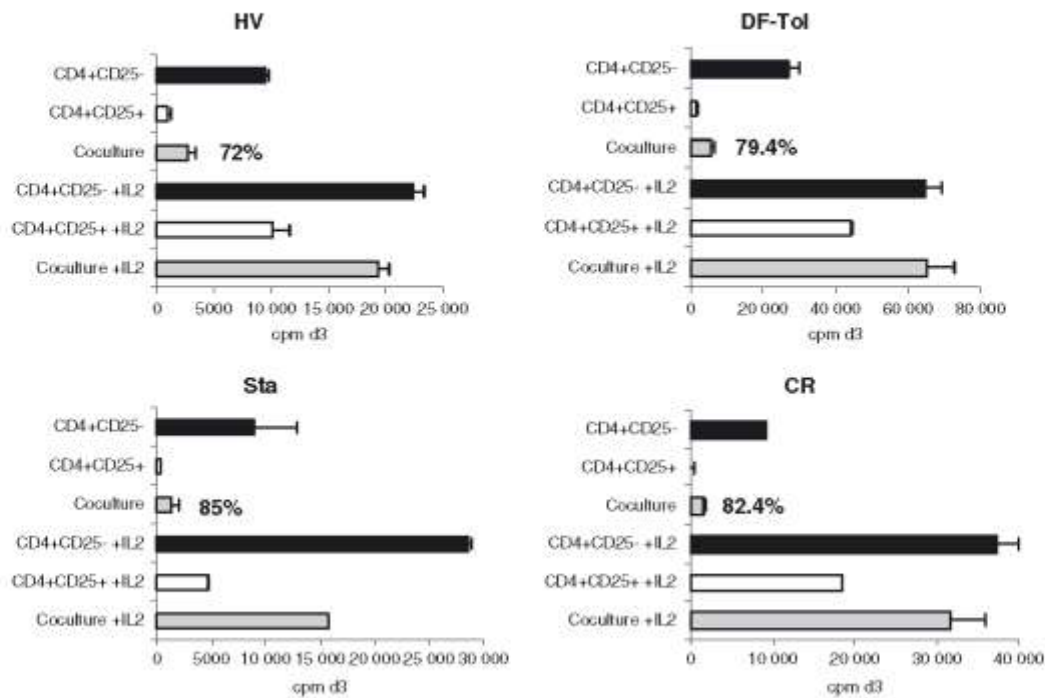


Figure 2 CD4⁺CD25^{high} T-cell suppressive activity in kidney recipients and healthy volunteers (HV). The ability of CD4⁺CD25^{high} T cells freshly isolated from HV, patients with chronic rejection, drug-free operationally tolerant patients and patients with stable renal function under standard immunosuppression (Sta), to suppress CD4⁺CD25⁻ T-cell responders was assessed (autologous mixed lymphocyte reaction). Responder cells were activated in the presence of 20 000-irradiated (35 Gy) autologous peripheral blood mononuclear cells plus anti-CD3 monoclonal antibody (1 µg/ml) (see Methods for details). CD4⁺CD25^{high} T cells were added (ratio 1:1) to CD4⁺CD25⁻ T-cell responder cells and [³H]-thymidine incorporation was measured after 72 h. When indicated, IL2 was added at 100 U/ml. Each proliferation assay was carried out in duplicate (SD). Each experiment is representative of all the experiments in the different groups of patients and HVs. Percentages indicate inhibition of proliferation.

differ between patients with CR (mean: 182.73 pg/ml; range: 18–604) and those with stable graft function under standard IS (mean: 187.65 pg/ml; range: 53–322) (Fig. 5). Finally, CD4⁺CD25^{high} T cells from patients with CR were able to inhibit the secretion of IFN γ , which typically occurs following CD4⁺CD25⁻ T-cell activation, to the same extent as those from patients with stable graft function under IS and HVs (Fig. 5).

Discussion

There is now compelling evidence that CD4⁺CD25^{high} T cells may be involved in regulating the immune system and particularly in determining transplant outcome [12]. We have previously shown that patients with CR display lower numbers of CD4⁺CD25^{high} blood T cells compared with operationally tolerant patients and healthy individuals, but that these cells express normal levels of the typical Treg markers CTLA4, GITR, CCR4 and CD103 [20]. In the present study, we further investigated the FOXP3 profile and the suppressive function of peripheral blood

CD4⁺CD25^{high} T cells in patients with long-term kidney graft acceptance or rejection compared with HVs.

Forkhead Box P3 has been shown to play a major role in the differentiation of CD4⁺CD25^{high} Tregs and to be expressed constitutively at high levels in these cells [25]. Mutations in the FOXP3 gene are associated with autoimmune pathologies in humans [26] and its role in transplantation has now been clearly demonstrated [27]. However, some recent evidence suggests a transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells while it is stably expressed in natural CD4⁺CD25⁺ Treg cells [28–31]. Nevertheless, this temporary expression in T effector cells was insufficient to suppress expression of reported targets of FOXP3 repressor activity, including CD127, IL-2, and IFN γ . Thus, expression of FOXP3 would be a normal consequence of CD4⁺ T-cell activation and, in humans, it can no longer be used as an exclusive marker of nTregs.

We report here that, when assessed on a per cell basis, the level of FOXP3 protein in peripheral blood CD4⁺CD25^{high} T cells is equivalent between renal trans-

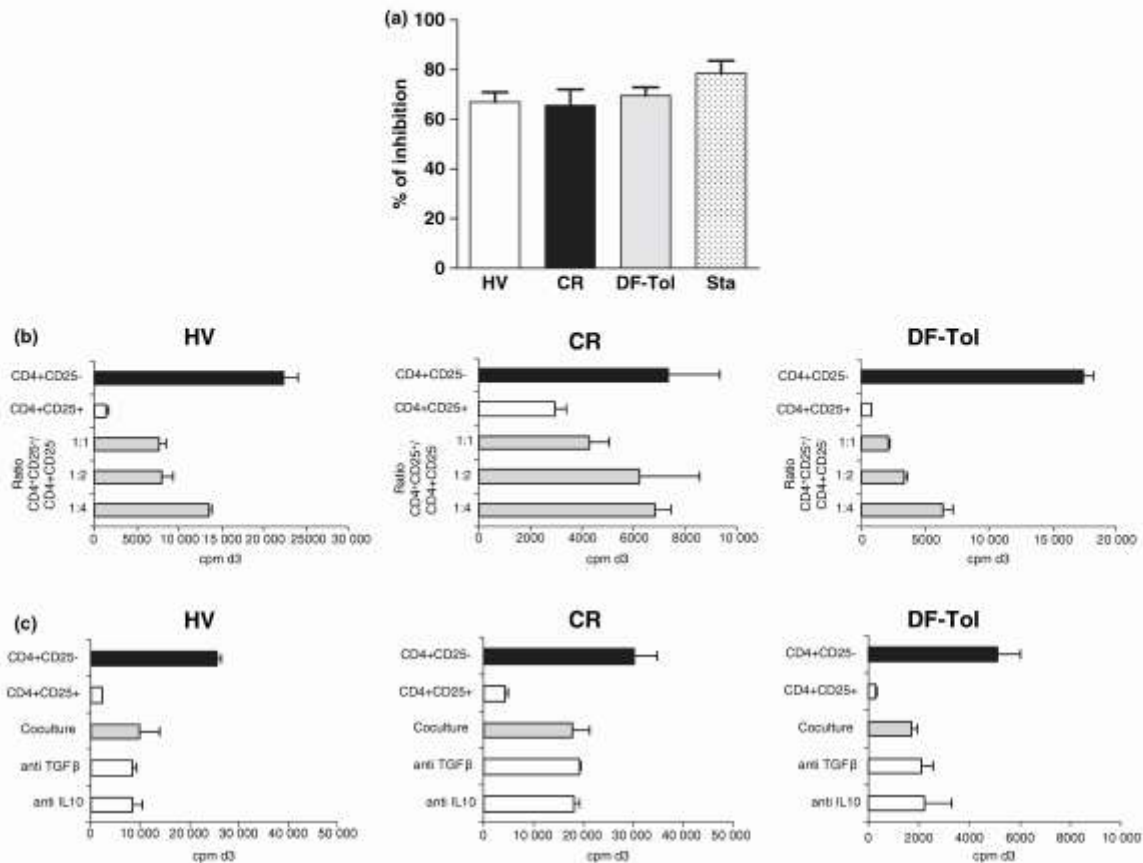


Figure 3 CD4⁺CD25^{high} T-cell suppressive activity in autologous mixed lymphocyte reaction. (a) Average inhibition of proliferation in healthy volunteers (HV) (*n* = 8), Drug-free operationally tolerant recipients (*n* = 5), standard immunosuppression (*n* = 7), and chronic rejection (*n* = 9) with a 1:1 ratio of CD4⁺CD25^{high}/CD4⁺CD25⁻ T cells. (b) Dose-dependent suppression. CD4⁺CD25⁻ cells and CD4⁺CD25^{high} T cells were cultured at various ratios, with anti-CD3 and irradiated autologous peripheral blood mononuclear cells. In the coculture, the number of CD4⁺CD25⁻ responder cells was constant whereas the number of CD4⁺CD25^{high} T cells varied by serial twofold dilutions. [³H] thymidine incorporation was measured after 72 h. (c) Effect of the addition of anti-IL10 (1 μg/ml) and anti-TGFβ (10 μg/ml) antibodies to the coculture. Each proliferation assay was carried out in duplicate (SD).

plant patients with long-term graft acceptance or rejection and HVs, but that patients with CR display fewer FOXP3CD4⁺CD25^{high} T cells, suggesting that Treg numbers in the periphery may influence long-term graft outcome.

Because both deficient numbers [15,16] and function [17,32,33] of CD4⁺CD25⁺ T cells have been reported in the induction or evolution of different pathologies, we next investigated whether the decreased numbers of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells in patients with CR is additionally associated with impaired suppressive properties. Given the lack of viable donor cells, which precluded the possibility of testing anti-donor-specific responses, we used a conventional approach to examine the regulatory capacity of CD4⁺CD25^{high} T cells of these patients by

assessing their ability to suppress the proliferation and cytokine production of stimulated autologous CD4⁺CD25⁻ T cells *in vitro*. As could be expected for Treg, the CD4⁺CD25^{high} T cells from the different groups of patients were unresponsive to anti-CD3 and autologous PBMC activation, unless IL2 was present, in contrast to their CD4⁺CD25⁻ counterparts that proliferated vigorously. Although in humans activated T cells can also express the FOXP3 marker [34,35], the CD4⁺CD25^{high} T cells we isolated from the different patient groups displayed all the classical functional properties of regulatory cells (low proliferation, absence of IFNγ production and inhibition of proliferation and IFNγ production by CD4⁺CD25⁻ effectors in response to stimulation). To further ensure the selection of Treg without contaminating

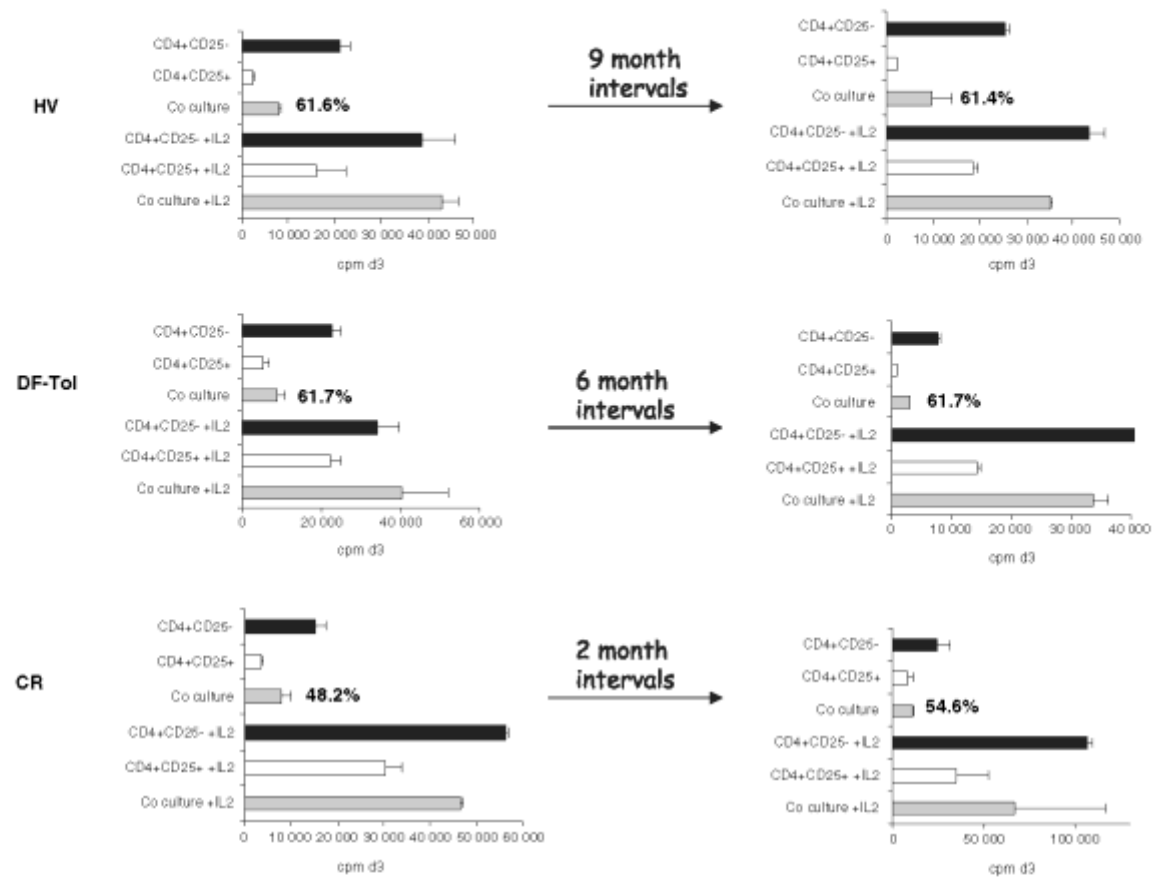


Figure 4 Stability of the suppressive activity of CD4⁺CD25^{high} T cells over time. The ability of CD4⁺CD25^{high} T cells, freshly isolated from healthy volunteers (HV), standard immunosuppression, drug-free operationally tolerant recipients (DF-Tol) and chronic rejection (CR) recipients, to suppress CD4⁺CD25⁻ T cells responders was assessed over time, as described in the legend to Figure 2. Graphs show one HV with a 9-month interval, one DF-Tol with a 6 month interval and one CR with a 2-month interval. Each experiment is representative of all experiments in the different groups of patients. Percentages indicate inhibition of proliferation. Each proliferation assay was carried out in duplicate (SD).

effectors, the CD4⁺CD25^{high} T cells were additionally selected on the basis of their absence of CD127 expression, a characteristic of human Treg [24]. The lack of effect of IL10 and TGFβ-blocking antibodies on the suppressive function of the CD4⁺CD25^{high} T cells used in our assay indicates that these were indeed natural Tregs that have been shown to nonspecifically suppress the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells in a contact-dependant manner [36]. This is further supported by the finding that CD4⁺CD25^{high} T cells had no effect on the production of IL10 by CD4⁺CD25⁻ T cells in the different groups of patients.

Our results show that despite being present at lower numbers in CR patients, CD4⁺CD25^{high} FOXP3⁺ T cells from these patients did not display an intrinsic defect in their suppressive properties, as shown by their ability to

suppress both the proliferation and IFNγ production of autologous CD4⁺CD25⁻ T cells in the same way as those from patients with stable, well-functioning grafts under standard IS, operationally tolerant patients and HVs. Thus, despite previous reports of Treg function being influenced by the immunosuppressive regimen [37–39], our results show that the suppressive activity of the CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells studied here was not influenced by presence or absence of IS. However, we could not exclude that CR patients may have fewer Tregs because they received higher doses of immuno-suppressive drugs. Unfortunately, the analyses of Treg numbers had not been performed before transplantation to determine whether patients with low numbers of Tregs would be prone to develop CR. Moreover, our previous data in patients with renal insufficiency showing normal Treg

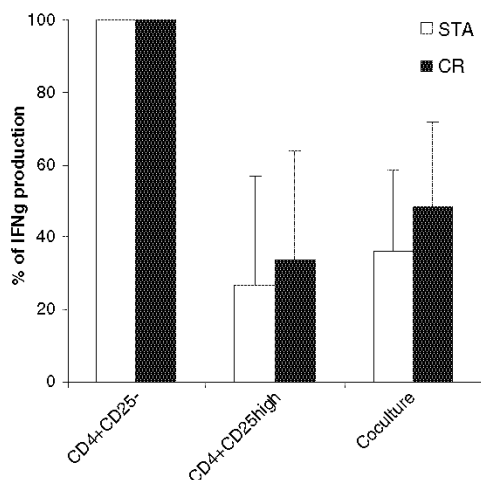


Figure 5 Interferon γ (IFN γ) production in culture supernatants from stable patients and patients with chronic rejection. Cytokines were measured by cytometric bead array (see Methods for details) after 24 h of culture in supernatants from CD4⁺CD25⁻ T cells, CD4⁺CD25^{high} T cells and from the coculture (ratio 1:1) following stimulation with irradiated autologous peripheral blood mononuclear cells and with CD3 monoclonal antibody. The percentage of IFN γ production in supernatants was calculated with the quantity of IFN γ produced by CD4⁺CD25⁻ cells being represented as 100%.

numbers suggest that the change in circulating T regulatory cell numbers in CR recipients is not a consequence of renal impairment [20].

Finally, these data also show that kidney transplant patients with operational tolerance not only display normal numbers of circulating CD4⁺CD25^{high} T cells as we reported previously [20], but also their natural CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ blood T cells exhibit normal suppressive properties *in vitro*. Thus, operational tolerance is not characterized by increased natural Treg activity. Nevertheless, this does not exclude a role for other types of Treg in maintaining tolerance. For example, recent data suggest that two distinct classes of human CD4⁺ Tregs may participate in kidney transplant tolerance: CD4⁺TGF β 1⁺CD25^{+/-} T cells that are mainly localized to the tubulo-interstitium of the allograft and absent from the circulation [40], and CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ natural Tregs that can be found in lymphoid aggregates within the accepted allograft [40] as well as in the periphery [23].

On the other hand, it may not be absolute Treg numbers that are important, rather ratios of Treg to T effectors. This is corroborated by several reports suggesting that graft outcome may be linked to a disruption of the Treg/T effector ratio [41], a concept also reported in

operational tolerance [40]. Along these lines, we previously showed that in addition to displaying lower Treg numbers, patients with CR display more CD8⁺CD28⁻CD27⁻ T cells with a cytotoxic and apoptotic phenotype, whereas a normal ratio of these cells was observed in patients with operational tolerance [42]. The latter data, together with those described here, suggest that an imbalance between CD4⁺CD25^{high} Tregs and effector CD8⁺CD28⁻CD27⁻ T cells may favor graft failure [41] whereas a balance similar to that observed in HVs may favor graft acceptance. Prospective studies are now necessary to determine whether patients who eventually develop CR are predisposed to do so because of peripheral blood T-cell imbalances at the time of transplantation.

To conclude, our data show that CR is associated with a decrease in CD4⁺CD25^{high} T-cell numbers but that these cells display normal immuno-regulatory properties. Graft acceptance on the other hand is associated with CD4⁺CD25^{high} T-cell numbers similar to HVs. Thus, Treg numbers or potentially the balance of Treg to T effectors may contribute to determining the long-term fate of renal transplants.

Acknowledgements

These results were presented in part at the XX International Congress of the Transplantation Society, 2004, Vienna, Austria (young investigator Award); at the American Transplant Congress, 2005, Seattle; USA; and at the 7th International Conference on New Trends in IS and Immunotherapy, 2006, Berlin, Germany.

Authorship

CB: performed research/study and wrote the paper. MR: performed research/study. MG: collected patients. SL: performed research/study. AM: analyzed histological data. LB: sorted cells. MH: sorted cells. JA-C: did English correction. J-PS: designed research/study. SB: designed research/study and wrote the paper.

References

1. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2326.
2. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later – progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2761.
3. Ballet C, Giral M, Ashton-Chess J, Renaudin K, Brouard S, JP S. Chronic rejection of human kidney allografts. *Expert Rev Clin Immunol* 2006; **2**: 393.

4. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, *et al.* Banff '05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; **7**: 518.
5. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1562.
6. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; **81**: 643.
7. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1741.
8. Dantal J, Houmamt M, Cantarovich D, *et al.* Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998; **351**: 623.
9. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, *et al.* Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999; **397**: 530.
10. Souillou JP, Giral M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 2001; **12**(Suppl.): S89.
11. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; **6**: 736.
12. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 199.
13. Bluestone JA, Tang Q. How do CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005; **17**: 638.
14. Chatila TA Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **116**: 949; quiz 60.
15. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, *et al.* Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 2004; **77**: 762.
16. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2004; **103**: 3428.
17. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; **199**: 971.
18. Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Chaudhry AN, Lechler RI. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1652.
19. Velthuis JH, Mol WM, Weimar W, Baan CC. CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells can mediate donor nonreactivity in long-term immunosuppressed kidney allograft patients. *Am J Transplant* 2006; **6**: 2955.
20. Louis S, Braudeau C, Giral M, *et al.* Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; **81**: 398.
21. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2005; **24**: 209.
22. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; **299**: 1057.
23. Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; **212**: 203.
24. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, *et al.* Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; **203**: 1693.
25. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 330.
26. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, *et al.* Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1713.
27. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2342.
28. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, *et al.* Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007; **19**: 345.
29. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 129.
30. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, *et al.* Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 6659.
31. Walker MR, Kasprovicz 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.
32. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 92.
33. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, *et al.* Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005; **174**: 164.
34. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, *et al.* The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3276.
35. Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 4103.
36. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occur-

- ring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; **212**: 60.
37. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, *et al.* Inhibition of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 2006; **108**: 390.
38. Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, *et al.* Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation* 2005; **80**: 110.
39. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Hilbrands LB, Joosten I. Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27⁺ subset of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Blood* 2006; **107**: 1018.
40. Xu Q, Lee J, Jankowska-Gan E, *et al.* Human CD4⁺CD25^{low} adaptive T regulatory cells suppress delayed-type hypersensitivity during transplant tolerance. *J Immunol* 2007; **178**: 3983.
41. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, Domenig C, Sayegh MH, Strom TB. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 2003; **19**: 503.
42. Baeten D, Louis S, Braud C, *et al.* Phenotypically and functionally distinct CD8⁺ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 294.

Article 2

ETUDE DU ROLE DE SMILE, SUREXPRIME DANS LE SANG DES PATIENTS TRANSPLANTES RENAU
PRESENTANT UNE TOLERANCE OPERATIONNELLE A LEUR ALLOGREFFE

Par: Maud Racapé, Jean-Paul Duong Van Huyen, Richard Danger, Magali Giral, Annaïck Pallier, Françoise Bleicher, Paul Pilet, Petra Tafelmeyer, Joanna Ashton-Chess, Emilie Dugast, Ségolène Pettré, Béatrice Charreau, Jean-Paul Soullillou and Sophie Brouard

En soumission dans *PLoS ONE*

Titre original : Deciphering the Role of SMILE, Over-Expressed in the Blood of Operationally Tolerant Kidney Recipients

Deciphering the Role of SMILE, Over-Expressed in the Blood of Operationally Tolerant Kidney Recipients

Maud Racapé¹, Jean-Paul Duong Van Huyen², Richard Danger¹, Magali Giral¹, Annaïck Pallier¹, Françoise Bleicher³, Paul Pilet⁴, Petra Tafelmeyer⁵, Joanna Ashton-Chess¹, Emilie Dugast¹, Ségolène Pettré¹, Béatrice Charreau¹, Jean-Paul Soulillou¹ and Sophie Brouard^{1*}

1 INSERM UMR 643, Centre Hospitalier Universitaire, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, 44 093 Nantes, France and Université de Nantes, Faculté de Médecine, 44 000 Nantes, France **2** INSERM, U970, PARCC, Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Paris Descartes, 75 908 Paris, France, **3** Faculté d'Odontologie, UMR CNRS 5242, 69 364 Lyon, France, **4** Faculté d'Odontologie, INSERM EMI 9903, 44 042 Nantes, France, **5** Hybrigenics S.A., 75 014 Paris, France

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sophie.brouard@univ-nantes.fr

Running title : SMILE in transplantation

ABSTRACT

Background

The state of operational tolerance has been detected sporadically in some renal transplanted patients that stopped immunosuppressive drugs, demonstrating that allograft tolerance might exist in humans. Several years ago, a study by Brouard *et al.* identified a molecular signature of several genes that were significantly differentially expressed in the blood of such patients compared with patients with other clinical situations. The aim of the present study is to analyze the involvement of one of these molecules over-expressed in the blood of patients with drug-free long term graft function, SMILE or TMTC3, a protein whose function is still unknown.

Methodology/Principal Findings

We first confirmed that SMILE mRNA is increased in the blood of patients with drug-free long term graft function. Using a yeast two-hybrid approach we furthermore report an *in vitro* interaction of SMILE with PDIA3, an endoplasmic reticulum (ER) resident molecule. In accordance with this observation, SMILE silencing in HeLa cells was correlated to the modulation of several transcripts involved in proteolysis and decreased proteasome activity. Finally, the down-regulation of SMILE increased HeLa cells sensitivity to the proteasome inhibitor Bortezomib that induces ER stress *via* protein overload and increased transcript expression of a stress response protein, XBP1.

Conclusion/Significance

This study confirms the potential interest of SMILE as a biomarker of tolerance and we suggest that ER stress and SMILE could have an impact on long term graft survival. Learning more about this molecule and stress resistance in transplantation may reveal new pathways of regulation in long term graft acceptance and may increase our understanding of tolerance.

INTRODUCTION

The routine monitoring of renal allograft survival in human is depending on functional clinical parameters such as blood creatinine clearance, proteinuria level, on the presence of circulating anti-HLA and donor specific antibodies and scoring of intra-graft lesions revealed by the biopsy. Usual immunosuppressive drugs are not specific, increase opportunistic infections and malignancies and can be nephrotoxic (Dantal and Souillou, 2005). Immune tolerance, which has been achieved in several experimental models (Kingsley *et al.*, 2007) might provide a means of avoiding such inherent problems since immunosuppressive treatment might be diminished or completely halted in tolerant patients. If this phenomenon (induced or “spontaneous”) remains rare in renal transplantation in primate and human, several studies have shown its clinical feasibility (Roussey-Kesler *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2008; Porcheray *et al.*, 2009). Identifying and understanding the biological features characterizing these operationally tolerant patients may unveil molecular mechanisms allowing these patients to tolerate their graft without immunosuppression treatment. We previously identified a list of 49 genes differentially expressed in blood of operationally tolerant patients compared to stable patients under classical immunosuppressive therapy, to patients with a chronic antibody-mediated rejection and to healthy volunteers (Brouard *et al.*, 2007). These genes were shown to be able to correctly classify most of the patients according to their status. Among these genes, we focused on SMILE, also called TMTC3 (transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3 protein), because it belongs to the 13 over-expressed-genes in blood from operationally tolerant patients and because its function was still unknown. SMILE is a 7203 bp mRNA (NM_181783) and a 914 amino acids transmembrane protein (NP_861448). This protein presents the particularity of 10 tetratricopeptide repeats (TPRs,

according to the UniProtKB website, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6ZXV5>), a pattern ubiquitously conserved through evolution and species. The TPR-containing proteins are involved in several cellular functions such as molecular chaperone complexes, anaphase promoting complexes, transcription repression complexes, protein import complexes and protein folding (Blatch and Lassle, 1999). They are found in a variety of different organisms and present various sub-cellular locations such as cytosol, nucleus, mitochondria and peroxisomes (Blatch and Lassle, 1999). The involvement of these motifs and the importance of their interactions for molecular and cellular functions have thus been shown in a number of different biological systems (Blatch and Lassle, 1999).

The aim of our study was to analyse the potential relevance of the presence of SMILE in the blood of operationally tolerant patients by studying its molecular function *in vitro* and the global patterns in which this molecule is involved. In this study we confirm the potential interest of SMILE as a biomarker of operational tolerance and we report that SMILE interacts with PDIA3, a molecule involved in protein folding. We showed that SMILE is involved in ER stress responses, that might have a direct or indirect impact on long term graft survival.

RESULTS

Identification of SMILE as a potential blood biomarker of operationally tolerant kidney transplant patients.

In order to confirm previously defined SMILE mRNAs over-expression in blood of operationally tolerant patients by microarrays (Brouard et al., 2007), SMILE mRNA level was analysed in PBMCs of healthy volunteers (HV, n=11), of operationally tolerant patients with drug-free long term graft function (TOL, n=8) of patients under standard immunosuppressive therapy with either stable graft function (STA, n=9) or deteriorating graft function with biopsy-proven chronic antibody-mediated rejection (CAMR, n=15). As shown in Figure 1A, SMILE mRNAs were significantly increased in PBMCs of TOL patients compared with STA patients ($p < 0.05$). The capacity of SMILE to distinguish between patients with drug-free long term graft function and stable patients (Figure 1B) was studied by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. This analysis revealed a very good discriminative power for SMILE to distinguish TOL patients from STA patients with an optimal threshold of 1.23 (area under the curve [AUC] = 0.98; 95% confidence interval 0.95 to 1, good sensitivity of 1 and good specificity of 0.93).

Furthermore, on a homogeneous cohort of 164 stable patients with a well characterized clinical status: stable renal function (STA) for more than five years under standard immunosuppressive therapy (thirty percent of these stable patients under Prograf and seventy percent under Cyclosporin A treatment), we showed that the level of SMILE mRNA is independent of quantitative variables, including time post-transplantation, creatinine clearance, proteinuria, HLA incompatibilities or recipient and donor age (Figure S1). Similarly, SMILE mRNA level was also shown to be independent of qualitative variables (described as frequencies) such as recipient and donor genders, presence of anti-HLA antibodies or types of immunosuppressive treatment (Figure S2). Together, these results suggest that SMILE may be a good biomarker of the state of operational tolerance.

SMILE mRNA level in biopsies.

The level of SMILE mRNA was then measured in kidney biopsies with normal histology from either non transplant (NT, n=5), from transplant patients with stable graft function and normal histology (STA, n=7) and in biopsies from patients with histologically proven CAMR (CAMR, n=18). SMILE mRNA level was significantly decreased in kidney biopsies of CAMR patients compared with

biopsies from NT ($p < 0.05$), and we observed a trend toward a decrease of SMILE transcripts in kidney biopsies of STA patients compared with NT patients. (Figure 2A).

Because biopsies of TOL patients with a well functioning graft several years after transplantation are very difficult to obtain (uncompliant patients who refuse invasive investigation procedures), SMILE mRNA level was assessed in a rat model of kidney tolerance (Gagne et al., 2001; Degauque et al., 2006). In this model, kidney graft are indefinitely tolerated after administration of anti class II allo-immune serum (n=8) to the recipient on the day of transplantation. One hundred days after transplantation, SMILE mRNA level was strongly and significantly increased in the tolerated kidney grafts as compared to syngeneic graft (n=3) ($p = 0.0121$) (Figure 2B), thus confirming the results observed in humans.

Activation-induced modulation of SMILE mRNA expression in peripheral blood cell subtypes.

We then measured the level of SMILE mRNA in different types of immune cells in blood from healthy volunteers, before and after activation (CD4⁺ T cells: concanavalin A for 3-4days, CD8⁺ T cells: phytohemagglutinin for 3 days and CD19⁺ cells : pokeweed mitogen for 4 days). The level of SMILE mRNA was high in resting CD4⁺, CD8⁺ and CD19⁺ lymphocyte subtypes and strongly down-regulated after activation in all the three cell subtypes (Figure 3). Similarly, SMILE mRNA level was also significantly decreased in dendritic cells after CD40L-induced activation ($p < 0.05$, *data not shown*). Thus, SMILE mRNA showed a particular expression profile in cells from lymphoid lineage.

SMILE is involved in protein metabolism.

The putative molecular partners of SMILE/TMTC3 were assessed by a yeast two-hybrid screen (Fromont-Racine et al., 1997) that allows identifying protein-protein interactions in yeast. A collaboration with Hybrigenics (Hybrigenics S.A., Paris, France) identified SMILE as a prey in a Y2H screen with Protein Disulfide Isomerase family A member 3 (PDIA3 or GRP58) as a bait, performed on a random-primed human brown adipocytes cDNA library. PDIA3/SMILE interaction was identified with an A rank, meaning that there was a high confidence in the interaction score of these two partners. PDIA3 is involved in the folding of glycoproteins by disulfide bond formation in the ER and over-expressed in case of ER stress (Lee, 2001). Moreover, another yeast two hybrid screen was performed on a random primed leucocytes/activated mononuclear cells cDNA library, and 18 proteins were found as preys to interact with SMILE as bait. Of note, two of them were found to be implicated in protein metabolism (TRIP12, UBR4). The results together with the functional annotations of the proteins are summarized in Table S1.

Because epithelial cells are an important component of kidney, we studied SMILE transcript modulation in HeLa cell line. SMILE mRNA expression was decreased by almost 80% in resting HeLa cells transfected with SMILE siRNA as compared to cells transfected with control (scramble siRNA) (*data not shown*). High throughput microarray analysis was performed on resting HeLa cells transfected with SMILE or negative control siRNA in order to identify genes differentially expressed and to define cellular functions affected by SMILE silencing. Signals were studied with a SAM analysis (FDR = 0.0011, number of permutations: 5000). Overall, 549 and 532 genes were significantly up- and down-regulated respectively in cells transfected with SMILE siRNA as compared to cells transfected with negative control siRNA. Each list of up-regulated and down-regulated genes was analysed using the GOMiner website (<http://discover.nci.nih.gov/gominer/>) to define enrichment in several biological key functions. In this approach a function was defined by a GO number. One gene can have several GO numbers meaning that it can be involved in several mechanisms. We defined a set of 24 enriched functions for the list of down-regulated genes (Table I). This classification was performed based on GO categories with enrichment p -value < 0.05 and categories with at least 10 differentially expressed genes among the total genes involved in the function were selected. Among

down-regulated gene functions of SMILE siRNA transfected cells, those concerning protein metabolic process (GO:0019538, GO:0044260 and GO:0044267) were particularly represented, such as catabolic process (GO:0009056), proteolysis (GO:0006508), biopolymer and protein catabolic process (respectively GO:0043285 and GO:0030163).

Because SMILE transcripts down-regulation decreases transcripts involved in protein degradation, we tested whether SMILE was involved in proteolysis. We measured the chymotrypsin-like activity of the proteasome in both SMILE siRNA and control siRNA transfected HeLa cells. SMILE siRNA transfected HeLa cells displayed a significantly decreased chymotrypsin-like activity compared to control siRNA transfected cells (Figure 4, $p = 0.0313$). SMILE interaction with PDIA3, together with SMILE modulation of transcripts involved in protein catabolism and of chymotrypsin-like activity of the proteasome suggest that SMILE may play a role in the control of proteolysis *via* proteasome activity in the endoplasmic reticulum.

SMILE silencing does not affect cell growth but sensitizes HeLa cells to ER stress.

To study more precisely the effects of SMILE siRNA on cell morphology, we performed electronic microscopy (EM) analysis in SMILE siRNA and control siRNA transfected cells. At an ultra structural level, resting SMILE siRNA transfected cells displayed a well conserved overall architecture and organization. In contrast, SMILE down-regulation induced ER hypertrophy associated with a reduction of free ribosomes as compared to control cells (Fig. 5A and B), suggesting that down-regulation of SMILE affects ER function. Improperly folded protein degradation is a main actor of stress via accumulation in the ER lumen. We thus hypothesized that down-regulation of SMILE would sensitize cells to the effect of Bortezomib (a 26S proteasome inhibitor inducing ER stress). To address this question, we performed EM analysis in SMILE siRNA and control siRNA transfected HeLa cells treated with Bortezomib (20nM for 24h). As expected, Bortezomib treatment induced ER hypertrophy in control cells (Figure 5C). SMILE siRNA transfected cells displayed an increased sensitivity to Bortezomib with dramatic ER enlargement and vacuolization and features of cellular disorganization and injury (Figure 5D). These results suggest that SMILE down-regulation sensitizes cells to ER stress.

The down-regulation of SMILE/TMTC3 increases ER stress and impairs long-term cell survival.

To further determine if SMILE siRNA-mediated down-regulation sensitizes HeLa cells to ER stress and if this is mediated by the proteasome activity, we monitored the effects of different drugs inducing various stresses on HeLa cells after SMILE silencing in long-term cultures (24h). Besides Bortezomib, we used Thapsigargin, a blocker of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} /ATPase, which induces a proteasome independent ER toxicity. Moreover, Etoposide, an inhibitor of topoisomerase II, that induces cytotoxicity in an ER independent manner, was also used as a negative control. We compared the effects of a 24h-dose-response treatment with these drugs in HeLa cells transfected with either SMILE siRNA or control siRNA in clonogenic survival assays. As illustrated in Figure 6A, B and C without any treatment, HeLa cells transfected with SMILE siRNA displayed a decreased number of cell clusters compared to cells transfected with control siRNA ($p = 0.0045$). Bortezomib, Thapsigargin and Etoposide induced a dose-dependent decrease of the cluster numbers in both cells transfected with control or SMILE siRNA, showing that these drugs are effective (Figure 6A, B and C, respectively: dose effect: $p < 0.0001$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0002$; group effect: $p = 0.0008$, $p = 0.0024$ and $p = 0.0313$). When cluster numbers of SMILE siRNA transfected cells were normalized to cluster numbers of control siRNA transfected cells, we observed a more important decrease in cluster numbers constituted by SMILE siRNA transfected cells compared to control siRNA transfected cells in Bortezomib-treated cells. These data confirm electronic microscopy and suggest that cells lacking SMILE are more sensitive to the toxic effect of an ER stressor that blocks proteasome activity than

control siRNA transfected cells (Figure 6D, Two way Anova, group effect: $p = 0.0177$). Compared to Bortezomib effects, control and SMILE siRNA transfected cells treated with Thapsigargin or Etoposide displayed the same decrease in the number of clusters, indicating a similar toxicity of these two drugs on cells lacking SMILE mRNA (Figure 6E : Thapsigargin, group effect: $p = 0.5327$ and Figure 6F : Etoposide, group effect: $p = 0.5819$). Those results suggest that HeLa cells lacking SMILE mRNA are more sensitive to an ER stress dependent of proteasome activity blockade compared to other stresses.

In order to determine if there is a direct link between SMILE down-regulation and ER stress, we further tested XBP1 expression in HeLa cells transfected with SMILE siRNA and treated 6h with 20nM Bortezomib. XBP1 is a stress response protein activated upon exposure to ER stress and allowing transcription of UPR genes. SMILE mRNA down-regulation resulted in significant XBP1 transcripts overexpression after Bortezomib treatment (Figure 6G, $p = 0,0156$), suggesting that SMILE directly impacts ER stress responses.

DISCUSSION

Although the achievement of immunological tolerance has been made possible in animal models, its translation into the clinic has not been feasible yet and remains highly experimental in non human primates and in humans. Nevertheless, compelling evidence has been accumulated that some transplant recipients permanently accept their kidney or liver grafts in the absence of immunosuppressive therapy (Roussey-Kesler et al., 2006; Orlando et al., 2009; Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010). Along these lines, during the last decade, significant efforts have been made among the transplant community (*Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance and Indices of Tolerance*) in Europe (Sagoo et al., 2010) and (*Immune Tolerance Network*) in the US (Newell et al., 2010) to identify biological signatures of “operational tolerance”.

We previously identified a list of 49 genes which were able to discriminate patients with drug-free long term graft survival from other cohorts of transplanted patients (Brouard et al., 2007). TMTC3/SMILE is one of the genes found over-expressed in the blood from operationally tolerant patients and whose function, to date, is unknown. The present study was conducted to further explore TMTC3/SMILE expression and potential functions in accordance with transplantation. We report that SMILE interacts with PDIA3, which has a crucial role in glycoprotein folding in endoplasmic reticulum. We also showed here that siRNA-mediated SMILE knock-down in HeLa cells induces a decrease in several types of transcripts involved in protein catabolism and proteolysis, suggesting that SMILE might have a role in protein folding and/or degradation. Incorrect folding of proteins in cells is counteracted by the Unfolded Protein Response (UPR). If UPR is not sufficient to process protein overload in ER, this pathway can be deleterious and can lead to cell apoptosis or autophagy (Ferri and Kroemer, 2001; Schroder and Kaufman, 2005). Part of the UPR response involves ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation), which recognizes and targets unfolded proteins to degradation by the proteasome, allowing cells to decrease protein overload in ER (Schroder and Kaufman, 2005). Catabolism regulation can take place either at the proteasome level or by a direct action on protein modification for degradation (Lecker et al., 2006). Among transcripts involved in protein catabolism and down-regulated when SMILE is lacking, we found that several immunoproteasome subunits were modulated suggesting that SMILE exerts its function *via* the proteasome pathway. Indeed, PSMB1 ($\beta 1$ subunit), PSMC1 (proteasome 26S subunit), PSMB9 ($\beta 1i$ subunit) and PSMB10 ($\beta 2i$) are down regulated with fold changes of 0.76, 0.77, 0.3 and 0.6 respectively in SMILE specific siRNA-transfected HeLa cells. A key element reinforces the potential

involvement of SMILE in this process. Indeed, as expected, proteasome activity assessed by chymotrypsin-like activity is decreased in SMILE siRNA transfected cells as compared to control siRNA transfected cells.

To assess the involvement of SMILE in ER stress responses and protein catabolism, we treated SMILE siRNA transfected cells with various stressors, including Bortezomib, a proteasome inhibitor. SMILE down-regulation or Bortezomib treatment induced dramatic ER enlargement and features of cellular injury. Furthermore, Bortezomib inhibition of long-term cellular growth was strongly enhanced in SMILE siRNA transfected cells. Interestingly, toxicity of Thapsigargin, an ER stressor whose effects are unrelated to proteasome inhibition, was independent of the level of SMILE expression. Thus SMILE inhibition increases sensitivity to ER stress dependent of protein overload induced by the proteasome inhibitor Bortezomib. Moreover, we showed that SMILE down-regulation directly modulates a gene of the unfolded protein response, XBP1, increasing XBP1 transcript expression after 6 hours of Bortezomib treatment. Altogether these data suggest that in HeLa cells, proteasome pharmacological inhibition and SMILE silencing act in a synergistic way likely by blocking protein degradation or modification for degradation which induces accumulation of misfolded proteins in ER and leads to ER stress.

These results raise the questions of how and why SMILE, a molecule putatively involved in protein catabolism and in ER stress, is up-regulated in PBMC of tolerant patients and in the graft (possibly in the immune infiltrating cells within the graft) in a rat model of tolerance.

A possibility is that SMILE, as a molecule involved in the response to stress, may contribute to protect the graft towards ER stress. The implication of the ER stress is not well documented in organ transplantation but is involved in a wide range of cellular responses and might have multiple biological consequences such as mediating allograft injury (Pallet et al., 2009b). ER stress has been recognized in the pathophysiology of diseases such as Parkinson or Alzheimer's diseases (Lindholm et al., 2006), diabetes, atherosclerosis or cardiac and cerebral ischemia-reperfusion (Xu et al., 2005). ER stress is also currently being described in the context of kidney diseases (Cybulsky, 2002; Kitamura, 2008; Pallet et al., 2009a). The role of ER stress in transplantation is largely underestimated. The graft undergoes various adverse conditions, such as ischemia-reperfusion, rejection episodes or calcineurin inhibitor toxicity, in which ER stress has been recently reported (Pallet et al., 2009b). Recent studies on kidney transplantation have suggested that ER stress is an early event that might be associated with a bad outcome, with late organ dysfunction, interstitial fibrosis, and tubular atrophy (Pallet et al., 2008a). A second possibility is that SMILE plays a direct role in the immune cell physiology in long term graft function. We found here that SMILE is strongly down-regulated in T and B cells upon *in vitro* activation suggesting that it might be involved in regulation of immune cells. The role of the UPR in the mammalian immune system and in the inflammation has been clearly demonstrated (Zhang and Kaufman, 2008). Indeed, X-box binding protein 1 (XBP1), a gene whose transcription is under the dependence of the UPR has been clearly linked to B cell development and plasma cell differentiation (Todd et al., 2009). These data are in accordance with the fact that operationally tolerant patients display a particular B cell profile with overexpression of some molecules involved in B cell differentiation process, such as BANK-1, that highlight a possible abnormal B cell differentiation process in these patients. (Pallier et al., 2010)). Growing evidence suggests that the selectivity of Bortezomib for myeloma cells may be explained by an increased susceptibility of myeloma cells to ER stress-induced apoptosis. It has also been demonstrated that other cells of the immune system, such as dendritic cells, rely on an intact UPR (Iwakoshi et al., 2007). In addition, a growing body of evidence suggests that signalling pathways in the UPR and inflammation are interconnected through various mechanisms, including the production of reactive oxygen species

(ROS), the release of calcium from the ER, the activation of the transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B) and JUN N-terminal kinase (JNK), a member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, and the induction of the acute-phase response.

In conclusion, further studies are needed to precisely determine if SMILE is actively involved in the establishment of the tolerance status possibly via ER stress protection pathways.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Patients

The study was performed on 30 biopsies and 43 blood samples. All patients and healthy volunteers (HV) who participated in this study signed an informed consent and the study was approved by the University Hospital Ethical Committee (Nantes, France). The clinical parameters of these patients are described in detail in [Table S2] for PBMC and Table S3 for biopsies.

- Patients under standard immunosuppressive therapy with stable graft function (STA; n=9; patients with creatinemia <150 μ mol/L and proteinuria <1 g/24 h) for at least 3 years with donor specific antibodies for 2 out of 9 patients. No biopsies were available for these patients because they presented no deterioration of graft function (certain cDNA samples were prepared by TcLand Expression S.A., Nantes, France). These patients were under anti-metabolites (mycophenolate mofetil or azathioprine), calcineurin inhibitors (Cyclosporin A or FK506) and/or steroids.
- Operationally tolerant patients: patients with stable graft function (TOL; n=8; creatinemia <150 μ mol/L and proteinuria <1 g/24 h) for at least 1 year (median 12.5 years, range 5-30 years) without immunosuppressive treatment. Immunosuppressive treatment was stopped due to non compliance (n=6), post-transplant lymphoproliferative disorder (n=1) or calcineurin inhibitor toxicity (n=1). No biopsies were available for these patients since biopsy was refused by our Centre's Ethical Committee.
- Patients with chronic antibody mediated rejection: Patients under standard immunosuppressive therapy with biopsy-proven chronic antibody-mediated rejection (transplant glomerulopathy, positive for C4d and anti-donor HLA antibodies) (CAMR; n=15) according to the updated Banff classification criteria (Sis et al., 2010). Chronic AMR was diagnosed on biopsies performed in the context of a progressive deterioration of renal function (blood creatinemia <150 μ mol/L and/or proteinuria <1 g/24 h).

Biopsies and Peripheral Blood Mononuclear Cells

Biopsies

Human kidney transplant more than 1 year post-transplantation biopsies (Nantes CHU) were collected with a 16- or 18-G needle and embedded in Tissue Tek (Miles, Elkhart, IN), snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Biopsies were classified according to the updated Banff classification criteria (Sis et al., 2010) as displaying normal histology without histological lesions (STA; n=7) or Chronic AMR (defined by the diagnostic triad of circulating anti-donor HLA antibody associated with transplant glomerulopathy and deposition of the complement fragment C4d in graft biopsies (CAMR; n=18)). None of the chronic AMR biopsies displayed signs of acute AMR such as vascular necrosis, thrombosis, or oedema. The biopsies showed a variable degree of capillaritis and glomerulitis with lymphocyte and macrophage infiltrates. A group of biopsies from non-transplanted kidneys with normal histology (normal section of a kidney with a tumor; NT; n=5) from the Nantes center were included as additional controls.

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

PBMC (Nantes CHU) were prepared from the blood of 11 healthy volunteers (HV) and 32 kidney transplanted patients. Peripheral blood from healthy volunteers and patients was collected in EDTA Vacutainers, and PBMC were separated by density centrifugation using Lymphosep, lymphocyte separation media (Bio West, Nuaille, France). PBMC were stored in TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at -80°C until use.

Ethic statement

All animal studies were conducted according to the guidelines of the French Agriculture Ministry. The studies were approved by the Veterinary Departmental Services committee, La Chapelle-Sur-Erdre, France (No: E.44011), and all experiments were carried out in compliance with the ethical rules of INSERM.

Animals and surgical procedures

Kidney transplantation

Inbred male adult rats (200–250g) of the LEW.1A (RT1a) and LEW.1W (RT1u) congenic strains were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). All animals were maintained under standard conditions according to European and Institutional Guidelines. Orthotopic kidney transplantations were performed aseptically, as previously described (Soulillou et al., 1976; Degauque et al., 2006). Syngeneic recipients consisted of LEW.1A recipients grafted with LEW.1A kidneys (Syngeneic). Tolerant recipients (>100 days) consisted of LEW.1A recipients grafted with LEW.1W kidneys and injected with 0.5 ml (intravenously) of anti-donor class II (i.e. allo-immune serum depleted of anti-donor class I antibodies). These tolerant recipients will be referred to as the anti-donor class II-treated recipients (Anti CI II). Depletion of anti class I antibodies was performed as previously described (Gagne et al., 2001).

RNA Extraction and Preparation of cDNA

RNA extraction from all biopsies was performed using the QIAGEN RNA microextraction kit with on-column DNase treatment according to the manufacturer's instructions. Tissue Tek-embedded biopsies were recovered before homogenization by a rapid passage in ice-cold RNase-free water. Homogenization was performed with a PT 3100 Polytron Rotor-Stator (Kinematica, AG, Luzern, Switzerland). RNA quality and quantity were determined using an Agilent 2100 BioAnalyzer (Palo Alto, CA). The total quantity of RNA extracted per biopsy ranged from approximately 50 ng to 2 µg. RNA was reverse-transcribed into cDNA using an RT-Omniscript kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. RNA was extracted from human PBMC, rat immune system and HeLa cells using the TRIzol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed by DNase treatment (Roche, Indianapolis, IN). RNA concentration was calculated using a Nanodrop ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). RNA was reverse transcribed into cDNA using polydT oligonucleotide and Maloney leukemia virus reverse transcription (Invitrogen).

Immune System and Blood Fractions cDNA

Human Immune System and Blood Fraction MTC panels containing cDNA from a pool of donors together with positive and negative controls were purchased from Ozyme (Saint-Quentin en Yvelines, France).

Real-Time Quantitative PCR

Real-time quantitative PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 or 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using a commercially available primer and probe set for human SMILE/TMTC3 (Applied Biosystems; Hs00699202_m1) and XBP1 (Applied Biosystems; Hs00231936_m1). The housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT, Applied Biosystems; Hs99999909_m1) was used as endogenous control to normalize RNA starting quantity. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the $2^{-\text{ddCt}}$ method after normalization to HPRT with results expressed in arbitrary units.

Culture and treatment of Human cervical cancer cell line (HeLa)

Human cervical cancer cells HeLa were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, 1% glutamine, 1% Hepes, 1% non-essential amino acids and 1% sodium pyruvate. SMILE knockdown was achieved with specific small interfering RNA (siRNA) and Lipofectamine™ RNAiMAX purchased from Invitrogen (HSS136195) and cells were transfected following the company protocol. For [³H]-thymidine proliferation assay, HeLa cells were transferred into 96-well plate at a density of 1×10^4 cells per well and maintained for 24 hours. Then cells were transfected during 48 hours, [³H]-thymidine was added to the medium during 24 hours and finally cells were processed for determination of incorporated radioactivity. Analysis was made with a TopCount NXT™ Microplate Scintillation and luminescence Counter (PerkinElmer, Courtaboeuf cedex, France).

Yeast two-hybrid screen

The yeast two-hybrid screens were performed in collaboration with Hybrigenics, S.A., Paris, France (<http://www.hybrigenics.com>). SMILE was used as bait to screen a random-primed primary leukocyte and activated mononuclear cell cDNA library, and another screen identified SMILE as a prey of PDIA3 bait in a random-primed human brown adipocytes library. More informations about constructs are available in SD Experimental Procedures.

Transmission Electron Microscopy on transfected and drug-treated HeLa cells

SMILE and control siRNA transfected HeLa cells at the 3rd day of culture were fixed in cacodylate buffered 4% glutaraldehyde for 1h at 4°C, washed in buffer and post-fixed in cacodylate buffered 2% osmium tetroxide for 1h at room temperature. Cells were dehydrated in increasing concentration (from 50° to 100°) of ethanol and embedded in Epon. Sections (70 nm-thick) were cut with an Ultracut E ultramicrotome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), mounted on copper grids, stained with Reynolds method and observed on a JEM 1010 electron microscope (Jeol LTD, Tokyo, Japan) at a voltage of 80 kV.

Gene expression analysis in HeLa cells using DNA chips

RNA samples representing two independent experiments from HeLa cells transfected 24 hours with negative control or SMILE siRNA and activated or not with 20µM PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) during 6 hours were submitted for analysis. After RNA quality check, 500µg of total RNA for each sample were prepared with the Agilent Quick Amp Labeling Kit following the one-colour manufacturer's protocol. Each sample was hybridized to a whole human genome microarrays (4x44K Agilent) following manufacturer's instructions. After scan, data extraction with Feature Extraction (Agilent Technologies) were normalized (lowess function in R (Gentleman et al., 2004)) and then,

negative control spots and background signal were removed. Significance Analysis of Microarrays (SAM) (Tusher et al., 2001) was applied to identify transcripts differentially expressed between SMILE siRNA and control siRNA transfected cells. For each analysis, we arbitrarily fixed the false discovery rate (FDR) less than 0.5%. To assess the biological significance of the differentially expressed genes identified with SAM, GOMiner software (Tusher et al., 2001; Zeeberg et al., 2003) was used to identify the over-represented GO ontology (GO) categories. Only GO categories among the biological process ontology (GO:0008150) were analyzed, and we selected GO categories with enrichment *p*-value inferior to 0.05, and categories with at least 10 genes. All microarray data is MIAME compliant and the raw data has been deposited in a MIAME compliant database, the Gene Expression Omnibus Datasets. The complete list of the probes used and expression analysis has been submitted to Gene Expression Omnibus GEO # GSE21886.

Proteasome-Glo™ Cell-Based Assay

HeLa cells were seeded in 6-well plates at a density of 8×10^5 cells per well during 24h and transfected during 48h with control and SMILE siRNA as described above. The chymotrypsin-like activity of transfected cells was then assayed with the Proteasome-Glo™ Cell-Based Reagent (Promega, Charbonnières Les Bains, France) according to manufacturer's protocol. Luminescence was read with a VICTOR™ X Multilabel Plate Readers (Perkinelmer, Massachusetts, USA).

Clonogenic survival assays

Control and SMILE siRNA transfected HeLa cells were seeded in 6-well plates at a density of 500 cells per well and exposed to increasing concentrations of Bortezomib (1.25nM, 2.5nM or 5nM from a 0.1 mg/ml start solution, Millennium Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, United Kingdom), Thapsigargin (25nM, 50nM, 100nM from a 1mM start solution, Sigma-Aldrich) or Etoposide (90nM, 120nM, 180nM from a 50mM start solution, Sigma-Aldrich) for 24 hours. Controls were performed with vehicle only: H₂O for Bortezomib, DMSO for Thapsigargin and Etoposide. Then, the drug/medium was removed and cells were allowed to incubate in fresh medium under normal conditions for 7 days. After incubation, cells were fixed with 10% methanol–10% acetic acid and stained with a 0.4% solution of crystal violet. Plating efficiencies were determined for each treatment and normalized to untreated cells. Error bars represent SEM.

Statistical Analyses

The nonparametric Mann-Whitney test, the nonparametric Wilcoxon matched pairs test and the nonparametric Kruskal-Wallis test were performed when appropriate. Values of *p* < 0.05 were considered as significant. ROC curve analysis was performed to determine the cut off point of SMILE mRNA in blood that yielded the highest combined sensitivity and specificity in diagnosing drug-free long term graft function. The statistical method was devoted to the analysis of the diagnostic properties of SMILE, and the theory of ROC (receiver operating characteristic) curves was applied. More information about this method is available in SD Experimental Procedures.

A statistical analysis was also made in order to study the relationship between SMILE mRNA expression in a cohort of 164 stable patients and different clinical factors that could influence the diagnostic power of this biomarker. SMILE distribution was normalized with a logarithmic transformation and SMILE log-values were predicted thanks to a multiple linear regression model.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Oana Popa-Nita for editing of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: MR, JPDVH, JPS, SB. Performed the experiments: MR, JPDVH, RD, PP, AA, PT, JAC, ED, SP. Analyzed the data: MR, JPDVH, RD, PP, PT, SB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MG, FB, BC. Wrote the paper: MR, JPDVH, JPS, SB.

REFERENCES

1. Dantal J, Souillou JP (2005) Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 352: 1371-1373.
2. Kingsley CI, Nadig SN, Wood KJ (2007) Transplantation tolerance: lessons from experimental rodent models. *Transpl Int* 20: 828-841.
3. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoﬀ-Rubin N, Suthanthiran M, et al. (2008) HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 358: 353-361.
4. Porcheray F, Wong W, Saidman SL, De Vito J, Girouard TC, et al. (2009) B-cell immunity in the context of T-cell tolerance after combined kidney and bone marrow transplantation in humans. *Am J Transplant* 9: 2126-2135.
5. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, et al. (2006) Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 6: 736-746.
6. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, et al. (2007) Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15448-15453.
7. Blatch GL, Lasse M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21: 932-939.
8. Degauque N, Lair D, Dupont A, Moreau A, Roussey G, et al. (2006) Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells. *J Immunol* 176: 3915-3922.
9. Gagne K, Brouard S, Guillet M, Cuturi MC, Souillou JP (2001) TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur J Immunol* 31: 3111-3120.
10. Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 16: 277-282.
11. Lee AS (2001) The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26: 504-510.

12. Orlando G, Soker S, Wood K (2009) Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol* 50: 1247-1257.
13. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120: 1848-1861.
14. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120: 1836-1847.
15. Schroder M, Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739-789.
16. Ferri KF, Kroemer G (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3: E255-263.
17. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17: 1807-1819.
18. Pallet N, Fougeray S, Beaune P, Legendre C, Thervet E, et al. (2009) Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. *Transplantation* 88: 605-613.
19. Lindholm D, Wootz H, Korhonen L (2006) ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 13: 385-392.
20. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115: 2656-2664.
21. Kitamura M (2008) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F323-334.
22. Cybulsky AV Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney Int* 77: 187-193.
23. Pallet N, Bouvier N, Beaune P, Legendre C, Thervet E, et al. (2009) [Endoplasmic reticulum stress in kidney diseases: a question of life and death?]. *Nephrol Ther* 5: 173-180.
24. Pallet N, Bouvier N, Bendjallab A, Rabant M, Flinois JP, et al. (2008) Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant* 8: 2283-2296.
25. Zhang K, Kaufman RJ (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454: 455-462.
26. Todd DJ, McHeyzer-Williams LJ, Kowal C, Lee AH, Volpe BT, et al. (2009) XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J Exp Med* 206: 2151-2159.
27. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racape M, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int*.

28. Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH (2007) The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* 204: 2267-2275.
29. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, et al. Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. *Am J Transplant*.
30. Soulillou JP, Carpenter CB, d'Apice AJ, Strom TB (1976) The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J Exp Med* 143: 405-421.
31. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5: R80.
32. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116-5121.
33. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, et al. (2003) GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 4: R28.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. SMILE mRNA profile in renal transplant patients. (A) SMILE mRNA transcripts level is increased in PBMC of operationally tolerant patients (TOL, n=8) compared with patients with stable graft function under standard immunosuppressive therapy (STA, n=9), and deteriorating graft function under standard immunosuppressive therapy with biopsy-proven chronic antibody-mediated rejection (CAMR, n=15). (B) The ROC curve measures the ability of SMILE mRNA quantity to classify correctly patients with drug-free long term graft function versus patients with stable function.

Figure 2. Differential SMILE mRNA profile in renal transplant biopsies. (A) SMILE mRNA are decreased in biopsies of transplanted kidneys displaying CAMR (n=18) compared with biopsies of non-transplanted kidneys (NT, n=5) displaying normal histology. (B) SMILE mRNA expression in kidney biopsies of kidney transplanted rats. SMILE mRNA expression is increased in anti donor class II treated tolerant recipient (Anti class II, n=8) compared with kidney biopsies of syngeneic rat transplantation models (Syngeneic, n=3).

Figure 3. SMILE mRNA profile in a commercially available cDNA bank of peripheral cell subtypes from healthy volunteers. SMILE transcripts are increased in resting (R) versus activated (A) cell subtypes T CD4⁺, CD8⁺ and CD19⁺.

Figure 4. Chymotrypsin-like activity of the proteasome in SMILE siRNA transfected HeLa cells. The luminescent signal measured in arbitrary units (AU) is proportional to the amount of proteasome activity and is decreased in SMILE siRNA versus control (C-) siRNA transfected HeLa cells.

Figure 5. Endoplasmic reticulum hypertrophy in SMILE siRNA transfected HeLa cells. Control (A) and SMILE (B) siRNA transfected HeLa cells cultured 24h with RPMI + vehicle (DMSO). Endoplasmic reticulum vacuolization in HeLa cells treated 24h with 20nM Bortezomib and transfected with SMILE siRNA (D) compared to cells transfected with control siRNA (C).

Figure 6. Transfected HeLa cell behavior when undergoing endoplasmic reticulum stress. Graphic representations of viable cell cluster numbers in clonogenic assays. (A, B and C) Absolute number of clusters of cells transfected with control siRNA (white bars) compared to cells transfected with SMILE siRNA (black bars) and treated with 0, 1.25, 2.5 or 5nM Bortezomib (A), 0, 25, 50 or 100nM Thapsigargin (B) or 0, 25, 50 or 100nM Etoposide (C). (D, E and F) Percentage of cells transfected with SMILE siRNA (black circles) surviving after treatment with 0, 1.25, 2.5 or 5nM Bortezomib (D), 0, 25, 50 or 100nM Thapsigargin (E) or 0, 25, 50 or 100nM Etoposide (F) compared with cells transfected with control siRNA (white circles). Results are given for five independent experiments for Bortezomib, six independent experiments for Thapsigargin, six independent experiments for dose 0 and 90nM of Etoposide and three independent experiments for dose 120 and 180nM of Etoposide. (G) XBP1 mRNA expression is increased in SMILE siRNA transfected HeLa cells after 6h treatment with Bortezomib at 20nM.

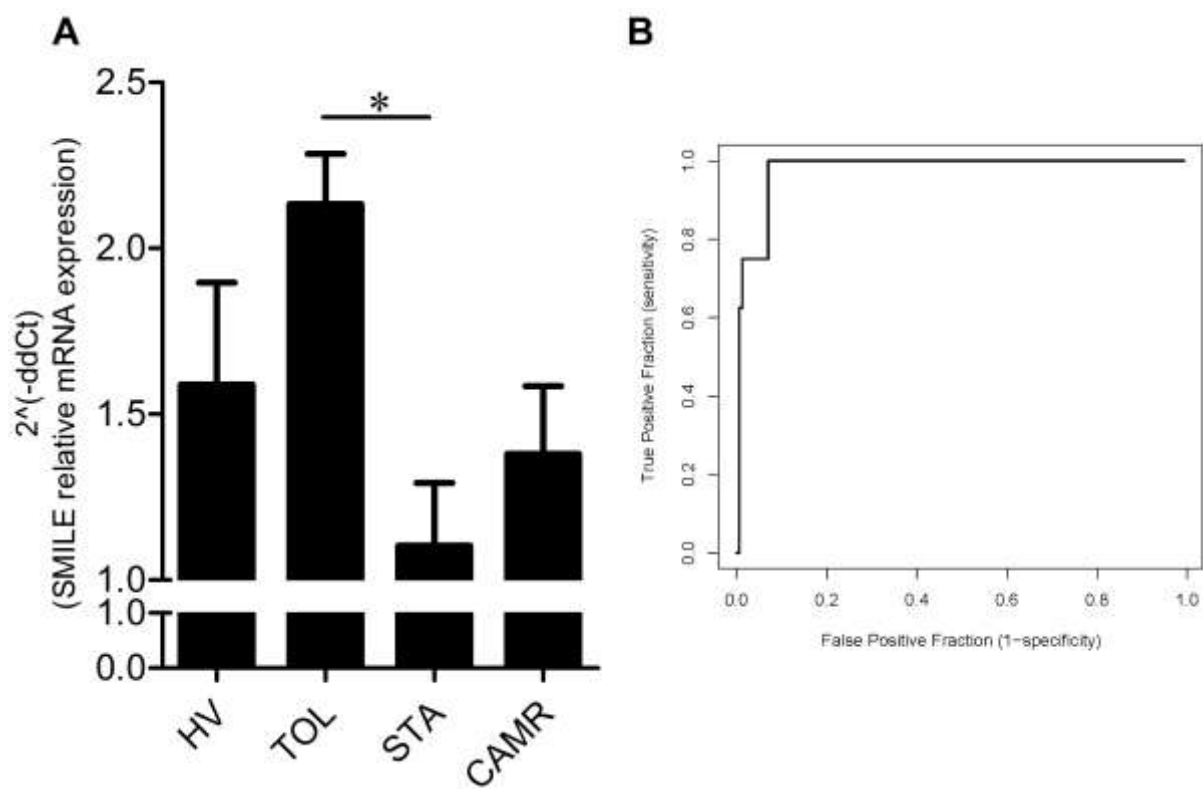


Figure 1. SMILE mRNA profile in renal transplant patients.

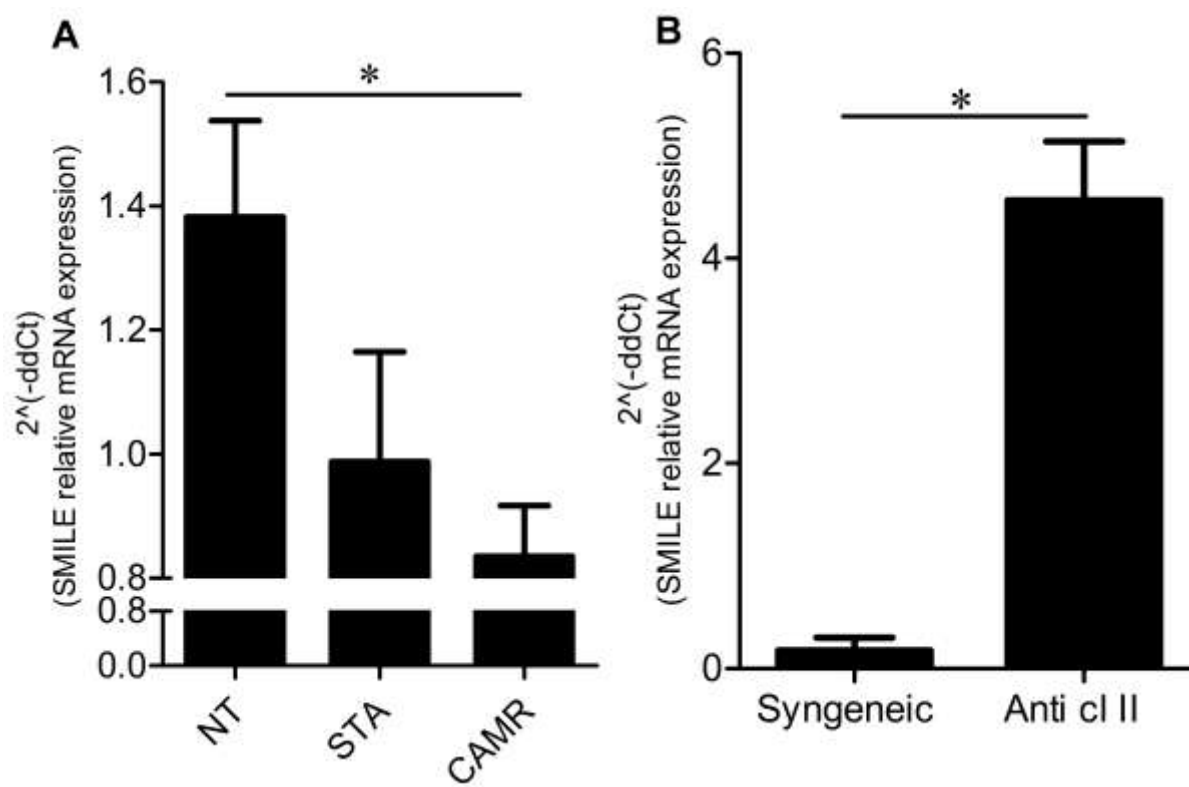


Figure 2. Differential SMILE mRNA profile in renal transplant biopsies.

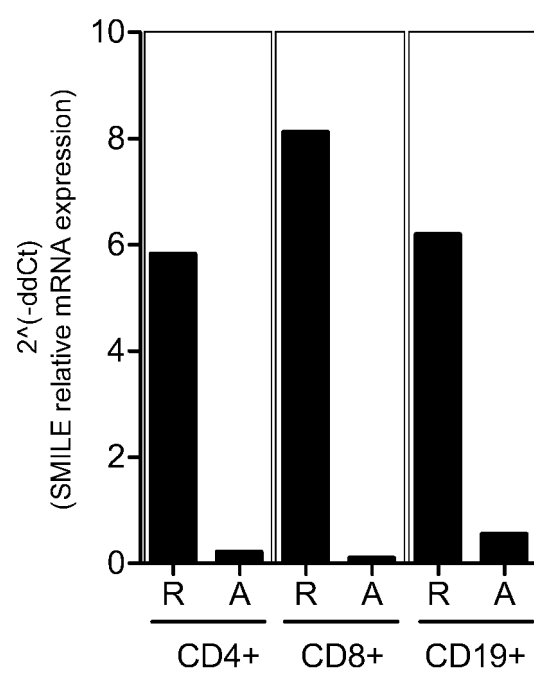


Figure 3. SMILE mRNA profile in a commercially available cDNA bank of peripheral cell subtypes from healthy volunteers.

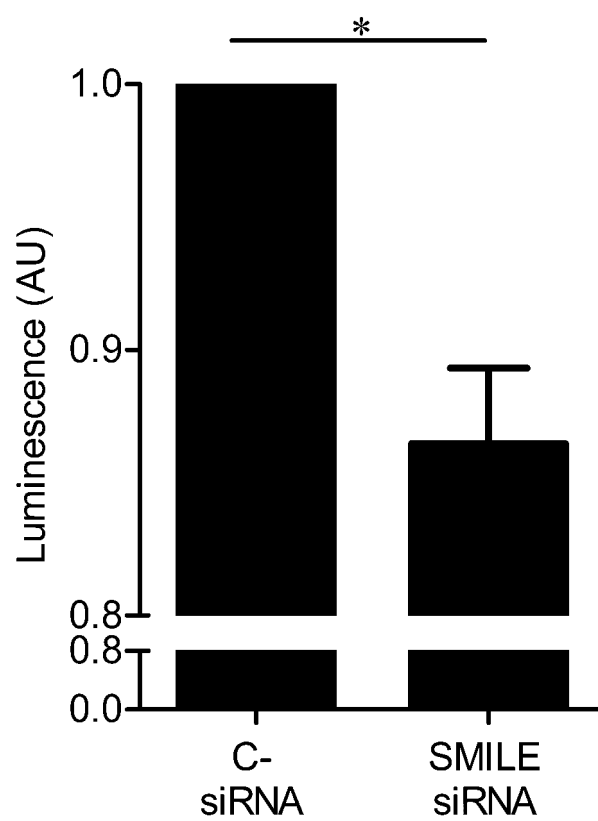


Figure 4. Chymotrypsin-like activity of the proteasome in SMILE siRNA transfected Hela cells.

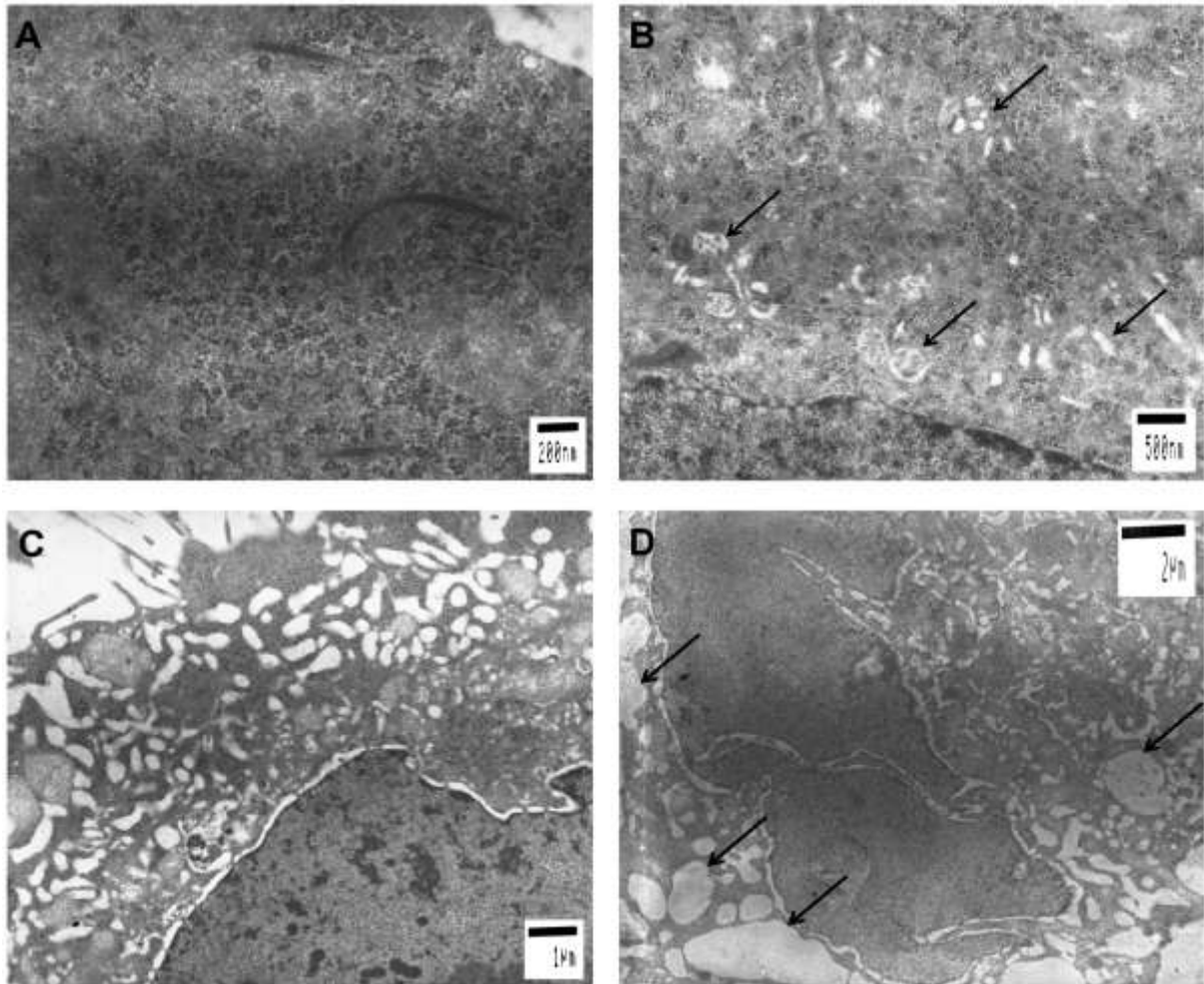


Figure 5. Endoplasmic reticulum hypertrophy in SMILE siRNA transfected HeLa cells.

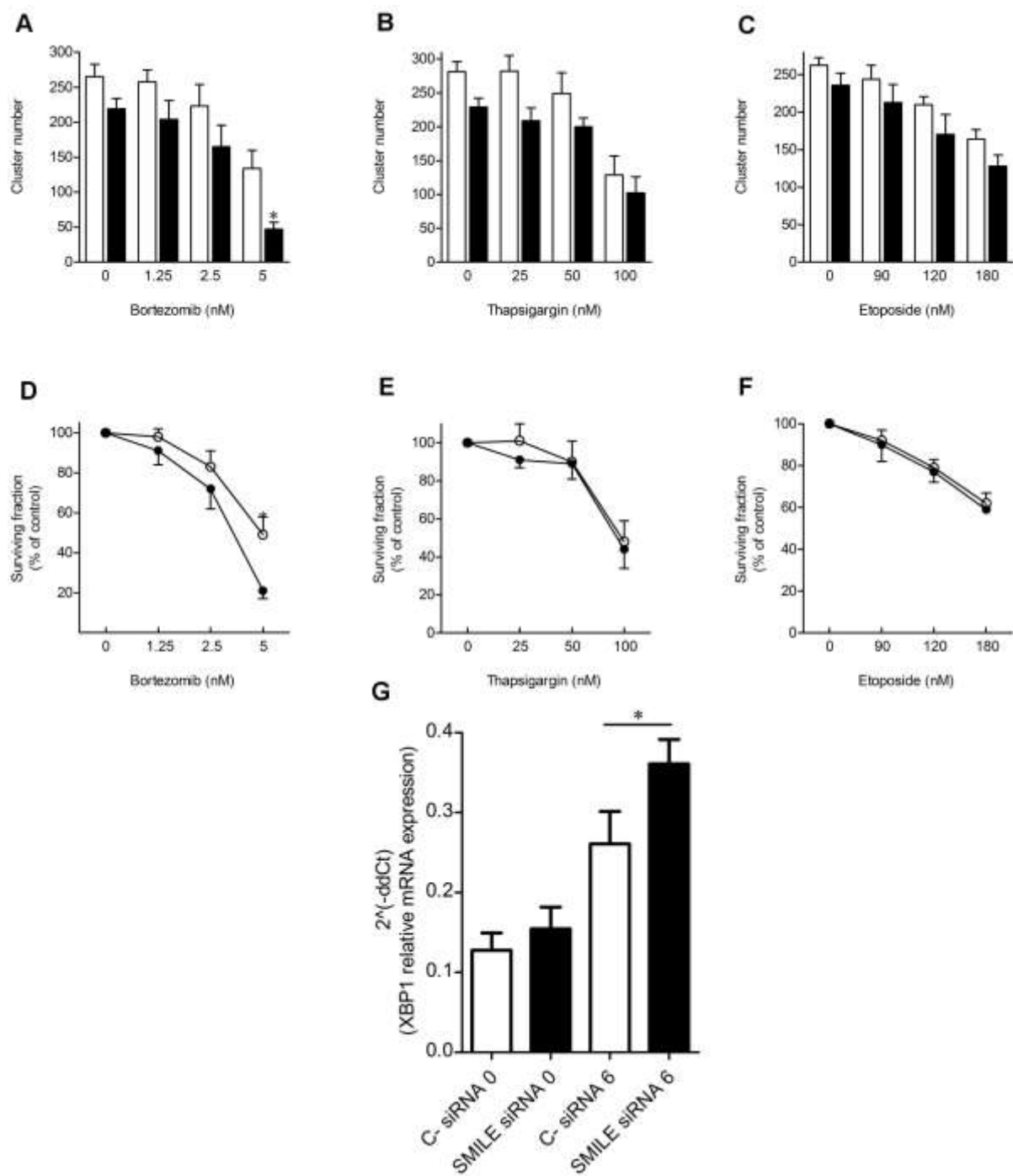


Figure 6. Transfected HeLa cell behavior when undergoing endoplasmic reticulum stress.

Table 1 Function enrichment of down-regulated transcripts in SMILE siRNA transfected cells.

GO Number	GO category name	Total genes	Changed genes	p-value
GO:0032940	secretion by cell	136	14	0,000550
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	303	22	0,002199
GO:0006082	organic acid metabolic process	305	22	0,002388
GO:0045045	secretory pathway	114	11	0,003544
GO:0006508	proteolysis	378	25	0,003965
GO:0016192	vesicle-mediated transport	334	22	0,007058
GO:0046903	secretion	182	14	0,008350
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	345	22	0,010152
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	1958	91	0,010267
GO:0030163	protein catabolic process	168	13	0,010346
GO:0006066	alcohol metabolic process	190	14	0,011947
GO:0043285	biopolymer catabolic process	234	16	0,014630
GO:0019538	protein metabolic process	2039	93	0,015656
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	141	11	0,016685
GO:0006629	lipid metabolic process	407	24	0,018131
GO:0044267	cellular protein metabolic process	1906	87	0,019677
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	126	10	0,019712
GO:0009117	nucleotide metabolic process	126	10	0,019712
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	189	13	0,025232
GO:0055086	nucleobase nucleoside and nucleotide metabolic process	138	10	0,034312
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	226	14	0,044629
GO:0009308	amine metabolic process	206	13	0,045829
GO:0009057	macromolecule catabolic process	291	17	0,046136
GO:0009056	catabolic process	448	24	0,048405

DISCUSSION GENERALE

Les cellules T régulatrices, principalement celles de phénotype $CD4^+ CD25^{high} FOXP3^+$, ont démontré un effet inhibiteur sur les réponses immunitaires contre les alloantigènes du donneur. Elles sont ainsi un outil potentiel dans le développement de la tolérance en transplantation clinique, comme discuté dans l'introduction en page 14 (1-1-1 Approches sans transplantation de cellules hématopoïétiques du donneur). Dans le premier article (Article 1), nous avons donc cherché à caractériser en nombre et en fonction les cellules T régulatrices de différents groupes de patients transplantés rénaux. Nous avons montré que les patients en rejet chronique présentaient moins de lymphocytes T régulateurs périphériques de type $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ que les patients opérationnellement tolérants et les sujets sains, confirmant une première étude de notre équipe en 2006 (Louis et al., 2006). En revanche, ces cellules comme celles des 2 autres groupes présentent un profil régulateur caractérisé par la présence des marqueurs FOXP3, CTLA4, GITR, CCR4 et CD103 et sont capables d'inhiber la prolifération de cellules T $CD4^+ CD25^-$ en co-culture.

Une des hypothèses serait que le rejet chronique pourrait être lié à un défaut du nombre de LT $CD4^+ CD25^{high}$. Ainsi, Meloni et al. ont montré qu'une diminution des LT $CD4^+ CD25^{high}$ régulateurs périphériques était associée au développement d'un syndrome de bronchiolite oblitérante chez les patients greffés du poumon (Meloni et al., 2004). Nos résultats sont également en accord avec ceux de Salama et al. qui ont montré que le risque de perte de greffon rénal était corrélé à une diminution des lymphocytes T $CD4^+ CD25^+$ dans le sang (Salama et al., 2003). De même, Li et al. ont montré, dans le cadre d'une greffe de foie, que les patients opérationnellement tolérants avaient un nombre de lymphocytes T $CD4^+ CD25^{high}$ régulateurs dans le sang identique à celui des sujets sains (Li et al., 2004). En l'absence de cellules du donneur, nous avons mis au point un test de coculture utilisant les cellules T $CD4^+ CD25^-$ du patient, activées par un anticorps anti-CD3, en présence de PBMC autologues irradiés. L'effet suppresseur et la fonction des cellules T $CD4^+ CD25^+$ ajoutées au système est «titré» par la mesure de la prolifération et la production en cytokines des cellules T $CD4^+ CD25^-$ stimulées. Les cellules T $CD4^+ CD25^{high}$ des patients en rejet chronique présentent une fonction suppressive comparable sur la prolifération des cellules T $CD4^+ CD25^-$ à celle des patients opérationnellement tolérants et des patients présentant une fonction stable de leur greffon sous traitement immunosuppresseur. De plus, les cellules régulatrices de ces patients en rejet chronique présentent un niveau normal de FOXP3 (exprimé de façon stable et à haut niveau dans les T $CD4^+ CD25^{high}$) et sont capables d'inhiber la production d'IFN γ , sécrété après activation des cellules T $CD4^+ CD25^-$, de manière équivalente aux volontaires sains et aux patients ayant une fonction stable du greffon. Ainsi, les patients en rejet chronique présentent une diminution du nombre de cellules T $CD4^+ CD25^{high} FOXP3^+$ qui pourrait expliquer un défaut de régulation dans le rejet chronique, mais ces cellules n'ont pas de défaut intrinsèque de leur fonction suppressive. En dépit de travaux précédents montrant que la fonction des cellules T régulatrices est influencée par le régime immunosuppresseur

(Coenen et al., 2006; Zeiser et al., 2006), nos résultats montrent que l'activité suppressive des cellules T CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ étudiées n'est pas influencée par la présence ou l'absence d'immunosuppression. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que les patients en rejet chronique ont moins de cellules régulatrices en raison des doses plus élevées de drogues immunosuppressives qu'ils reçoivent. Ainsi, il est également possible que cela ne soit pas le nombre absolu des lymphocytes T régulateurs qui est important, mais que seul le ratio cellules T régulatrices / cellules T effectrices soit important pour le devenir à long-terme des transplants rénaux. Par conséquent, la possible application clinique des cellules T régulatrices pourrait être développée dans le cadre de patients recevant une immunosuppression chronique ; les premières études de développement de drogues capables de supprimer les réponses des cellules T effectrices tout en maintenant ou en induisant l'activité des T régulatrices sont en cours (Lopez-Hoyos et al., 2009).

La caractérisation moléculaire des patients opérationnellement tolérants devient nécessaire à l'heure actuelle pour établir des signatures de l'état de tolérance permettant de discriminer, parmi les patients stables, ceux présentant un profil de tolérance et pouvant subir un sevrage du traitement immunosuppresseur (Introduction partie 2- Etablir le profil des patients transplantés rénaux : les biomarqueurs) (Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010). Ce besoin en biomarqueurs a amené notre équipe à comparer différents profils transcriptomiques de différents groupes de patients transplantés rénaux en 2007. Cette étude a permis de définir une signature de 49 gènes associés à l'état de tolérance opérationnelle (Brouard et al., 2007). Parmi ces 49 gènes, SMILE, une molécule de fonction inconnue, est surexprimée dans le sang des patients opérationnellement tolérants. L'étude récente de Sagoo et al. à laquelle notre équipe a participé a mis en évidence 255 gènes surexprimés chez les patients tolérants de la cohorte européenne d'entraînement et 1352 gènes surexprimés chez les patients tolérants de cohorte américaine de test, comparés à des patients stables, en rejet ou des volontaires sains. De manière intéressante, SMILE est retrouvé comme un des 174 gènes communs aux 2 sets de gènes, surexprimé chez les patients opérationnellement tolérants des 2 cohortes de patients comparés aux autres groupes (Sagoo et al., 2010). Notre étude sur le rôle de SMILE dans la tolérance opérationnelle (Article 2) a confirmé que les transcrits de SMILE sont surexprimés dans le sang des patients opérationnellement tolérants comparés aux patients stables ou en rejet chronique. Une analyse par courbe ROC a confirmé l'intérêt potentiel de SMILE en tant que biomarqueur, celui-ci discriminant avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité les patients opérationnellement tolérants des patients stables (sensibilité 1, spécificité 0,93) et en rejet chronique (sensibilité 0,77, spécificité 0,75). De plus, une analyse sur 164 patients stables a montré que le niveau d'expression

des transcrits de SMILE était indépendant de variables cliniques quantitatives telles que le temps après transplantation, la clairance de la créatinine, la protéinurie, les incompatibilités HLA ou l'âge du donneur ou du receveur. Les niveaux de SMILE sont également indépendants de variables cliniques qualitatives telles que le sexe du receveur ou du donneur, la présence d'anticorps anti-HLA ou le type de traitement immunosuppresseur. Cependant, concernant cette dernière donnée, nous ne pouvons pas exclure un effet des traitements immunosuppresseurs sur la diminution des transcrits de SMILE chez les patients stables ou en rejet chronique, d'autant qu'il a été montré que la cyclosporine par exemple induisait un stress du RE (Pallet et al., 2008a). Par la suite, notre objectif a été d'analyser si SMILE jouait un rôle dans la tolérance opérationnelle des patients transplantés rénaux ou s'il était seulement un biomarqueur de cet état de tolérance opérationnelle. SMILE étant une molécule de fonction inconnue, nous avons étudié dans un premier temps son rôle au niveau cellulaire pour comprendre ensuite son rôle à l'échelle de l'organe et de l'individu. Des analyses *in vitro* nous ont conduit vers une fonction de SMILE sur le métabolisme protéique, et plus particulièrement sur la réponse au stress du RE, résultats corroborés par l'analyse double hybride, qui a révélé une interaction de SMILE avec PDIA3, une molécule du RE augmentée lors du stress, et par les résultats de nos puces à ADN. Cette analyse a montré une diminution des transcrits impliqués dans les fonctions protéolytiques après extinction des transcrits de SMILE par siRNA (Annexe 3 p.157 : Enrichissement en fonctions impliquant des genes diminués dans les cellules HeLa transfectées par un siRNA SMILE). La diminution de l'activité protéasomale de la cellule en l'absence de SMILE a confirmé le rôle de cette molécule dans la dégradation protéique. De même, l'observation de la morphologie de cellules n'exprimant pas SMILE en microscopie électronique à transmission a révélé une hypertrophie du RE. De manière basale donc, l'absence de SMILE perturbe l'activité du protéasome et induit une hypertrophie du RE, caractéristique d'un stress du RE. Il est possible d'envisager que la diminution de l'activité de dégradation protéique est à l'origine de l'hypertrophie du RE observée en microscopie, du fait de l'accumulation de protéines mal repliées et non dégradées dans la lumière du RE. Il est important de noter que la survie cellulaire lors d'un test de clonogenic assay n'est pas altérée à l'état basal (sans induction d'un stress du RE) même en l'absence de SMILE, ce qui suggère que la diminution de l'activité protéolytique inhérente à l'absence de cette molécule ne semble pas affecter la cellule au repos. Cependant, nous avons pu remarquer que l'hypertrophie du RE observée en microscopie est d'autant plus marquée lorsque les cellules sont soumises à un stress du RE dépendant du protéasome (induit par le Bortezomib®). De plus, le traitement par Bortezomib® a révélé une hypersensibilité des cellules en l'absence de SMILE, suggérant une synergie du Bortezomib® et de l'absence de SMILE lors de l'induction du stress du RE. Ceci est confirmé par

l'analyse de l'expression des transcrits d'XBP1, une des molécules « senseur » du stress du RE. Dans une cellule à l'état basal n'exprimant pas SMILE, la molécule XBP1 n'est pas induite, confirmant que l'absence de SMILE dans la cellule au repos ne perturbe pas la fonction cellulaire. Cependant, l'induction d'un stress du RE par le Bortezomib® augmente de façon beaucoup plus importante l'expression d'XBP1 si la cellule n'exprime pas SMILE, confirmant le rôle direct de SMILE dans la réponse au stress du RE.

PERSPECTIVES

1- SMILE dans les lymphocytes B

Comme décrit en introduction pages 44 et 45 du manuscrit de thèse (4-1-1 Le stress du RE dans l'immunité et l'inflammation), le stress du RE est impliqué dans la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'Ig. Les souris $Xbp1^{-/-}$ présentent un nombre normal de LB contrôlé par l'expression de B220 (marqueur de la lignée B), d'IgM ou d'IgD qui peuvent être activés *in vitro* avec l'anti-CD154 seul ou avec de l'IL4 et proliférer normalement, exprimer les marqueurs d'activation en surface, faire la recombinaison de classe des Ig et sécréter des cytokines à des niveaux normaux. Cependant les cellules B de ces souris présentent une diminution importante du nombre de plasmocytes, ont une diminution générale de production des différents isotypes d'Ig et ne sont pas capables de générer des réponses anticorps contre des antigènes dépendants ou indépendants des cellules T (Reimold et al., 2001). D'autre part, des travaux récents de notre équipe décrits en page 33 (2-2 Etudes mises en place chez les patients opérationnellement tolérants) ont montré que les patients opérationnellement tolérants présentaient une augmentation du nombre de LB mémoires présentant un caractère activé, et l'augmentation d'une population de cellules B transitionnelles $CD19^+ CD1d^+ CD5^+$ décrite comme une population B régulatrice chez la souris (Watanabe et al., 2010) et chez l'homme (Yanaba et al., 2008). De plus, d'autres résultats non publiés de cette étude suggèrent une diminution des plasmocytes sécréteurs d'Ig chez les patients opérationnellement tolérants, cette dernière donnée étant à prendre avec précaution étant donné le faible nombre de plasmocytes dans le sang. Étant donné que ces patients présentent plus de LB mémoires et transitionnels mais moins de plasmocytes, une des hypothèses est qu'ils présentent une anomalie de différenciation de leurs LB. Ainsi, puisque les cellules n'exprimant pas SMILE et soumises à un stress du RE surexpriment la molécule XBP1, l'augmentation de SMILE pourrait indirectement être à l'origine de cette anomalie de développement et/ou de différenciation des LB chez les patients opérationnellement tolérants. Nous déterminerons donc dans un premier temps si les différentes sous-populations de LB (stades de développement Bm1 à Bm5 des cellules B et plasmocytes, Figure 15 p.109) présentent un profil d'expression de SMILE différent chez les patients opérationnellement tolérants comparé aux sous-types de LB des autres patients transplantés. Nous évaluerons également si la modulation de SMILE (et par conséquent celle d'XBP1) pourrait être responsable d'un problème de différenciation dans les cellules B expliquant partiellement le type de signature B transitionnelle/mémoire retrouvée chez les patients opérationnellement tolérants.

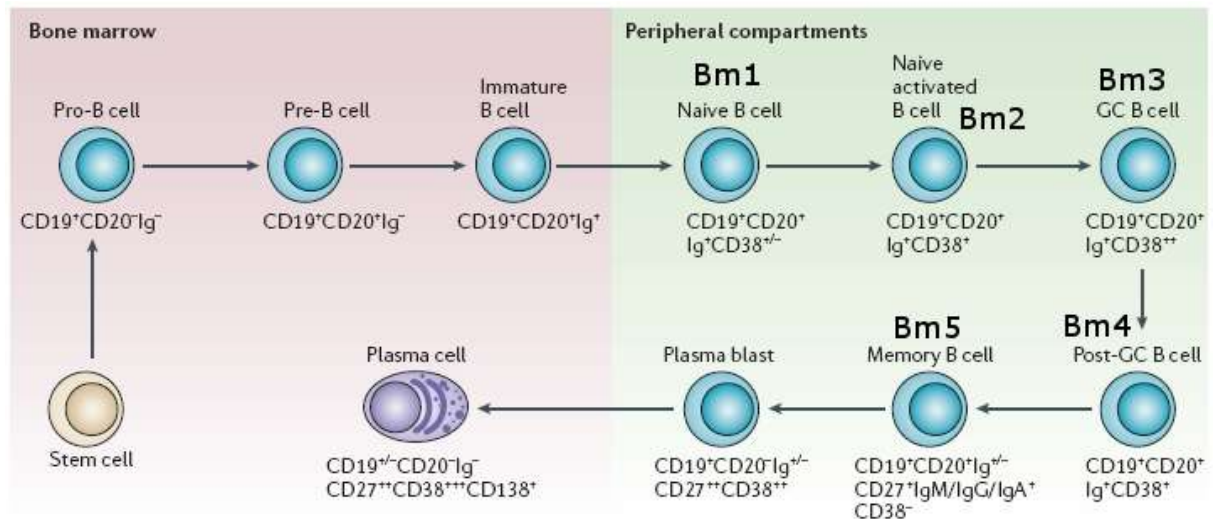


Figure 15 : Développement des cellules B.

Les stades de maturation des cellules B sont indiqués par leur site anatomique et l'expression des marqueurs de surface cellulaire. GC : Centre germinatif

2- NF- κ B et SMILE

De part son action pléiotropique, NF- κ B est impliqué en transplantation et notamment lors du rejet. Plusieurs études ont montré, chez des rats et des souris transplantés, que l'inactivation de NF- κ B retardait le rejet et pouvait même instaurer un état de tolérance (Zhou et al., 2003). Ainsi, dans un modèle murin de transplantation cardiaque, la diminution par siRNA de la sous-unité RelB dans les CD permet d'éviter le rejet de greffe en favorisant la génération CD immatures capables de réguler les réponses T allogéniques (Zhang et al., 2010). Chez le rat, l'utilisation de « piègeurs » de NF- κ B tel que les ODN (oligonucléotide double brin correspondant à la séquence de régulation cis reconnue par le facteur de transcription) diminue les lésions et améliore la survie du greffon. Cette molécule synthétique possède les sites de fixation de NF- κ B qui lui permettent de le séquestrer et empêche ainsi l'expression des gènes de l'immunité et de l'inflammation (Ohmori et al., 2005; Lott et al., 2010). Chez la souris, la surexpression d'une forme mutée de I κ B (délétion de son site de phosphorylation) au sein des LT induit une tolérance à la greffe cardiaque (Zhou et al., 2003). Cette mutation empêche l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-xL, rendant ainsi les cellules T allogéniques plus sensibles à l'apoptose (Zhou et al., 2005; Molinero et al., 2009).

Nos résultats transcriptionnels obtenus sur puces à ADN ont montré que les transcrits de la sous-unité NF- κ B1 étaient diminués de moitié dans les cellules HeLa transfectées par un siRNA SMILE (fold change par rapport à la condition « HeLa transfectées par un siRNA contrôle » : 0,48). De plus, dans

des HAEC (Human Aortic Endothelial Cells) traitées au $\text{TNF}\alpha$, un activateur non spécifique de l'activité NF- κ B, le niveau des transcrits de SMILE diminue au cours du temps (Figure 16).

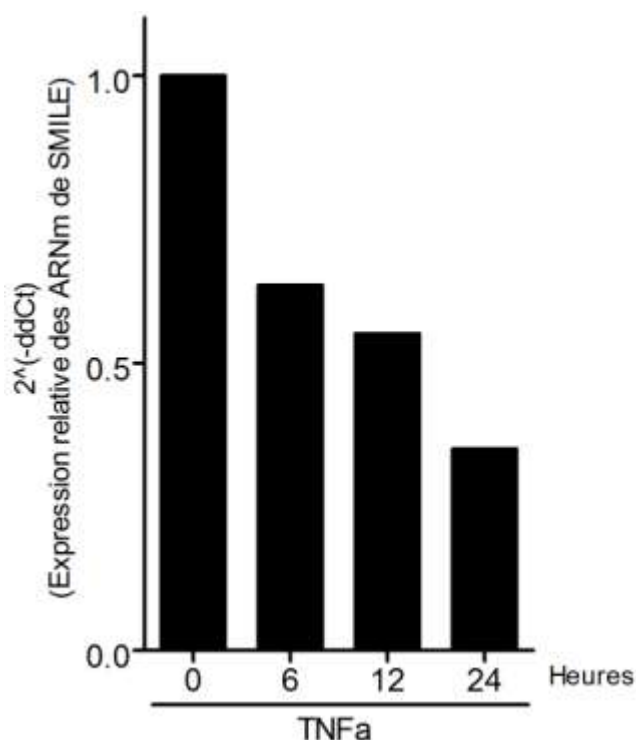


Figure 16 : Expression des transcrits de SMILE dans des HAEC (Human Aortic Endothelial Cells) activées au $\text{TNF}\alpha$ pendant 0 à 24 heures.

Ceci suggère que SMILE et NF- κ B sont inter-dépendants. De plus, ces résultats préliminaires montrent qu'en l'absence de SMILE l'activité NF- κ B diminue (puces à ADN en siRNA SMILE), et que les transcrits de SMILE diminuent lorsque l'activité NF- κ B augmente (Figure 16). Ceci suggère également une boucle de rétrocontrôle entre ces deux molécules, phénomène classiquement observé dans le cas de molécules dites protectrices telles que A1, A20 etc (Stroka et al., 1999; Malewicz et al., 2003). L'augmentation de l'activité NF- κ B diminue l'expression de SMILE qui à son tour diminue l'activité NF- κ B. Nous chercherons donc à analyser cette dépendance entre les deux molécules et à définir si SMILE régule NF- κ B (en transfectant des cellules de lignée lymphoïde par le siRNA SMILE et en mesurant l'activité NF- κ B de ces cellules par luciférase) et vice-versa (en modulant l'activité NF- κ B grâce aux plasmides p50/p65 et I κ B, et en suivant la variation de l'expression des transcrits de SMILE suite à cette modulation).

3- SMILE est-il impliqué dans la présentation de la protéine MMP2 ?

Les études de levure double hybride ont montré que SMILE interagit avec PDIA3, responsable de la formation des ponts disulfures des polypeptides naissants. SMILE est donc potentiellement impliqué dans le repliement protéique via son interaction avec PDIA3. L'analyse des cellules présentant une diminution des transcrits de SMILE par siRNA a montré non seulement une diminution des transcrits

impliqués dans la protéolyse et le catabolisme protéique, mais aussi une diminution des transcrits impliqués dans les voies de sécrétion et le transport dépendant des vésicules (Annexe 3 p.157 : Enrichissement en fonctions impliquant des genes diminués dans les cellules HeLa transfectées par un siRNA SMILE). Nous analyserons donc le rôle de SMILE dans le repliement, le catabolisme et la sécrétion protéique grâce à un modèle de présentation de la MMP2 (Matrix Metalloproteïnase 2) sur des lignées cellulaires cancéreuses (Renaud et al., 2010, En soumission). Cette collaboration est déjà en place avec l'équipe du Dr Guilloux à l'INSERM U892, Nantes, France.

- Etude du rôle de SMILE dans le repliement protéique

L'équipe du Dr Guilloux travaille sur un modèle de présentation endogène de la MMP2 sur le HLA-A2 de lignées cellulaires cancéreuses, présentation qui ne peut s'effectuer que si la MMP2 est mutée pour un pont disulfure. Nous étudierons l'implication de SMILE sur la présentation endogène de la protéine MMP2 sur le HLA-A2 de cellules HeLa. Nous vérifierons tout d'abord la présentation de la protéine non mutée dans des cellules transfectées par le siRNA SMILE, afin de déterminer si SMILE est impliqué dans le repliement correct des protéines, notamment via son interaction avec PDIA3 qui permet la formation de ponts disulfures.

- Etude du rôle de SMILE dans le catabolisme protéique

La présentation de la MMP2 mutée est dépendante de la dégradation de cette protéine par le protéasome. Nous avons montré par puces à ADN une diminution des transcrits impliqués dans la protéolyse et le catabolisme des protéines et une diminution de l'activité du protéasome dans les cellules transfectées par un siRNA SMILE. Nous vérifierons donc également la présentation de la protéine MMP2 mutée afin de déterminer un rôle éventuel de SMILE dans la dégradation de cette protéine.

- Etude du rôle de SMILE dans la sécrétion et le transport vésiculaire

Pour finir, ce modèle de présentation de la MMP2 a été décrit de manière naturelle (Godefroy et al., 2005) dans des cellules de mélanome sécrétant la MMP2 endogène, puis réalisant son endocytose via l'intégrine $\alpha\beta3$ et cross-présentant les épitopes MMP2 sur le HLA-A2. Les analyses par puces à ADN de cellules transfectées par le siRNA SMILE ont également montré une diminution des transcrits impliqués dans les fonctions de sécrétion de protéines, et notamment de transport via les vésicules. Nous étudierons donc la sécrétion et la présentation effective de la MMP2 endogène dans des cellules de mélanome transfectées par le siRNA SMILE afin de déterminer si SMILE joue un rôle dans la sécrétion de protéines.

4- Modèles animaux avec modulation de SMILE

4-1 Souris Knock-Out pour le gène SMILE

4-1-1 Présentation du modèle

Un modèle de souris KO hétérozygote pour la protéine SMILE a été généré à notre demande à l'Institut Clinique de la Souris (ICS) à Strasbourg, France, afin de déterminer le rôle de la molécule *in vivo* et notamment son implication dans la survie du greffon. La stratégie mise en place pour invalider le gène SMILE a consisté à supprimer les exons 11 à 14 du gène, induisant la disparition du codon stop ainsi que des trois domaines TPR constituant le domaine fonctionnel principal de la protéine (Figure 17).

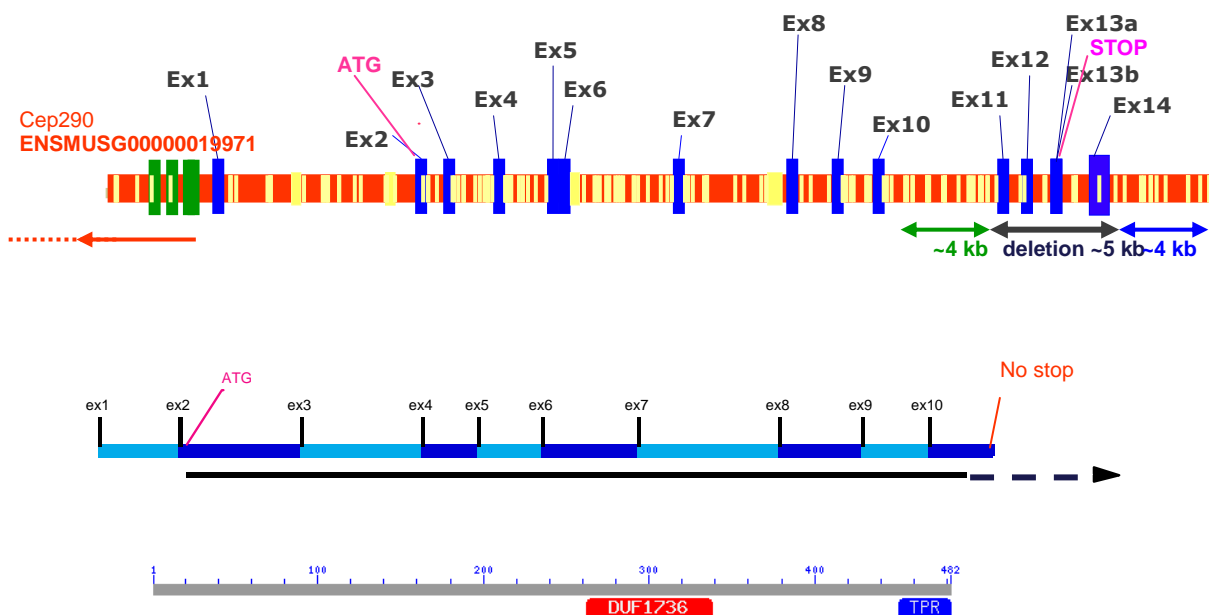


Figure 17 : Choix de la stratégie de délétion du gène SMILE.

Ex : Exon

ATG : codon start

Suivant un rapport de l'ICS, les accouplements de souris hétérozygotes *Smile*^{+/-} ont montré que l'homozygotie du KO pour ce gène constituait une létalité embryonnaire à un stade pour l'instant inconnu. Les analyses sur puces à ADN dans notre étude sur la molécule SMILE (Article 2 p.78) ont révélé qu'une partie des gènes dont l'expression était augmentée en l'absence de SMILE était impliquée dans des fonctions de développement, de différenciation et de prolifération cellulaire (Annexe 4 p.158 : Enrichissement en fonctions impliquant des gènes augmentés dans les cellules HeLa transfectées par un siRNA SMILE, lignes 1 à 3 et lignes 20 et 22), de cycle cellulaire (Annexe 4, lignes 26, 28, 50), de développement des structures anatomiques (Annexe 4, ligne 59), de

reproduction (Annexe 4, lignes 41 et 45) et dans la neurogenèse (Annexe 4, lignes 48 et 55), autant de fonctions qui semblent essentielles au développement embryonnaire et qui, si elles sont dérégulées, peuvent être potentiellement responsables de la létalité des souris KO homozygotes. De plus, les fonctions de sécrétion et de catabolisme cellulaire, ainsi que le métabolisme de nombreuses macromolécules semblent être affectés par l'absence de SMILE au niveau cellulaire (Annexe 3 p.157). Pour finir, les transcrits de SMILE sont sur-exprimés dans les cerveaux de rats pendant les stades de développement embryonnaire E14 et E16, confirmant un rôle potentiellement important de SMILE dans la neurogenèse embryonnaire (Figure 18, collaboration avec Philippe Naveilhan, INSERM UMR 643, Nantes, France).

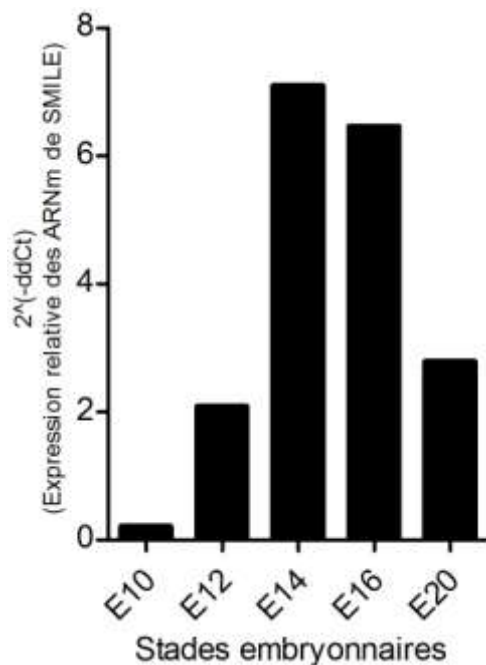


Figure 18 : Expression des transcrits de SMILE dans des cerveaux de rats à différents stades embryonnaires.

Une analyse macroscopique et histopathologique en aveugle de 28 souris (15 mâles (11 hétérozygotes K467L-/WT et 4 sauvages K467WT/WT) et 13 femelles (10 hétérozygotes K467L-/WT et 3 sauvages K467WT/WT) en collaboration avec Jérôme Abadie et Laetitia Dorso de l'Ecole vétérinaire de Nantes, France, n'a pas permis de détecter de différences évidentes entre les différentes souris sauvages et hétérozygotes Smile^{+/-}. L'examen nécropsique des 28 souris n'a mis en évidence aucune lésion macroscopique, et l'examen histopathologique n'a pas mis en évidence de particularités phénotypiques significatives dans la population analysée. L'étude conclut à une absence de particularités phénotypiques permettant de distinguer les souris hétérozygotes K467L-/WT (Smile^{+/-}) et les souris sauvages K467WT/WT (Annexe 5 p.159 : Examen macroscopique et histopathologique des souris sauvages et hétérozygotes KO pour SMILE).

4-1-2 Perspectives d'étude du modèle

Etant donné les résultats de cette analyse macroscopique, il est possible que les souris hétérozygotes Smile^{+/-} ne présentent pas d'anomalies (au niveau immunitaire notamment) du fait du rééquilibrage d'expression par le gène sauvage restant. Nous avons observé que l'absence de SMILE augmentait l'expression du transcrit XBP1, directement impliqué dans la différenciation des LB. Nous étudierons donc le nombre de lymphocytes B chez ces souris, Reimold et al. ayant montré que les souris XBP1/RAG2^{-/-} présentaient beaucoup moins de plasmocytes que les souris sauvages (Reimold et al., 2001). Nous utiliserons également ces souris comme donneur ou receveur de greffes de peau afin d'étudier la survie du greffon en l'absence de SMILE exprimé par le donneur ou le receveur. Nous étudierons également le développement des embryons homozygotes Smile^{-/-} afin de déterminer la cause de leur létalité, en collaboration avec Jérôme Abadie et Laetitia Dorso de l'Ecole Vétérinaire de Nantes, France.

4-2 Souris avec un Knock-Out conditionnel du gène SMILE

4-2-1 Présentation et intérêt du modèle

Etant donné la létalité de l'homozygotie et le fait que les souris hétérozygotes Smile^{+/-} ne semblent pas présenter d'anomalies macroscopiques et histopathologiques, nous avons également fait une demande de souris KO conditionnel à l'ICS afin de générer un KO homozygote ubiquitaire inducible à l'état adulte.

4-2-2 Perspectives d'étude du modèle

Etude des paramètres biologiques –

Nous avons pu montrer que SMILE est lié au stress du RE et que son absence sensibilise les cellules à un stress du RE. Une étude de Han en 2008 a montré qu'un traitement par la cyclosporine A à court terme activait une réponse au stress ainsi qu'une réponse pro-apoptotique des cellules rénales dans un modèle expérimental de néphropathie chronique due à la cyclosporine chez des souris, alors qu'un traitement à long-terme induisait seulement une réponse apoptotique (Han, Li et al. 2008). Les auteurs suggèrent une balance vers l'apoptose lors d'un stress du RE prolongé. Les cellules Smile^{-/-} devraient donc être potentiellement moins résistantes au stress, et plus sujettes à développer un stress du RE. Il est donc envisageable que les cellules périphériques Smile^{-/-} subiront une contraction de leur pool cellulaire après induction du KO conditionnel. Nous étudierons donc :

- Le nombre total de cellules dans le sang des souris Smile^{-/-} après l'induction du KO conditionnel, et le nombre de cellules dans chaque sous-type cellulaire par rapport à des souris sauvages ;

- La qualité de chaque sous-population cellulaire en terme de morphologie, de développement et d'expression des marqueurs classiques spécifiques des différentes populations immunes: lymphocytes T dont lymphocytes T régulateurs T CD4⁺ CD25^{high} et CD8⁺ CD28⁻, lymphocytes B OX33⁺, monocytes CD11b⁺/Gr-1⁻, cellules dendritiques CD205⁺...
- La qualité de chaque sous-population cellulaire en terme de fonction propre à la cellule : fonctions régulatrices des cellules régulatrices T CD4⁺ CD25^{high} et CD8⁺ CD28⁻, cytotoxicité des cellules T CD8⁺, sécrétion d'immunoglobulines des cellules B, capacité de présentation antigénique des cellules dendritiques, prolifération, sécrétion de cytokines...
- Les lymphocytes du sang périphérique et les organes seront testés par western blot pour l'expression des protéines de réponse au stress afin d'évaluer le stress subit par les différents organes et cellules du fait de la perte de SMILE. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux reins, ces organes présentant une expression très élevée de transcrits de SMILE chez les rats normaux, suggérant un rôle important de SMILE dans cet organe.
- Enfin, l'analyse des puces à ADN ayant également montré une augmentation des transcrits impliqués dans la fonction de neurogénèse en l'absence de SMILE, nous examinerons aussi le cerveau de ces souris, en collaboration avec l'équipe du Dr Naveilhan, INSERM U643, Nantes, France.

Rôle de SMILE dans un modèle de greffe de cœur allogénique sauvage chez des souris receveuses

Smile^{-/-} –

- Etude de la survie du greffon

Les patients opérationnellement tolérants présentant une augmentation de l'expression des transcrits de SMILE en périphérie, nous faisons l'hypothèse que le greffon allogénique sera rejeté plus rapidement chez un receveur présentant une diminution d'expression de la molécule dans les PBMC. Nous réaliserons donc des greffes de peau allogénique sur des souris receveurs Smile^{-/-} afin de déterminer le rôle de SMILE chez le receveur pour la survie du greffon.

- Etude *in vitro* des cellules de souris Smile^{-/-}

L'analyse de l'expression des transcrits de SMILE dans les banques d'ADNc montre un profil d'activation des cellules immunitaires exprimant faiblement les transcrits de SMILE. Les cellules Smile^{-/-} du receveur, activées de manière constante, pourraient présenter une réponse augmentée contre les lymphocytes du donneur et provoquer un rejet accéléré du greffon de peau. Nous étudierons donc *in vitro* les cellules immunitaires de ces souris Smile^{-/-} en analysant en coculture la prolifération des lymphocytes Smile^{-/-} contre des cellules de la souris donneur sauvage. Les protéines de réponse au stress (BiP, IRE1, ATF6 et PERK) seront également mesurées par western blot dans les lymphocytes de la souris Smile^{-/-}.

Rôle de SMILE dans un modèle de greffe de peau allogénique Smile^{-/-} chez des souris receveurs sauvages –

- Etude de la survie du greffon

Nous avons montré *in vitro* que les cellules transfectées par un siRNA SMILE étaient moins résistantes au Bortezomib®. L'hypothèse est donc qu'en l'absence de SMILE, le greffon résistera moins bien au stress de la transplantation, pouvant entraîner une diminution de sa survie. Notre étude sur ces souris consistera donc à transplanter le greffon Smile^{-/-} chez un receveur sauvage, afin de déterminer l'importance de l'expression de SMILE dans le greffon pour sa survie.

- Etude *in vitro* du greffon Smile^{-/-}

Suivant le temps de survie du greffon, différents traitements classiquement utilisés pour contrer le rejet et mentionnés dans la bibliographie comme étant des stressseurs potentiels du greffon (comme la cyclosporine A, (Pallet, Fougeray et al. 2009)) seront utilisés afin de vérifier la résistance au stress du greffon. Nous analyserons également la réponse des lymphocytes sauvages contre des cellules de la souris donneur Smile^{-/-} en coculture. Enfin, nous testerons l'expression des protéines de réponse au stress dans le transplant (BiP, IRE1, ATF6 et PERK) afin de déterminer le niveau de stress subi par le greffon en l'absence de SMILE.

4-3 Rat transgénique pour le gène SMILE

4-3-1 Présentation du modèle

Nous avons, en collaboration avec Ignacio Anegón, INSERM UMR 643, Nantes, France, commencé la construction d'un vecteur afin de réaliser un rat Lewis 1W transgénique pour le gène SMILE. Nous avons choisi un plasmide portant un promoteur PGK pour une expression ubiquitaire, IRES-GFP pour une double expression des protéines SMILE et GFP dans la même cellule sans affecter l'expression de la protéine SMILE avec un flag trop long. A la place, la protéine SMILE portera un Flag M2-M5, de taille moindre, encadré par des sites de restriction (Nde1) permettant son enlèvement de la séquence si le flag venait à empêcher l'expression correcte de la protéine SMILE (Figure 19 p.117).

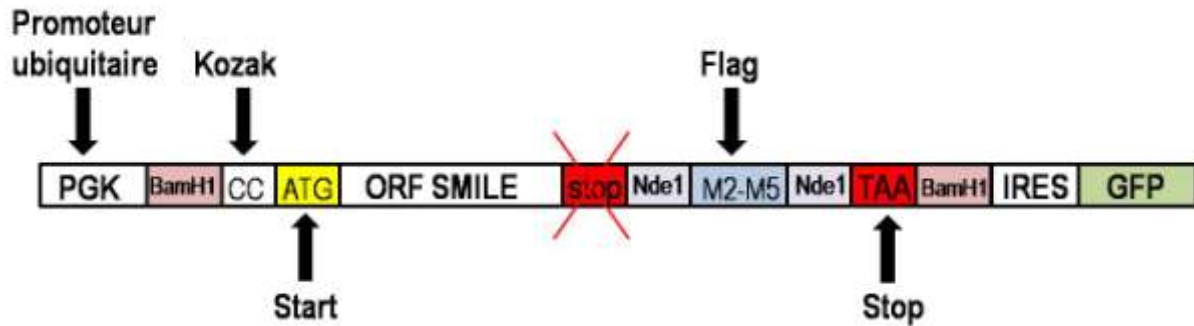


Figure 19 : Séquence plasmidique du transgène SMILE.

4-3-2 Perspectives d'étude du modèle

Nous étudierons les rats transgéniques pour le gène SMILE suivant les mêmes objectifs que pour les souris dont le gène SMILE est absent : nous étudierons la quantité et la qualité (fonction) des sous-populations de PBMC, en portant une attention particulière à la sous-population de cellules B. Nous utiliserons ces rats transgéniques comme donneurs ou receveurs de greffes rénales ou cardiaques, ces modèles animaux de transplantation étant établis en routine au laboratoire, et nous étudierons également la neurogénèse chez ces rats.

Ces études sur les modèles animaux nous permettront de déterminer de manière certaine si SMILE joue un rôle actif dans la survie du greffon, ou si, dans le cas où son absence n'induirait pas de diminution de la survie du greffon, SMILE est plutôt un marqueur passif ou un biomarqueur de l'état de tolérance.

Dans le cas où SMILE serait une molécule active pour la mise en place de la tolérance, ces modèles nous permettront également de déterminer si l'expression de SMILE est importante en périphérie parce qu'elle a un rôle sur la survie du greffon via les cellules du système immunitaire, ou si cette expression est importante au niveau du greffon parce qu'elle permet une meilleure résistance du greffon aux attaques du système immunitaire, aux immunosuppresseurs, ou à toute autre forme de stress comme l'ischémie-reperfusion (Pallet, Fougeray et al. 2009).

4-4 SMILE dans un modèle de souris XBP1^{-/-} : collaboration avec Laurie Glimcher, Harvard School of Public Health, Boston

L'équipe de Glimcher aux Etats-Unis possède un modèle de souris permettant la délétion conditionnelle du gène XBP1 dans plusieurs organes. Pour générer les souris sensibles à cette délétion, des souris Xbp1^{fllox} présentant des sites loxP dans les 1^{er} et 2^e introns du gène Xbp1 sont croisées avec des souris Mx1-Cre qui expriment la recombinaison Cre de façon dépendante de

l'interféron. Ces souris croisées de 5 à 6 semaines subissent des injections intrapéritonéales 1 ou 3 fois avec 250µg de poly(I:C) à chaque fois avec 2 jours d'intervalle pour induire l'expression de la Cre. La recombinaison dépendante de la Cre enlève l'exon 2 du gène Xbp1, induisant un épissage alternatif entre les exons 1 et 3 de l'ARNm d'XBP1, résultant en un décalage du cadre de lecture et en l'introduction d'un codon de terminaison de la traduction. L'équipe de Glimcher a déjà montré la dépendance des cellules plasmocytaires vis-à-vis d'XBP1, puisque les souris déficientes en XBP1 présentent un nombre normal de cellules B mais une diminution des cellules plasmocytaires, ces cellules plasmocytaires XBP1^{-/-} sécrétant moins d'Ig (Reimold et al., 2001). Nous allons donc étudier, en collaboration avec cette équipe, l'expression de SMILE dans divers organes présentant une délétion du gène Xbp1 afin de déterminer si l'absence d'XBP1 module l'expression de SMILE.

4-5 SMILE dans un modèle de xéno greffe de neuroblastes porcins dans le cerveau

L'équipe de Philippe Naveilhan dans notre laboratoire INSERM UMR 643 travaille actuellement sur un modèle de co-greffes de cellules souches mésenchymateuses (CSM) de rat, connues pour leurs propriétés immunomodulatrices, et de neuroblastes mésencéphaliques porcins dans le cerveau de rat. Cette co-greffe est tolérée jusqu'à 120 jours pour 50% des rats avec présence de neurones se développant au sein des greffons, comparée à la greffe de neuroblastes porcins seuls, dont la survie est de 63 jours seulement pour 40% des rats. Cette stratégie pourrait être utile pour assurer une survie à long-terme de xéno greffes neuronales fonctionnelles, dans le but à long-terme de régénérer les neurones perdus lors de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson. Nous avons étudié l'expression des transcrits de SMILE dans ces deux modèles de rejet et de tolérance de la xéno greffe.

4-5-1 Modèle d'étude : collaboration avec Philippe Naveilhan, INSERM U643, Nantes

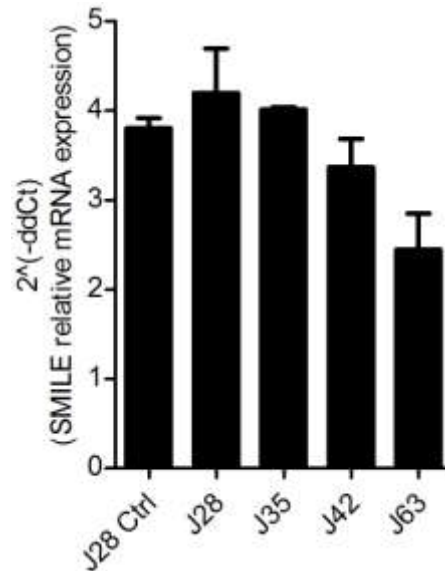
Nos études préliminaires sur ce modèle en collaboration avec Philippe Naveilhan ont consisté à étudier l'expression de SMILE dans le cerveau de rat ayant subi une co-greffe CSM + neuroblastes mésencéphaliques porcins ou une greffe de neuroblastes mésencéphaliques seuls.

4-5-2 Résultats préliminaires

Dans un premier temps, nous avons regardé l'expression des transcrits de SMILE dans des biopsies de cerveau de rats ayant subi une greffe de neuroblastes mésencéphaliques porcins seuls. Nous avons analysé l'expression de SMILE sur une cinétique de rejet des neuroblastes à J28 (n=5), J35

(n=3), J42 (n=6) et J63 (n=2) après greffe. Les résultats préliminaires montrent une tendance à la diminution des transcrits de SMILE au cours du rejet des neuroblastes porcins (Figure 20).

Figure 20 : Expression des transcrits de SMILE dans des biopsies de cerveaux de rats lors d'une cinétique de rejet de neuroblastes porcins.



Nous avons ensuite observé l'expression des transcrits de SMILE dans des biopsies de cerveau de rats greffés avec des neuroblastes mésencéphaliques porcins seuls à J35 après greffe (n=2), greffés avec des cellules souches mésenchymateuses de rat et des neuroblastes mésencéphaliques porcins à J63, les biopsies présentant un infiltrat léger de cellules T (n=2), et greffés avec des cellules souches mésenchymateuses de rat et des neuroblastes mésencéphaliques porcins tolérants à J63 (n=2). De manière intéressante, ce sont les neuroblastes seuls en rejet qui expriment la quantité la plus forte de transcrits de SMILE. L'expression des transcrits de SMILE diminue dans les biopsies de co-greffes présentant un infiltrat T, et cette expression est très faible dans des biopsies de co-greffes tolérantes (Figure 21 p.120). Ces résultats sont à l'opposé de ceux obtenus dans les PBMC ou même dans les biopsies de patients transplantés rénaux, puisque l'expression la plus forte des transcrits de SMILE était retrouvée dans les PBMC de patients opérationnellement tolérants ou dans les biopsies présentant une histologie normale. Ceci suggère une régulation différente de SMILE suivant le compartiment analysé, ces résultats restant à confirmer sur une cohorte plus importante de rats.

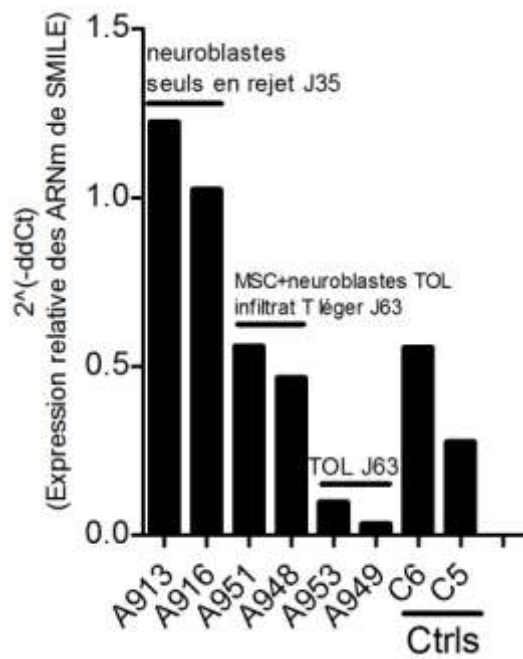


Figure 21 : Expression des transcrits de SMILE dans des biopsies de cerveaux de rats ayant subi une greffe de neuroblastes porcins ou une co-greffe CSM de rat + neuroblastes.

Les rats ont subi une greffe de neuroblastes porcins seuls en rejet (J35 après greffe) ou une co-greffe de cellules souches mésenchymateuses de rat (MSC) + neuroblastes tolérants avec infiltrat T léger (J63 après greffe) ou tolérants sans infiltrat (TOL J63 après greffe). Ctrls = contrôles avec des biopsies de la partie contra-latérale du cerveau.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, A.B., M.A. Williams, T.R. Jones, N. Shirasugi, M.M. Durham, S.M. Kaech, E.J. Wherry, T. Onami, J.G. Lanier, K.E. Kokko, T.C. Pearson, R. Ahmed and C.P. Larsen. (2003). Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* **111**:1887-95.
- Alexander, J.W., L.E. Bennett and T.J. Breen. (1994). Effect of donor age on outcome of kidney transplantation. A two-year analysis of transplants reported to the United Network for Organ Sharing Registry. *Transplantation* **57**:871-6.
- Alvarez, C.M., G. Opelz, M.C. Giraldo, S. Pelzl, F. Renner, R. Weimer, J. Schmidt, M. Arbelaez, L.F. Garcia and C. Susal. (2005). Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. *Am J Transplant* **5**:746-56.
- Anglicheau, D. and M. Suthanthiran. (2008). Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation* **86**:192-9.
- Ansari, M.J. and M.H. Sayegh. (2004). Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges. *Kidney Int* **65**:1560-3.
- Arellano, E.M., J.M. Campistol, F. Oppenheimer, J. Rovira and F. Diekmann. (2007). Sirolimus monotherapy as maintenance immunosuppression: single-center experience in 50 kidney transplant patients. *Transplant Proc* **39**:2131-4.
- Armstrong, N., P. Buckley, T. Oberley, J. Fechner, Jr., Y. Dong, X. Hong, A. Kirk, D. Neville, Jr. and S. Knechtle. (1998). Analysis of primate renal allografts after T-cell depletion with anti-CD3-CRM9. *Transplantation* **66**:5-13.
- Ashton-Chess, J., E. Dugast, R.B. Colvin, M. Giral, Y. Foucher, A. Moreau, K. Renaudin, C. Braud, A. Devys, S. Brouard and J.P. Soulillou. (2009a). Regulatory, effector, and cytotoxic T cell profiles in long-term kidney transplant patients. *J Am Soc Nephrol* **20**:1113-22.
- Ashton-Chess, J., M. Giral, J.P. Soulillou and S. Brouard. (2009b). Using biomarkers of tolerance and rejection to identify high- and low-risk patients following kidney transplantation. *Transplantation* **87**:S95-9.
- Atkinson, A., W. Colburn, V. DeGruttola, D. DeMets, G. Downing, D. Hoth, J. Oates, C. Peck, R. Schooley, B. Spilker, J. Woodcock and S. Zeger. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **69**:89-95.
- Axelrod, D.A., K.P. McCullough, E.D. Brewer, B.N. Becker, D.L. Segev and P.S. Rao. (2010). Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1999-2008: the changing face of living donation. *Am J Transplant* **10**:987-1002.
- Baeten, D., S. Louis, C. Braud, C. Braudeau, C. Ballet, F. Moizant, A. Pallier, M. Giral, S. Brouard and J.P. Soulillou. (2006). Phenotypically and functionally distinct CD8⁺ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* **17**:294-304.
- Ballet, C., G. Roussey-Kesler, J.T. Aubin, S. Brouard, M. Giral, P. Miqueu, S. Louis, S. van der Werf and J.P. Soulillou. (2006). Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am J Transplant* **6**:2796-801.
- Bando, Y., Y. Tsukamoto, T. Katayama, K. Ozawa, Y. Kitao, O. Hori, D.M. Stern, A. Yamauchi and S. Ogawa. (2004). ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J* **18**:1401-3.
- Bashuda, H., M. Kimikawa, K. Seino, Y. Kato, F. Ono, A. Shimizu, H. Yagita, S. Teraoka and K. Okumura. (2005). Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *J Clin Invest* **115**:1896-902.
- Bassik, M.C., L. Scorrano, S.A. Oakes, T. Pozzan and S.J. Korsmeyer. (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J* **23**:1207-16.
- Bek, M.F., M. Bayer, B. Muller, S. Greiber, D. Lang, A. Schwab, C. August, E. Springer, R. Rohrbach, T.B. Huber, T. Benzing and H. Pavenstadt. (2006). Expression and function of C/EBP homology protein (GADD153) in podocytes. *Am J Pathol* **168**:20-32.

- Benitez, C., J.J. Lozano and A.S. Fueyo. (2009). Gene expression profiling and transplantation tolerance in the clinic. *Transplantation* **88**:S50-3.
- Berlanda, M., P. Di Cocco, C. Mazzotta, V. Rizza, M. D'Angelo, M.I. Bellini, C. Scelzo, A. Famulari, F. Pisani, M. Hernandez-Fuentes and G. Orlando. (2008). Clinical operational tolerance after kidney transplantation: a short literature review. *Transplant Proc* **40**:1847-51.
- Bernales, S., K.L. McDonald and P. Walter. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* **4**:e423.
- Bingaman, A.W. and D.L. Farber. (2004). Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am J Transplant* **4**:846-52.
- Blatch, G.L. and M. Lassel. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**:932-9.
- Bobadilla, N.A. and G. Gamba. (2007). New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**:F2-9.
- Bouvier, N., J.P. Flinois, J. Gilleron, F.L. Sauvage, C. Legendre, P. Beaune, E. Thervet, D. Anglicheau and N. Pallet. (2009). Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**:F160-9.
- Boya, P., I. Cohen, N. Zamzami, H.L. Vieira and G. Kroemer. (2002). Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ* **9**:465-7.
- Braud, C., D. Baeten, M. Giral, A. Pallier, J. Ashton-Chess, C. Braudeau, C. Chevalier, A. Lebars, J. Leger, A. Moreau, E. Pechkova, C. Nicolini, J.P. Soulillou and S. Brouard. (2008). Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *J Cell Biochem* **103**:1681-92.
- Braudeau, C., J. Ashton-Chess, M. Giral, E. Dugast, S. Louis, A. Pallier, C. Braud, A. Moreau, K. Renaudin, J.P. Soulillou and S. Brouard. (2008). Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* **86**:130-6.
- Braudeau, C., M. Racape, M. Giral, S. Louis, A. Moreau, L. Berthelot, M. Heslan, J. Ashton-Chess, J.P. Soulillou and S. Brouard. (2007). Variation in numbers of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int* **20**:845-55.
- Brouard, S., A. Dupont, M. Giral, S. Louis, D. Lair, C. Braudeau, N. Degauque, F. Moizant, A. Pallier, C. Ruiz, M. Guillet, D. Laplaud and J.P. Soulillou. (2005). Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* **5**:330-40.
- Brouard, S., E. Mansfield, C. Braud, L. Li, M. Giral, S.C. Hsieh, D. Baeten, M. Zhang, J. Ashton-Chess, C. Braudeau, F. Hsieh, A. Dupont, A. Pallier, A. Moreau, S. Louis, C. Ruiz, O. Salvatierra, J.P. Soulillou and M. Sarwal. (2007). Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:15448-53.
- Buhler, L.H., T.R. Spitzer, M. Sykes, D.H. Sachs, F.L. Delmonico, N. Tolloff-Rubin, S.L. Saidman, R. Sackstein, S. McAfee, B. Dey, C. Colby and A.B. Cosimi. (2002). Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* **74**:1405-9.
- Bunnag, S., G. Einecke, J. Reeve, G.S. Jhangri, T.F. Mueller, B. Sis, L.G. Hidalgo, M. Mengel, D. Kayser, B. Kaplan and P.F. Halloran. (2009). Molecular correlates of renal function in kidney transplant biopsies. *J Am Soc Nephrol* **20**:1149-60.
- Burlingham, W.J., A.P. Grailer, J.H. Fechner, Jr., S. Kusaka, M. Trucco, M. Kocova, F.O. Belzer and H.W. Sollinger. (1995). Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional

- unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* **59**:1147-55.
- Busauschina, A., P. Schnuelle and F.J. van der Woude. (2004). Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* **36**:229S-233S.
- Bush, K.T., S.K. George, P.L. Zhang and S.K. Nigam. (1999). Pretreatment with inducers of ER molecular chaperones protects epithelial cells subjected to ATP depletion. *Am J Physiol* **277**:F211-8.
- Butcher, J.A., S. Hariharan, M.B. Adams, C.P. Johnson, A.M. Roza and E.P. Cohen. (1999). Renal transplantation for end-stage renal disease following bone marrow transplantation: a report of six cases, with and without immunosuppression. *Clin Transplant* **13**:330-5.
- Butler, J.A., R.C. Peveler, P. Roderick, R. Horne and J.C. Mason. (2004). Measuring compliance with drug regimens after renal transplantation: comparison of self-report and clinician rating with electronic monitoring. *Transplantation* **77**:786-9.
- Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J.H. Till, S.R. Hubbard, H.P. Harding, S.G. Clark and D. Ron. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**:92-6.
- Calne, R. (2005). "Prope" tolerance: induction, lymphocyte depletion with minimal maintenance. *Transplantation* **80**:6-7.
- Calne, R., P. Friend, S. Moffatt, A. Bradley, G. Hale, J. Firth, J. Bradley, K. Smith and H. Waldmann. (1998). Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet* **351**:1701-2.
- Calne, R., S.D. Moffatt, P.J. Friend, N.V. Jamieson, J.A. Bradley, G. Hale, J. Firth, J. Bradley, K.G. Smith and H. Waldmann. (1999). Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* **68**:1613-6.
- Calne, R.Y. (2004). Prope tolerance--the future of organ transplantation from the laboratory to the clinic. *Transpl Immunol* **13**:83-6.
- Carter, J.T., C.M. Lee, R.J. Weinstein, A.D. Lu, D.C. Dafoe and E.J. Alfrey. (2000). Evaluation of the older cadaveric kidney donor: the impact of donor hypertension and creatinine clearance on graft performance and survival. *Transplantation* **70**:765-71.
- Chen, X., J. Shen and R. Prywes. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* **277**:13045-52.
- Cho, B.K., V.P. Rao, Q. Ge, H.N. Eisen and J. Chen. (2000). Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med* **192**:549-56.
- Christensen, L.L., N. Grunnet, N. Rudiger, B. Moller and S.A. Birkeland. (1998). Indications of immunological tolerance in kidney transplantation. *Tissue Antigens* **51**:637-44.
- Coenen, J.J., H.J. Koenen, E. van Rijssen, L.B. Hilbrands and I. Joosten. (2006). Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood* **107**:1018-23.
- Contreras, J.L., P.X. Wang, D.E. Eckhoff, A.L. Lobashevsky, C. Asiedu, L. Frenette, M.L. Robbin, W.J. Hubbard, S. Cartner, S. Nadler, W.J. Cook, J. Sharff, J. Shiloach, F.T. Thomas, D.M. Neville, Jr. and J.M. Thomas. (1998). Peritransplant tolerance induction with anti-CD3-immunotoxin: a matter of proinflammatory cytokine control. *Transplantation* **65**:1159-69.
- Cortesini, R. and N. Suci-Foca. (2004). The concept of "partial" clinical tolerance. *Transpl Immunol* **13**:101-4.
- Cox, J.S., R.E. Chapman and P. Walter. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **8**:1805-14.

- Cox, J.S., C.E. Shamu and P. Walter. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**:1197-206.
- Crevel, G., D. Bennett and S. Cotterill. (2008). The human TPR protein TTC4 is a putative Hsp90 co-chaperone which interacts with CDC6 and shows alterations in transformed cells. *PLoS One* **3**:e0001737.
- Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* **3**:609-20.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341 (Pt 2)**:233-49.
- Cullinan, S.B., D. Zhang, M. Hannink, E. Arvisais, R.J. Kaufman and J.A. Diehl. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* **23**:7198-209.
- Cybulsky, A.V. (2002). Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney Int* **77**:187-93.
- Danger, R., M. Giral, J.P. Soulillou and S. Brouard. (2008). Rationale and criteria of eligibility for calcineurin inhibitor interruption following kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **13**:609-13.
- Dantal, J. and J.P. Soulillou. (2005). Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* **352**:1371-3.
- Das, A.K., P.W. Cohen and D. Barford. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* **17**:1192-9.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-52.
- Dedrick, R.L., P. Walicke and M. Garovoy. (2002). Anti-adhesion antibodies efalizumab, a humanized anti-CD11a monoclonal antibody. *Transpl Immunol* **9**:181-6.
- Degauque, N., D. Lair, A. Dupont, A. Moreau, G. Roussey, F. Moizant, F.X. Hubert, C. Louvet, M. Hill, F. Haspot, R. Josien, C. Usal, B. Vanhove, J.P. Soulillou and S. Brouard. (2006). Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells. *J Immunol* **176**:3915-22.
- Demirci, G., T.B. Strom and X.C. Li. (2003). Islet allograft rejection in nonobese diabetic mice involves the common gamma-chain and CD28/CD154-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* **171**:3878-85.
- Deng, J., P.D. Lu, Y. Zhang, D. Scheuner, R.J. Kaufman, N. Sonenberg, H.P. Harding and D. Ron. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **24**:10161-8.
- Dickhout, J.G. and J.C. Krepinsky. (2009). Endoplasmic reticulum stress and renal disease. *Antioxid Redox Signal* **11**:2341-52.
- Dimcheff, D.E., S. Askovic, A.H. Baker, C. Johnson-Fowler and J.L. Portis. (2003). Endoplasmic reticulum stress is a determinant of retrovirus-induced spongiform neurodegeneration. *J Virol* **77**:12617-29.
- Ding, W.X., H.M. Ni, W. Gao, T. Yoshimori, D.B. Stolz, D. Ron and X.M. Yin. (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* **171**:513-24.
- Dorner, A.J. and R.J. Kaufman. (1994). The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins. *Biologicals* **22**:103-12.
- Dorner, A.J., L.C. Wasley and R.J. Kaufman. (1989). Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **264**:20602-7.

- Dresske, B., F. Haendschke, P. Lenz, H. Ungefroren, S. Jenisch, B. Exner, N.E. El Mokhtari, T. Lu, N. Zavazava and F. Faendrich. (2006). WOFIE stimulates regulatory T cells: a 2-year follow-up of renal transplant recipients. *Transplantation* **81**:1549-57.
- Eid, A.J. and R.R. Razonable. (2010). New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs* **70**:965-81.
- Einecke, G., J. Reeve, B. Sis, M. Mengel, L. Hidalgo, K.S. Famulski, A. Matas, B. Kasiske, B. Kaplan and P.F. Halloran. (2010). A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest* **120**:1862-72.
- Ellgaard, L. and A. Helenius. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:181-91.
- Ellis, C.N. and G.G. Krueger. (2001). Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med* **345**:248-55.
- Ellis, D., R. Shapiro, M. Moritz, A. Vats, A. Basu, H. Tan, L. Kayler, J. Janosky and T.E. Starzl. (2007). Renal transplantation in children managed with lymphocyte depleting agents and low-dose maintenance tacrolimus monotherapy. *Transplantation* **83**:1563-70.
- Emadali, A., D.T. Nguyen, C. Rochon, G.N. Tzimas, P.P. Metrakos and E. Chevet. (2005). Distinct endoplasmic reticulum stress responses are triggered during human liver transplantation. *J Pathol* **207**:111-8.
- Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson and J.C. Martinou. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**:929-35.
- Fehr, T. and M. Sykes. (2004). Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol* **13**:117-30.
- Ferri, K.F. and G. Kroemer. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**:E255-63.
- Fischer, T., H. Schobel and M. Barenbrock. (1996). Specific immune tolerance during pregnancy after renal transplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **70**:217-9.
- Fromont-Racine, M., J.C. Rain and P. Legrain. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* **16**:277-82.
- Gabai, V.L. and A.E. Kabakov. (1993). Rise in heat-shock protein level confers tolerance to energy deprivation. *FEBS Lett* **327**:247-50.
- Gagne, K., S. Brouard, M. Guillet, M.C. Cuturi and J.P. Soulillou. (2001). TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur J Immunol* **31**:3111-20.
- Gajewski, J.L., C. Ippoliti, Y. Ma and R. Champlin. (2002). Discontinuation of immunosuppression for prevention of kidney graft rejection after receiving a bone marrow transplant from the same HLA identical sibling donor. *Am J Hematol* **71**:311-3.
- Galigniana, M.D., A.G. Erlejan, M. Monte, C. Gomez-Sanchez and G. Piwien-Pilipuk. (2010). The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Mol Cell Biol* **30**:1285-98.
- Gallon, L., E. Gagliardini, A. Benigni, D. Kaufman, A. Waheed, M. Noris and G. Remuzzi. (2006). Immunophenotypic analysis of cellular infiltrate of renal allograft biopsies in patients with acute rejection after induction with alemtuzumab (Campath-1H). *Clin J Am Soc Nephrol* **1**:539-45.
- Gass, J.N., N.M. Gifford and J.W. Brewer. (2002). Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem* **277**:49047-54.
- Gentleman, R.C., V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y. Yang and J. Zhang. (2004).

- Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**:R80.
- Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* **10**:465-72.
- Godefroy, E., A. Moreau-Aubry, E. Diez, B. Dreno, F. Jotereau and Y. Guilloux. (2005). alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *J Exp Med* **202**:61-72.
- Gonzalez-Flecha, B., J.C. Cutrin and A. Boveris. (1993). Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* **91**:456-64.
- Gorlach, A., P. Klappa and T. Kietzmann. (2006). The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal* **8**:1391-418.
- Grbavec, D., R. Lo, Y. Liu, A. Greenfield and S. Stifani. (1999). Groucho/transducin-like enhancer of split (TLE) family members interact with the yeast transcriptional co-repressor SSN6 and mammalian SSN6-related proteins: implications for evolutionary conservation of transcription repression mechanisms. *Biochem J* **337** (Pt 1):13-7.
- Greenstein, S. and B. Siegal. (1998). Compliance and noncompliance in patients with a functioning renal transplant: a multicenter study. *Transplantation* **66**:1718-26.
- Habicht, A., M.R. Clarkson, J. Yang, J. Henderson, V. Brinkmann, S. Fernandes, M. Jurewicz, X. Yuan and M.H. Sayegh. (2006). Novel insights into the mechanism of action of FTY720 in a transgenic model of allograft rejection: implications for therapy of chronic rejection. *J Immunol* **176**:36-42.
- Hamawi, K., M. De Magalhaes-Silverman and J.A. Bertolatus. (2003). Outcomes of renal transplantation following bone marrow transplantation. *Am J Transplant* **3**:301-5.
- Han, S.W., C. Li, K.O. Ahn, S.W. Lim, H.G. Song, Y.S. Jang, Y.M. Cho, Y.M. Jang, J.Y. Ghee, J.Y. Kim, S.H. Kim, J. Kim, O.J. Kwon and C.W. Yang. (2008). Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol* **28**:707-14.
- Harding, H.P., Y. Zhang and D. Ron. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**:271-4.
- Hauer, J., S. Puschner, P. Ramakrishnan, U. Simon, M. Bongers, C. Federle and H. Engelmann. (2005). TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2874-9.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**:3787-99.
- Helg, C., B. Chapuis, J.F. Bolle, P. Morel, D. Salomon, E. Roux, V. Antonioli, M. Jeannet and M. Leski. (1994). Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance induced by allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* **58**:1420-2.
- Horwitz, P.A., E.J. Tsai, M.E. Putt, J.M. Gilmore, J.J. Lepore, M.S. Parmacek, A.C. Kao, S.S. Desai, L.R. Goldberg, S.C. Brozena, M.L. Jessup, J.A. Epstein and T.P. Cappola. (2004). Detection of cardiac allograft rejection and response to immunosuppressive therapy with peripheral blood gene expression. *Circulation* **110**:3815-21.
- Hoseki, J., R. Ushioda and K. Nagata. (2010). Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem* **147**:19-25.
- Hosokawa, N., L.O. Tremblay, Z. You, A. Herscovics, I. Wada and K. Nagata. (2003). Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J Biol Chem* **278**:26287-94.

- Hossmann, K.A. (1993). Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. *Prog Brain Res* **96**:161-77.
- Hu, P., Z. Han, A.D. Couvillon, R.J. Kaufman and J.H. Exton. (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* **26**:3071-84.
- Hussain, A.M., Q.X. Zhang and A.G. Murray. (2005). Endothelial cell calpain activity facilitates lymphocyte diapedesis. *Am J Transplant* **5**:2640-8.
- Hwang, J.R., C. Zhang and C. Patterson. (2005). C-terminus of heat shock protein 70-interacting protein facilitates degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent apoptosis. *Cell Stress Chaperones* **10**:147-56.
- Inagi, R. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Curr Opin Pharmacol* **10**:156-65.
- Inagi, R., T. Kumagai, H. Nishi, T. Kawakami, T. Miyata, T. Fujita and M. Nangaku. (2008). Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **19**:915-22.
- Ishida, H., O. Kohmoto, J.H. Bridge and W.H. Barry. (1988). Alterations in cation homeostasis in cultured chick ventricular cells during and after recovery from adenosine triphosphate depletion. *J Clin Invest* **81**:1173-81.
- Iwakoshi, N.N., A.H. Lee, P. Vallabhajosyula, K.L. Otipoby, K. Rajewsky and L.H. Glimcher. (2003). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* **4**:321-9.
- Iwakoshi, N.N., M. Pypaert and L.H. Glimcher. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* **204**:2267-75.
- Jassem, W., S. Fuggle, R. Thompson, M. Arno, J. Taylor, J. Byrne, N. Heaton and M. Rela. (2009). Effect of ischemic preconditioning on the genomic response to reperfusion injury in deceased donor liver transplantation. *Liver Transpl* **15**:1750-65.
- Jonker, M., J. Ringers, M.A. Ossevoort, W. Slingerland, Y. van den Hout, K. Haanstra, J. Wubben, E. Kuhn, P. Friend and R. Calne. (2002). Long-term kidney graft survival by delayed T cell ablative treatment in rhesus monkeys. *Transplantation* **73**:874-80.
- Jousse, C., S. Oyadomari, I. Novoa, P. Lu, Y. Zhang, H.P. Harding and D. Ron. (2003). Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* **163**:767-75.
- Kaneko, M., Y. Niinuma and Y. Nomura. (2003). Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull* **26**:931-5.
- Kawai, T., D. Andrews, R.B. Colvin, D.H. Sachs and A.B. Cosimi. (2000). Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* **6**:114.
- 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**:256-62.
- Kawai, T., A.B. Cosimi, T.R. Spitzer, N. Tolkoff-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**:353-61.
- Kelly, K.J. and B.A. Molitoris. (2000). Acute renal failure in the new millennium: time to consider combination therapy. *Semin Nephrol* **20**:4-19.

- Khayyamian, S., A. Hutloff, K. Buchner, M. Grafe, V. Henn, R.A. Kroczeck and H.W. Mages. (2002). ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6198-203.
- Kim, I., W. Xu and J.C. Reed. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **7**:1013-30.
- Kimikawa, M., T. Kawai, D.H. Sachs, R.B. Colvin, A. Bartholomew and A.B. Cosimi. (1997a). Mixed chimerism and transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen in cynomolgus monkeys. *Transplant Proc* **29**:1218.
- Kimikawa, M., D.H. Sachs, R.B. Colvin, A. Bartholomew, T. Kawai and A.B. Cosimi. (1997b). Modifications of the conditioning regimen for achieving mixed chimerism and donor-specific tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* **64**:709-16.
- Kimura, K., H. Jin, M. Ogawa and T. Aoe. (2008). Dysfunction of the ER chaperone BiP accelerates the renal tubular injury. *Biochem Biophys Res Commun* **366**:1048-53.
- Kingsley, C.I., S.N. Nadig and K.J. Wood. (2007). Transplantation tolerance: lessons from experimental rodent models. *Transpl Int* **20**:828-41.
- Kirk, A.D., L.C. Burkly, D.S. Batty, R.E. Baumgartner, J.D. Berning, K. Buchanan, J.H. Fechner, Jr., R.L. Germond, R.L. Kampen, N.B. Patterson, S.J. Swanson, D.K. Tadaki, C.N. TenHoor, L. White, S.J. Knechtle and D.M. Harlan. (1999). Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* **5**:686-93.
- Kirk, A.D., D.A. Hale, R.B. Mannon, D.E. Kleiner, S.C. Hoffmann, R.L. Kampen, L.K. Cendales, D.K. Tadaki, D.M. Harlan and S.J. Swanson. (2003). Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Transplantation* **76**:120-9.
- Kirk, A.D., D.M. Harlan, N.N. Armstrong, T.A. Davis, Y. Dong, G.S. Gray, X. Hong, D. Thomas, J.H. Fechner, Jr. and S.J. Knechtle. (1997). CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:8789-94.
- Kirk, A.D., D.K. Tadaki, A. Celniker, D.S. Batty, J.D. Berning, J.O. Colonna, F. Cruzata, E.A. Elster, G.S. Gray, R.L. Kampen, N.B. Patterson, P. Szklut, J. Swanson, H. Xu and D.M. Harlan. (2001). Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* **72**:377-84.
- Kitamura, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**:F323-34.
- Knechtle, S.J., M.M. Hamawy, H. Hu, J.H. Fechner, Jr. and C.S. Cho. (2001). Tolerance and near-tolerance strategies in monkeys and their application to human renal transplantation. *Immunol Rev* **183**:205-13.
- Knechtle, S.J., J.D. Pirsch, J. H. Fechner, J. B.N. Becker, A. Friedl, R.B. Colvin, L.K. Lebeck, L.T. Chin, Y.T. Becker, J.S. Odorico, A.M. D'Alessandro, M. Kalayoglu, M.M. Hamawy, H. Hu, D.D. Bloom and H.W. Sollinger. (2003). Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation: results of a pilot study. *Am J Transplant* **3**:722-30.
- Knechtle, S.J., D. Vargo, J. Fechner, Y. Zhai, J. Wang, M.J. Hanaway, J. Scharff, H. Hu, L. Knapp, D. Watkins and D.M. Neville, Jr. (1997). FN18-CRM9 immunotoxin promotes tolerance in primate renal allografts. *Transplantation* **63**:1-6.
- Kokame, K., H. Kato and T. Miyata. (2001). Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem* **276**:9199-205.
- Koyama, I., T. Kawai, D. Andrews, S. Boskovic, O. Nadazdin, S.L. Wee, H. Sogawa, D.L. Wu, R.N. Smith, R.B. Colvin, D.H. Sachs and A.B. Cosimi. (2004). Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in nonhuman primates. *Transplantation* **77**:460-2.

- Koyama, I., O. Nadazdin, S. Boskovic, T. Ochiai, R.N. Smith, M. Sykes, H. Sogawa, T. Murakami, T.B. Strom, R.B. Colvin, D.H. Sachs, G. Benichou, A.B. Cosimi and T. Kawai. (2007). Depletion of CD8 memory T cells for induction of tolerance of a previously transplanted kidney allograft. *Am J Transplant* **7**:1055-61.
- Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M.J. Gething and J. Sambrook. (1988). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**:462-4.
- Kuznetsov, G., K.T. Bush, P.L. Zhang and S.K. Nigam. (1996). Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:8584-9.
- Kuznetsov, G. and S.K. Nigam. (1998). Folding of secretory and membrane proteins. *N Engl J Med* **339**:1688-95.
- Lecker, S.H., A.L. Goldberg and W.E. Mitch. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* **17**:1807-19.
- Lee, A.H., N.N. Iwakoshi and L.H. Glimcher. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **23**:7448-59.
- Lee, A.S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* **26**:504-10.
- Lee, K., W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori and R.J. Kaufman. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* **16**:452-66.
- Leonardi, A., P. Vito, C. Mauro, F. Pacifico, L. Ulianich, E. Consiglio, S. Formisano and B. Di Jeso. (2002). Endoplasmic reticulum stress causes thyroglobulin retention in this organelle and triggers activation of nuclear factor-kappa B via tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Endocrinology* **143**:2169-77.
- Li, B., C. Hartono, R. Ding, V.K. Sharma, R. Ramaswamy, B. Qian, D. Serur, J. Mouradian, J.E. Schwartz and M. Suthanthiran. (2001). Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* **344**:947-54.
- Li, Y., T. Koshiba, A. Yoshizawa, Y. Yonekawa, K. Masuda, A. Ito, M. Ueda, T. Mori, H. Kawamoto, Y. Tanaka, S. Sakaguchi, N. Minato, K.J. Wood and K. Tanaka. (2004). Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* **4**:2118-25.
- Lindenmeyer, M.T., M.P. Rastaldi, M. Ikehata, M.A. Neusser, M. Kretzler, C.D. Cohen and D. Schlondorff. (2008). Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress. *J Am Soc Nephrol* **19**:2225-36.
- Lindholm, D., H. Wootz and L. Korhonen. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* **13**:385-92.
- Liu, L., S.C. Done, J. Khoshnoodi, A. Bertorello, J. Wartiovaara, P.O. Berggren and K. Tryggvason. (2001). Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet* **10**:2637-44.
- Lopez-Hoyos, M., D.S. Segundo, G. Fernandez-Fresnedo, M.J. Marin, V. Gonzalez-Martin and M. Arias. (2009). Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression. *Transplantation* **88**:S31-9.
- Lott, D.G., O. Dan, L. Lu and M. Strome. (2010). Decoy NF-kappaB fortified immature dendritic cells maintain laryngeal allograft integrity and provide enhancement of regulatory T cells. *Laryngoscope* **120**:44-52.

- Louis, S., C. Braudeau, M. Giral, A. Dupont, F. Moizant, N. Robillard, A. Moreau, J.P. Soullillou and S. Brouard. (2006). Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* **81**:398-407.
- Ma, Y., J.W. Brewer, J.A. Diehl and L.M. Hendershot. (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* **318**:1351-65.
- Ma, Y. and L.M. Hendershot. (2003). Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **278**:34864-73.
- Majors, A.K., R.C. Austin, C.A. de la Motte, R.E. Pyeritz, V.C. Hascall, S.P. Kessler, G. Sen and S.A. Strong. (2003). Endoplasmic reticulum stress induces hyaluronan deposition and leukocyte adhesion. *J Biol Chem* **278**:47223-31.
- Malewicz, M., N. Zeller, Z.B. Yilmaz and F. Weih. (2003). NF kappa B controls the balance between Fas and tumor necrosis factor cell death pathways during T cell receptor-induced apoptosis via the expression of its target gene A20. *J Biol Chem* **278**:32825-33.
- Malossini, A., E. Blanzieri and R.T. Ng. (2006). Detecting potential labeling errors in microarrays by data perturbation. *Bioinformatics* **22**:2114-21.
- Manfro, R.C., E.C. Aquino-Dias, G. Joelsons, A.L. Nogare, V.N. Carpio and L.F. Goncalves. (2008). Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* **86**:1869-74.
- Martinez-Llordella, M., I. Puig-Pey, G. Orlando, M. Ramoni, G. Tisone, A. Rimola, J. Lerut, D. Latinne, C. Margarit, I. Bilbao, S. Brouard, M. Hernandez-Fuentes, J.P. Soullillou and A. Sanchez-Fueyo. (2007). Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* **7**:309-19.
- Mas, V., D. Maluf, K. Archer, K. Yanek, L. Mas, A. King, E. Gibney, D. Massey, A. Cotterell, R. Fisher and M. Posner. (2007). Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers. *Transplantation* **83**:448-57.
- Matthes-Martin, S., C. Peters, A. Konigsrainer, G. Fritsch, T. Lion, A. Heitger, K. Kapelari, M. Kronberger, F. Offner, F. Wrba, R. Margreiter and H. Gardner. (2000). Successful stem cell transplantation following orthotopic liver transplantation from the same haploidentical family donor in a girl with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* **96**:3997-9.
- McCullough, K.D., J.L. Martindale, L.O. Klotz, T.Y. Aw and N.J. Holbrook. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**:1249-59.
- Mehrabi, A., A. Mood Zh, M. Sadeghi, B.M. Schmied, S.A. Muller, T. Welsch, G. Kuttymuratov, M.N. Wentz, J. Weitz, M. Zeier, C. Morath, C. Riediger, P. Schemmer, J. Encke, M.W. Buchler and J. Schmidt. (2007). Thymoglobulin and ischemia reperfusion injury in kidney and liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* **22 Suppl 8**:viii54-viii60.
- Meloni, F., P. Vitulo, A.M. Bianco, E. Paschetto, M. Morosini, A. Cascina, I. Mazzucchelli, L. Ciardelli, T. Oggioni, A.M. Fietta, E. Pozzi and M. Vigano. (2004). Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* **77**:762-6.
- Mengel, M., J. Reeve, S. Bunnag, G. Einecke, G.S. Jhangri, B. Sis, K. Famulski, L. Guembes-Hidalgo and P.F. Halloran. (2009). Scoring total inflammation is superior to the current Banff inflammation score in predicting outcome and the degree of molecular disturbance in renal allografts. *Am J Transplant* **9**:1859-67.
- Millan, M.T., J.A. Shizuru, P. Hoffmann, S. Dejbakhsh-Jones, J.D. Scandling, F.C. Grumet, J.C. Tan, O. Salvatierra, R.T. Hoppe and S. Strober. (2002). Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation* **73**:1386-91.

- Moers, C., J.M. Smits, M.H. Maathuis, J. Treckmann, F. van Gelder, B.P. Napieralski, M. van Kasterop-Kutz, J.J. van der Heide, J.P. Squifflet, E. van Heurn, G.R. Kirste, A. Rahmel, H.G. Leuvenink, A. Paul, J. Pirenne and R.J. Ploeg. (2009). Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* **360**:7-19.
- Molinerio, L.L., Y. Wang, P. Zhou, H. Yagita and M.L. Alegre. (2009). Fas mediates cardiac allograft acceptance in mice with impaired T-cell-intrinsic NF-kappaB signaling. *Transpl Int* **22**:845-52.
- Monaco, A.P. (2004). Prospects and strategies for clinical tolerance. *Transplant Proc* **36**:227-31.
- Moraes-Vieira, P.M., H.M. Silva, M.C. Takenaka, S.M. Monteiro, F. Lemos, D. Saitovitch, J. Kalil and V. Coelho. (2010). Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Hum Immunol* **71**:442-50.
- Mueller, T.F., G. Einecke, J. Reeve, B. Sis, M. Mengel, G.S. Jhangri, S. Bunnag, J. Cruz, D. Wishart, C. Meng, G. Broderick, B. Kaplan and P.F. Halloran. (2007). Microarray analysis of rejection in human kidney transplants using pathogenesis-based transcript sets. *Am J Transplant* **7**:2712-22.
- Mund, T., A. Gewies, N. Schoenfeld, M.K. Bauer and S. Grimm. (2003). Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J* **17**:696-8.
- Muruganandan, S. and A.E. Cribb. (2006). Calpain-induced endoplasmic reticulum stress and cell death following cytotoxic damage to renal cells. *Toxicol Sci* **94**:118-28.
- Myburgh, J.A., A.M. Meyers, P.D. Thomson, J.R. Botha, L. Margolius, R. Lakier, J.A. Smit, J.H. Stark and C. Gray. (1989). Total lymphoid irradiation--current status. *Transplant Proc* **21**:826-8.
- Myburgh, J.A., J.A. Smit, R.R. Hill and S. Browde. (1980). Transplantation tolerance in primates following total lymphoid irradiation and allogeneic bone marrow injection. II. Renal allografts. *Transplantation* **29**:405-8.
- Myburgh, J.A., J.A. Smit, G.A. Pieterz, S. Ling, M.S. Sandrin and I.F. McKenzie. (2001). Tolerance in baboon kidney transplantation with total lymphoid irradiation (TLI) and anti-CD3/CD4-idarubicin conjugates. *Transplantation* **72**:1150-2.
- Nakagawa, T., M. Shirane, S. Iemura, T. Natsume and K.I. Nakayama. (2007). Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells* **12**:709-19.
- Nakagawa, T. and J. Yuan. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* **150**:887-94.
- Nakajo, A., J. Khoshnoodi, H. Takenaka, E. Hagiwara, T. Watanabe, H. Kawakami, R. Kurayama, Y. Sekine, F. Bessho, S. Takahashi, A. Swiatecka-Urban, K. Tryggvason and K. Yan. (2007). Mizoribine corrects defective nephrin biogenesis by restoring intracellular energy balance. *J Am Soc Nephrol* **18**:2554-64.
- Nankivell, B.J., R.J. Borrows, C.L. Fung, P.J. O'Connell, R.D. Allen and J.R. Chapman. (2003). The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* **349**:2326-33.
- Newell, K.A., A. Asare, A.D. Kirk, T.D. Gisler, K. Bourcier, M. Suthanthiran, W.J. Burlingham, W.H. Marks, I. Sanz, R.I. Lechler, M.P. Hernandez-Fuentes, L.A. Turka and V.L. Seyfert-Margolis. (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* **120**:1836-47.
- Nguyen, T., P.J. Sherratt and C.B. Pickett. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**:233-60.
- Nishitoh, H., A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka and H. Ichijo. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16**:1345-55.
- Ogata, M., S. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, M. Taniguchi, I. Tanii, K. Yoshinaga, S. Shiosaka, J.A. Hammarback, F. Urano and K. Imaizumi. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**:9220-31.

- Ohmori, K., S. Takeda, S. Miyoshi, M. Minami, S. Nakane, M. Ohta, Y. Sawa and H. Matsuda. (2005). Attenuation of lung injury in allograft rejection using NF-kappaB decoy transfection-novel strategy for use in lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* **27**:23-7.
- Ohno, K., A.G. Engel, X.M. Shen, D. Selcen, J. Brengman, C.M. Harper, A. Tsujino and M. Milone. (2002). Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am J Hum Genet* **70**:875-85.
- Okada, T., H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi and K. Mori. (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* **366**:585-94.
- Orlando, G., S. Soker and K. Wood. (2009). Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol* **50**:1247-57.
- Pallet, N., N. Bouvier, P. Beaune, C. Legendre, E. Thervet and D. Anglicheau. (2009a). [Endoplasmic reticulum stress in kidney diseases: a question of life and death?]. *Nephrol Ther* **5**:173-80.
- Pallet, N., N. Bouvier, A. Bendjallah, M. Rabant, J.P. Flinois, A. Hertig, C. Legendre, P. Beaune, E. Thervet and D. Anglicheau. (2008a). Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant* **8**:2283-96.
- Pallet, N., N. Bouvier, C. Legendre, J. Gilleron, P. Codogno, P. Beaune, E. Thervet and D. Anglicheau. (2008b). Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy* **4**:783-91.
- Pallet, N., S. Fougeray, P. Beaune, C. Legendre, E. Thervet and D. Anglicheau. (2009b). Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. *Transplantation* **88**:605-13.
- Pallet, N., M. Rabant, Y.C. Xu-Dubois, D. Lecorre, M.H. Mucchielli, S. Imbeaud, N. Agier, A. Hertig, E. Thervet, C. Legendre, P. Beaune and D. Anglicheau. (2008c). Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol* **229**:184-96.
- Pallier, A., S. Hillion, R. Danger, M. Giral, M. Racape, N. Degauque, E. Dugast, J. Ashton-Chess, S. Pettre, J.J. Lozano, R. Bataille, A. Devys, A. Cesbron-Gautier, C. Braudeau, C. Larrose, J.P. Soulillou and S. Brouard. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.*
- Perry, D.K., J.M. Burns, H.S. Pollinger, B.P. Amiot, J.M. Gloor, G.J. Gores and M.D. Stegall. (2009). Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant* **9**:201-9.
- Poirier, N., A.M. Azimzadeh, T. Zhang, N. Dilek, C. Mary, B. Nguyen, X. Tillou, G. Wu, K. Reneaudin, J. Hervouet, B. Martinet, F. Coulon, E. Allain-Launay, G. Karam, J.P. Soulillou, R.N. Pierson, 3rd, G. Blancho and B. Vanhove. (2010). Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med* **2**:17ra10.
- Porcheray, F., W. Wong, S.L. Saidman, J. De Vito, T.C. Girouard, M. Chittenden, J. Shaffer, N. Tolloff-Rubin, B.R. Dey, T.R. Spitzer, R.B. Colvin, A.B. Cosimi, T. Kawai, D.H. Sachs, M. Sykes and E. Zorn. (2009). B-cell immunity in the context of T-cell tolerance after combined kidney and bone marrow transplantation in humans. *Am J Transplant* **9**:2126-35.
- Pouyssegur, J., R.P. Shiu and I. Pastan. (1977). Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell* **11**:941-7.
- Rachidi, M., C. Lopes, S. Gassanova, P.M. Sinet, M. Vekemans, T. Attie, A.L. Delezoide and J.M. Delabar. (2000). Regional and cellular specificity of the expression of TPRD, the

- tetratricopeptide Down syndrome gene, during human embryonic development. *Mech Dev* **93**:189-93.
- Rao, R.V., S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D.E. Bredesen and H.M. Ellerby. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* **277**:21836-42.
- Reimold, A.M., N.N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E.M. Gravallesse, D. Friend, M.J. Grusby, F. Alt and L.H. Glimcher. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**:300-7.
- Ringden, O., G. Soderdahl, J. Mattsson, M. Uzunel, M. Remberger, P. Hentschke, H. Hagglund, E. Sparrelid, A. Elmhorn-Rosenborg, F. Duraj, H. Zetterquist and B.G. Ericzon. (2000). Transplantation of autologous and allogeneic bone marrow with liver from a cadaveric donor for primary liver cancer. *Transplantation* **69**:2043-8.
- Roussey-Kesler, G., M. Giral, A. Moreau, J.F. Subra, C. Legendre, C. Noel, E. Pillebout, S. Brouard and J.P. Souillou. (2006). Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* **6**:736-46.
- Rutkowski, D.T. and R.J. Kaufman. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* **14**:20-8.
- Sagoo, P., E. Perucha, B. Sawitzki, S. Tomiuk, D.A. Stephens, P. Miqueu, S. Chapman, L. Craciun, R. Sergeant, S. Brouard, F. Rovis, E. Jimenez, A. Ballow, M. Giral, I. Rebollo-Mesa, A. Le Moine, C. Braudeau, R. Hilton, B. Gerstmayer, K. Bourcier, A. Sharif, M. Krajewska, G.M. Lord, I. Roberts, M. Goldman, K.J. Wood, K. Newell, V. Seyfert-Margolis, A.N. Warrens, U. Janssen, H.D. Volk, J.P. Souillou, M.P. Hernandez-Fuentes and R.I. Lechler. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* **120**:1848-61.
- Salama, A.D., N. Najafian, M.R. Clarkson, W.E. Harmon and M.H. Sayegh. (2003). Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* **14**:1643-51.
- Sawitzki, B., A. Pascher, N. Babel, P. Reinke and H.D. Volk. (2009). Can we use biomarkers and functional assays to implement personalized therapies in transplantation? *Transplantation* **87**:1595-601.
- Sayegh, M.H., N.A. Fine, J.L. Smith, H.G. Rennke, E.L. Milford and N.L. Tilney. (1991). Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors. *Ann Intern Med* **114**:954-5.
- 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**:362-8.
- Schroder, M., J.S. Chang and R.J. Kaufman. (2000). The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes Dev* **14**:2962-75.
- Schroder, M., R. Clark, C.Y. Liu and R.J. Kaufman. (2004). The unfolded protein response represses differentiation through the RPD3-SIN3 histone deacetylase. *EMBO J* **23**:2281-92.
- Schroder, M. and R.J. Kaufman. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**:739-89.
- Schuck, S., W.A. Prinz, K.S. Thorn, C. Voss and P. Walter. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol* **187**:525-36.
- Sellers, M.T., M.H. Deierhoi, J.J. Curtis, R.S. Gaston, B.A. Julian, D.C. Lanier, Jr. and A.G. Diethelm. (2001). Tolerance in renal transplantation after allogeneic bone marrow transplantation-6-year follow-up. *Transplantation* **71**:1681-3.

- Serasinghe, M.N., A.M. Seneviratne, A.V. Smrcka and Y. Yoon. (2010). Identification and characterization of unique proline-rich peptides binding to the mitochondrial fission protein hFis1. *J Biol Chem* **285**:620-30.
- Setoguchi, K., H. Kishimoto, S. Kobayashi, H. Shimmura, H. Ishida, D. Toki, T. Suzuki, K. Ohnuki, Y. Tate, S. Fujioka, R. Abe and K. Tanabe. (2010). Potential role of host effector memory CD8(+) T cells in marrow rejection after mixed chimerism induction in cynomolgus monkeys. *Transpl Immunol*.
- Shaffer, A.L., M. Shapiro-Shelef, N.N. Iwakoshi, A.H. Lee, S.B. Qian, H. Zhao, X. Yu, L. Yang, B.K. Tan, A. Rosenwald, E.M. Hurt, E. Petroulakis, N. Sonenberg, J.W. Yewdell, K. Calame, L.H. Glimcher and L.M. Staudt. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**:81-93.
- Sidrauski, C. and P. Walter. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**:1031-9.
- Sikorski, R.S., M.S. Boguski, M. Goebel and P. Hieter. (1990). A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* **60**:307-17.
- Sis, B., M. Mengel, M. Haas, R.B. Colvin, P.F. Halloran, L.C. Racusen, K. Solez, W.M. Baldwin, 3rd, E.R. Bracamonte, V. Broecker, F. Cosio, A.J. Demetris, C. Drachenberg, G. Einecke, J. Gloor, D. Glotz, E. Kraus, C. Legendre, H. Liapis, R.B. Mannon, B.J. Nankivell, V. Nickleit, J.C. Papadimitriou, P. Randhawa, H. Regele, K. Renaudin, E.R. Rodriguez, D. Seron, S. Seshan, M. Suthanthiran, B.A. Wasowska, A. Zachary and A. Zeevi. (2010). Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. *Am J Transplant*.
- Sivozhelozov, V., C. Braud, L. Giacomelli, E. Pechkova, M. Giral, J.P. Soulillou, S. Brouard and C. Nicolini. (2008). Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplants recipients. Part II. Non-statistical gene microarray analysis. *J Cell Biochem* **103**:1693-706.
- Soulillou, J.P., C.B. Carpenter, A.J. d'Apice and T.B. Strom. (1976). The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J Exp Med* **143**:405-21.
- Spitzer, T.R., F. Delmonico, N. Tolkoff-Rubin, S. McAfee, R. Sackstein, S. Saidman, C. Colby, M. Sykes, D.H. Sachs and A.B. Cosimi. (1999). Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* **68**:480-4.
- Sriburi, R., S. Jackowski, K. Mori and J.W. Brewer. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **167**:35-41.
- Stanley, W.A., F.V. Filipp, P. Kursula, N. Schuller, R. Erdmann, W. Schliebs, M. Sattler and M. Wilmanns. (2006). Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p. *Mol Cell* **24**:653-63.
- Starzl, T.E., N. Murase, K. Abu-Elmagd, E.A. Gray, R. Shapiro, B. Eghtesad, R.J. Corry, M.L. Jordan, P. Fontes, T. Gayowski, G. Bond, V.P. Scantlebury, S. Potdar, P. Randhawa, T. Wu, A. Zeevi, M.A. Nalesnik, J. Woodward, A. Marcos, M. Trucco, A.J. Demetris and J.J. Fung. (2003). Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* **361**:1502-10.
- Starzl, T.E., N. Murase, A.J. Demetris, M. Trucco, K. Abu-Elmagd, E.A. Gray, B. Eghtesad, R. Shapiro, A. Marcos and J.J. Fung. (2004). Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* **77**:926-9.

- Strober, S., C. Benike, S. Krishnaswamy, E.G. Engleman and F.C. Grumet. (2000). Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* **69**:1549-54.
- Strober, S., M. Dhillon, M. Schubert, B. Holm, E. Engleman, C. Benike, R. Hoppe, R. Sibley, J.A. Myburgh, G. Collins and et al. (1989). Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation. *N Engl J Med* **321**:28-33.
- Strober, S., D.L. Modry, R.T. Hoppe, J.L. Pennock, C.P. Bieber, B.I. Holm, S.W. Jamieson, E.B. Stinson, J. Schroder, H. Suomalainen and et al. (1984). Induction of specific unresponsiveness to heart allografts in mongrel dogs treated with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin. *J Immunol* **132**:1013-8.
- Stroka, D.M., A.Z. Badrichani, F.H. Bach and C. Ferran. (1999). Overexpression of A1, an NF-kappaB-inducible anti-apoptotic bcl gene, inhibits endothelial cell activation. *Blood* **93**:3803-10.
- Suthanthiran, M. (1998). Human renal allograft rejection: molecular characterization. *Nephrol Dial Transplant* **13 Suppl 1**:21-4.
- Swanson, S.J., D.A. Hale, R.B. Mannon, D.E. Kleiner, L.C. Cendales, C.E. Chamberlain, S.M. Polly, D.M. Harlan and A.D. Kirk. (2002). Kidney transplantation with rabbit antithymocyte globulin induction and sirolimus monotherapy. *Lancet* **360**:1662-4.
- Tantravahi, J., K.L. Womer and B. Kaplan. (2007). Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annu Rev Med* **58**:369-85.
- Thaunat, O., C. Legendre, E. Morelon, H. Kreis and M.F. Mamzer-Bruneel. (2007). To biopsy or not to biopsy? Should we screen the histology of stable renal grafts? *Transplantation* **84**:671-6.
- Thomas, J.M., J.L. Contreras, X.L. Jiang, D.E. Eckhoff, P.X. Wang, W.J. Hubbard, A.L. Lobashevsky, W. Wang, C. Asiedu, S. Stavrou, W.J. Cook, M.L. Robbin, F.T. Thomas and D.M. Neville, Jr. (1999). Peritransplant tolerance induction in macaques: early events reflecting the unique synergy between immunotoxin and deoxyspergualin. *Transplantation* **68**:1660-73.
- Todd, D.J., L.J. McHeyzer-Williams, C. Kowal, A.H. Lee, B.T. Volpe, B. Diamond, M.G. McHeyzer-Williams and L.H. Glimcher. (2009). XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J Exp Med* **206**:2151-9.
- Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman and P. Walter. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**:249-58.
- Tu, B.P. and J.S. Weissman. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* **164**:341-6.
- Tusher, V.G., R. Tibshirani and G. Chu. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5116-21.
- Tusnady, G.E. and I. Simon. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**:849-50.
- Uehling, D.T., J.L. Hussey, A.B. Weinstein, R. Wank and F.H. Bach. (1976). Cessation of immunosuppression after renal transplantation. *Surgery* **79**:278-82.
- van der Sanden, M.H., M. Houweling, L.M. van Golde and A.B. Vaandrager. (2003). Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem J* **369**:643-50.
- van Laar, T., A.J. van der Eb and C. Terleth. (2001). Mif1: a missing link between the unfolded protein response pathway and ER-associated protein degradation? *Curr Protein Pept Sci* **2**:169-90.
- VanBuskirk, A.M., W.J. Burlingham, E. Jankowska-Gan, T. Chin, S. Kusaka, F. Geissler, R.P. Pelletier and C.G. Orosz. (2000). Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* **106**:145-55.

- Vattem, K.M. and R.C. Wek. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:11269-74.
- Veenstra, D.L., J.H. Best, J. Hornberger, S.D. Sullivan and D.E. Hricik. (1999). Incidence and long-term cost of steroid-related side effects after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* **33**:829-39.
- Villanueva, M.E., A.S. Munoz, C.C. Casasola, J.B. Africa, R.A. Danguilan and E.T. Ona. (2008). Alemtuzumab induction with tacrolimus monotherapy in de novo renal transplantation. *Transplant Proc* **40**:2222-5.
- Vincenti, F., R. Mendez, M. Pescovitz, P.R. Rajagopalan, A.H. Wilkinson, K. Butt, D. Laskow, D.P. Slakey, M.I. Lorber, J.P. Garg and M. Garovoy. (2007). A phase I/II randomized open-label multicenter trial of efalizumab, a humanized anti-CD11a, anti-LFA-1 in renal transplantation. *Am J Transplant* **7**:1770-7.
- Walsh, R.C., J.J. Everly, P. Brailey, A.H. Rike, L.J. Arend, G. Mogilishetty, A. Govil, P. Roy-Chaudhury, R.R. Alloway and E.S. Woodle. (2010). Proteasome inhibitor-based primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection. *Transplantation* **89**:277-84.
- Wang, Y., J. Shen, N. Arenzana, W. Tirasophon, R.J. Kaufman and R. Prywes. (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* **275**:27013-20.
- Watanabe, R., N. Ishiura, H. Nakashima, Y. Kuwano, H. Okochi, K. Tamaki, S. Sato, T.F. Tedder and M. Fujimoto. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol* **184**:4801-9.
- Watson, C.J., J.A. Bradley, P.J. Friend, J. Firth, C.J. Taylor, J.R. Bradley, K.G. Smith, S. Thiru, N.V. Jamieson, G. Hale, H. Waldmann and R. Calne. (2005). Alemtuzumab (CAMPATH 1H) induction therapy in cadaveric kidney transplantation--efficacy and safety at five years. *Am J Transplant* **5**:1347-53.
- Wheeler, M.C., M. Rizzi, R. Sasik, G. Almanza, G. Hardiman and M. Zanetti. (2008). KDEL-retained antigen in B lymphocytes induces a proinflammatory response: a possible role for endoplasmic reticulum stress in adaptive T cell immunity. *J Immunol* **181**:256-64.
- Wu, Y. and B. Sha. (2006). Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p. *Nat Struct Mol Biol* **13**:589-93.
- Wu, Z., S.J. Bensinger, J. Zhang, C. Chen, X. Yuan, X. Huang, J.F. Markmann, A. Kassaei, B.R. Rosengard, W.W. Hancock, M.H. Sayegh and L.A. Turka. (2004). Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med* **10**:87-92.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre and J.C. Reed. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* **115**:2656-64.
- Xue, X., J.H. Piao, A. Nakajima, S. Sakon-Komazawa, Y. Kojima, K. Mori, H. Yagita, K. Okumura, H. Harding and H. Nakano. (2005). Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem* **280**:33917-25.
- Yan, W., C.L. Frank, M.J. Korth, B.L. Sopher, I. Novoa, D. Ron and M.G. Katze. (2002). Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15920-5.
- Yanaba, K., J.D. Bouaziz, K.M. Haas, J.C. Poe, M. Fujimoto and T.F. Tedder. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* **28**:639-50.
- Yang, J., M.O. Brook, M. Carvalho-Gaspar, J. Zhang, H.E. Ramon, M.H. Sayegh, K.J. Wood, L.A. Turka and N.D. Jones. (2007). Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:19954-9.

- Ye, J., R.B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U.P. Dave, R. Prywes, M.S. Brown and J.L. Goldstein. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6**:1355-64.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama and M. Tohyama. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* **276**:13935-40.
- Yorimitsu, T., U. Nair, Z. Yang and D.J. Klionsky. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* **281**:30299-304.
- Yoshida, H., T. Matsui, N. Hosokawa, R.J. Kaufman, K. Nagata and K. Mori. (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* **4**:265-71.
- Yu, E.Y., O. Steinberg-Neifach, A.T. Dandjinou, F. Kang, A.J. Morrison, X. Shen and N.F. Lue. (2007). Regulation of telomere structure and functions by subunits of the INO80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol* **27**:5639-49.
- Yuan, X., A.D. Salama, V. Dong, I. Schmitt, N. Najafian, A. Chandraker, H. Akiba, H. Yagita and M.H. Sayegh. (2003). The role of the CD134-CD134 ligand costimulatory pathway in alloimmune responses in vivo. *J Immunol* **170**:2949-55.
- Zeeberg, B.R., W. Feng, G. Wang, M.D. Wang, A.T. Fojo, M. Sunshine, S. Narasimhan, D.W. Kane, W.C. Reinhold, S. Lababidi, K.J. Bussey, J. Riss, J.C. Barrett and J.N. Weinstein. (2003). GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* **4**:R28.
- Zeiser, R., V.H. Nguyen, A. Beilhack, M. Buess, S. Schulz, J. Baker, C.H. Contag and R.S. Negrin. (2006). Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* **108**:390-9.
- Zhang, K. and R.J. Kaufman. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**:455-62.
- Zhang, K., H.N. Wong, B. Song, C.N. Miller, D. Scheuner and R.J. Kaufman. (2005). The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest* **115**:268-81.
- Zhang, X., M. Li and W.P. Min. (2010). Preventing immune rejection through gene silencing. *Methods Mol Biol* **623**:357-71.
- Zhou, P., S.J. Balin, M. Mashayekhi, K.W. Hwang, D.A. Palucki and M.L. Alegre. (2005). Transplantation tolerance in NF-kappaB-impaired mice is not due to regulation but is prevented by transgenic expression of Bcl-xL. *J Immunol* **174**:3447-53.
- Zhou, P., K.W. Hwang, D.A. Palucki, Z. Guo, M. Boothby, K.A. Newell and M.L. Alegre. (2003). Impaired NF-kappaB activation in T cells permits tolerance to primary heart allografts and to secondary donor skin grafts. *Am J Transplant* **3**:139-47.
- Zinszner, H., M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R.T. Lightfoot, H. Remotti, J.L. Stevens and D. Ron. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **12**:982-95.
- Zoller, K.M., S.I. Cho, J.J. Cohen and J.T. Harrington. (1980). Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey. *Kidney Int* **18**:110-4.
- Zong, W.X., C. Li, G. Hatzivassiliou, T. Lindsten, Q.C. Yu, J. Yuan and C.B. Thompson. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* **162**:59-69.

ANNEXES

Annexe 1

INTERLEUKIN 7 RECEPTOR ALPHA AS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET IN TRANSPLANTATION

Par: Maud Racapé, Bernard Vanhove, Jean–Paul Souillou and Sophie Brouard

Publié dans *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2009, 57, 253–261

REVIEW

Arch. Immunol. Ther. Exp., 2009, 57, 253–261
 PL ISSN 0004-069X
 DOI 10.1007/s00005-009-0036-7

Interleukin 7 receptor α as a potential therapeutic target in transplantation

Maud Racapé^{1, 3}, Bernard Vanhove^{1, 3}, Jean-Paul Souillou^{1, 2, 3, 4} and Sophie Brouard^{1, 3}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unit 643, Nantes, France

² Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, France

³ Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France

⁴ Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

Received: 2008.11.08, Accepted: 2009.04.30, Published online: 2009.07.08

© L. Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wrocław, Poland 2009

Abstract

Drugs targeting memory lymphocytes may allow for a better control of rejection in transplantation, particularly in immunized patients. In this article the rationale of targeting interleukin 7 receptor α (IL-7R α), a molecule expressed by both memory and naive T cells, is reviewed in the context of transplantation. Whereas naive T cells are partly responsible for acute rejection and are targeted by current immunosuppressive drugs that block costimulatory signals (cyclosporine A, anti-CD3 antibody, anti-CD52 antibody, anti-thymocyte globulin, etc.), memory T cells are resistant to costimulation blockade. As such, memory cells are an obstacle to experimental tolerance induction and may be involved in chronic rejection. There is thus much scientific interest in developing molecules able to target these cells. The role of the IL-7/IL-7R α pathway in transplantation rejection has been suggested by the effect of an anti-IL-7 monoclonal antibody which, when associated with costimulation blockade, prolonged heart allograft survival in mice. Here the hypothesis that targeting IL-7R α would preserve effector T cells that are less dependent on IL-7 for survival while sparing regulatory CD4⁺ CD25^{high} IL-7R α ^{low} T cells is discussed. An anti-IL-7R α antibody could also help achieve allograft tolerance by reducing alloreactive cells.

Key words: interleukin 7 receptor alpha, memory cells, TCR signaling, allograft tolerance.

Corresponding author: Dr. Sophie Brouard, INSERM U643, ITERT, CHU Nantes, 30 bld Jean Monnet 44093 Nantes Cedex 1, France, e-mail: Sophie.Brouard@univ-nantes.fr

INTRODUCTION

Although recently developed immunosuppressive drugs have substantially decreased the incidence of acute rejection, inhibiting memory T-cell expansion in order to control chronic rejection remains a challenge in transplantation. In addition, long-lived memory cells, which enable the generation of more rapid and vigorous responses upon re-exposure to pathogens, are a barrier to allograft tolerance (Brook et al. 2006). In the 1990s, Akbar and coworkers described host memory T cells displaying reactivity against donor kidney alloantigens in patients with acute rejection (Akbar et al. 1990). This was supposed to result from degeneracy of the memory T-cell repertoire (TCR), resulting in heterologous immunity (alloreactivity of the TCR to unrelated antigens as a result of previous immunological exposure) (reviewed in Adams et al. 2003a; Adams et al. 2003b). Moreover, current "induction" drugs, which are respon-

sible for a drastic lymphopenia in graft recipients, may induce a wave of memory-like cells (homeostatic proliferation) with exacerbated functions against donor alloantigens (Moxham et al. 2008). These lymphopenia-induced memory cells are resistant to any costimulation blockade (Yang et al. 2007) and share characteristics of memory T cells that make them hard to control. For example, they have a low activation threshold, resistance to depletion therapies using antibodies (Gallon et al. 2006; Pearl et al. 2005; Sawchuk et al. 1995) and apoptosis (Wu et al. 2004), and display more robust recall responses that require minimal or no costimulation (Cho et al. 2000). Although memory T cells are involved in protecting against re-encountered pathogens or persistent viral infections, developing strategies that target this subpopulation rather than the entire T-cell pool would help conserve at least some immune responses in graft recipients. Such strategies would avoid the development of post-transplant infection (Fishman and

Rubin 1998), malignancies, and lymphoproliferative diseases (Dantal et al. 1998) consecutive to severe lymphopenia. One potentially relevant way of targeting the memory T-cell pool would be to target the interleukin 7 receptor (IL-7R) α chain (or CD127).

In 1988, Namen et al. discovered a 25-kD murine proliferation factor for precursor B cells that they called IL-7 (Namen et al. 1988). IL-7 is produced by stromal tissues, including bone marrow, as well as thymic epithelial and intestinal epithelial cells. IL-7 is also expressed by a murine fibroblast line, a hepatoma cell line, the spleen, and the kidney (Sakata et al. 1990). Studies in mice and humans have shown that IL-7 induces proliferation and has anti-apoptotic effects in thymocytes (Conlon et al. 1989; Napolitano et al. 2003) and also promotes the survival of peripheral memory T cells in mouse models (Kondrack et al. 2003; Schluns et al. 2000).

First studied in mouse, the receptor for IL-7 is a heterodimer made up of an α subunit (IL-7R α or CD127) and the cytokine receptor-common γ chain (γ c). IL-7R α also forms part of the heterodimeric complex of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP), an IL-7-like cytokine composed of IL-7R α and the TSLP receptor (Park et al. 2000). In the mouse, IL-7R α is present on thymocytes, cell lines of the T-cell lineage, cell lines of myelomonocytic origin, and various tissues (bone marrow, lymph node, and spleen) (Park et al. 1990). IL-7R α was also shown to be expressed on human vascular endothelial cells, affecting cell proliferation in a manner independent of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor (Denis et al. 1996; Dus et al. 2003). There are no data about IL-7R α expression on murine endothelial cells, although murine IL-7 activity towards murine endothelial cells has been reported (Denis et al. 1996). B-cell lymphopoiesis in the bone marrow of IL-7 $^{-/-}$ mice was shown to be blocked at the pre-B-cell stage and these mice display reduced numbers of splenic mature B cells (von Freeden-Jeffry et al. 1995). IL-7 $^{-/-}$ and IL-7R α $^{-/-}$ mice display decreased thymic cellularity with impaired T-cell expansion and maturation as well as peripheral lymphopenia, with a more severe phenotype in IL-7R α $^{-/-}$ mice (Moore et al. 1996; Peschon et al. 1994; von Freeden-Jeffry et al. 1995). As reported by Kondrack et al. and Carrio et al., mouse memory cells bear IL-7R α and depend on IL-7 for their survival (Carrio et al. 2007; Kondrack et al. 2003; Moore et al. 1996). However, the involvement of the IL-7/IL-7R α pathway in the functional differentiation of effector T cells into memory T cells is not yet clear (Klonowski et al. 2006), and at least for CD8 $^{+}$ memory T cells the hypothesis is that IL-7R α provides a survival advantage without being involved in the differentiation process itself (Carrio et al. 2007). Some phenotypic differences between IL-7 $^{-/-}$ and IL-7R α $^{-/-}$ mice may be explained by the involvement of IL-7R α in the receptor complex of TSLP, which is also implicated in early thymocyte expansion (Jiang et al. 2007). In fact, mutation of IL-7R α blocks the IL-7 and TSLP pathways, whereas in IL-7 $^{-/-}$ mice the TSLP pathway is

always functional. In humans as in mice, NKT cells are dependent on IL-7R signaling for their proliferation (Boesteanu et al. 1997; de Lalla et al. 2008). IL-7R α was shown to be not required for the development of dendritic cells and monocytes in mouse as IL-7R α knockout bone-marrow donor cells efficiently reconstituted the myeloid compartment of irradiated mice (Takeuchi and Katz 2006). However, TSLP, sharing the IL-7R α with IL-7, was shown to enhance the maturation of human CD11c $^{+}$ blood dendritic cell and T-cell costimulatory capacities, involving IL-7R α in the maturation process of dendritic cells (Reche et al. 2001). Nevertheless, Reche et al. used an *in vitro* system that cannot exclude the involvement of other cytokines in human dendritic cell maturation *in vivo*, such as IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Li et al. 2000). Indeed, monocyte precursor cultured with GM-CSF plus IL-7 or GM-CSF plus IL-4 give rise to dendritic cells in an enhanced manner with IL-7 compared with GM-CSF alone, but in a more pronounced manner with IL-4, strongly suggesting a role for other cytokines and a redundant role of IL-7 in dendritic cell development (Table 1). IL-7-derived dendritic cells are also more potent in stimulating T cells than GM-CSF-derived T cells, and an antibody blocking IL-7 or IL-7R α would go in the sense of a decreased response against allograft by blocking T-cell costimulation by IL-7-dendritic cells.

In humans, severe combined immunodeficiency due to mutations in the IL-7R α gene is associated with lymphopenia with normal numbers of B lymphocytes and NK cells and a decreased number of T lymphocytes that fail to proliferate in response to phytohemagglutinin. These data suggest an IL-7 independence of B-cell and NK-cell development in humans and an impaired function of T cells developing despite lymphopenia (Giliani et al. 2005; Puel et al. 1998). However, this study did not evaluate the functionality of these B cells, so it cannot be excluded that they were not fully functional. Moreover, *in vitro* studies showed that IL-7 enhanced the proliferation of pro-B cells and thus that pro-B cells are responsive to IL-7 (LeBien 2000); therefore involvement of other cytokines in B-cell maturation cannot be excluded, in particular IL-21 (Konforte et al. 2009), explaining the development of B cells in IL-7R α $^{-/-}$ severe combined immunodeficiency patients.

IL-7R α EXPRESSION ON T CELLS AND IL-7-RESPONSIVE CELLS

In the thymus

The study by Park et al. in 1990 showed that murine thymocytes and murine cell lines of the T-cell lineage express the IL-7R (Park et al. 1990). Kim et al. suggested IL-7 to be a trophic and survival factor rather than a growth factor in murine T-cell development, given that the cell division of double-negative thymocytes decreases

Table 1. IL-7R α expression in human and murine tissues and cellular subtypes

Cellular subtype, tissue	IL-7R α expression in human	IL-7R α expression in mouse
Pre B cells	-	+
Pro B cells	+	+
Mature B cells	-	-
TN pro T1	+	+
TN pro T2	+	+
TN pro T3	+	+
TN pro T4	+	+
DP	+	+
NK cells	-	-
NKT cells	+	+
Macrophages	+	+
Dendritic cells	-	-
Endothelial cells	+	+
Stromal cell	+	+
Bone marrow	+	+
Lymph node	+	+

Abbreviations: TN pro T1 – triple negative (CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD44⁺ CD25⁻ cells); TN pro T2 – triple negative (CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD44⁺ CD25⁺ cells); TN pro T3 – triple negative (CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD44⁻ CD25⁺ cells); TN pro T4 – triple negative (CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD44⁻ CD25⁻ cells); DP – double positive (CD4⁺ CD8⁺ cells).

es upon culture with IL-7, with most cells blocked at the G1 stage (Kim et al. 1998). Studies by Peschon et al. and Moore et al. showed that in IL-7R α ^{-/-} and IL-7^{-/-} mice, total thymic cellularity was significantly reduced between, respectively, 0.01% to 10% and to 5% compared with wild-type (WT) mice. In these null mice, lymphopenia with thymic cellularity of less than 1% of that observed in WT mice blocks the development of thymocytes at the double-negative stage in IL-7R α ^{-/-} mice and blocks the development of TCR $\gamma\delta$ T cells in IL-7^{-/-} mice. These results suggest that IL-7/IL-7R α is involved in the transition of thymocytes from the double-negative to the double-positive stage (Moore et al. 1996; Peschon et al. 1994). Moreover, the positive selection of double-positive cells to single-positive cells leads to an up-regulation of the IL-7R α ⁺ common γ_c chain complex and to an IL-7-dependent expansion of positively selected single-positive thymocytes (Hare et al. 2000). However, this trophic role of IL-7 is not clearly defined, given that IL-7R α ^{-/-} mice display double-positive thymocytes despite a marked block in thymocyte differentiation at the double-negative stage. Moreover, IL-7R α ^{-/-} double-positive cells are able to differentiate into single-positive cells, but with decreased proportions of single-positive cells compared with WT mice (Hare et al. 2000). It has also been shown that almost 50% of CD34⁺ murine thymocytes, including double-positive thymocytes, express IL-7R α , although the IL-7-mediated stimulation is blocked in these cells. This suggests a basal

expression of IL-7R α on different thymocyte subtypes, but with different requirements for using IL-7 (Johnson et al. 2008). Thus it may be that the maturation and expansion of thymocytes involve other cytokines, such as TSLP (Al-Shami et al. 2004) and IL-15. These cytokines are growth factors for human thymocytes (Jiang et al. 2007) and preferentially for CD8⁺ thymocytes (Thulesen et al. 2000), likely explaining the more sizeable decrease in the number of CD4⁺ CD8⁻ IL-7R α ^{-/-} cells than in the number of CD4⁻ CD8⁺ IL-7R α ⁺ cells upon *in vitro* culture (Hare et al. 2000).

In the periphery

In humans and mice, IL-7R α is expressed at relatively high levels on naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. IL-7R α expression on naive human CD4⁺ T cells increases following extended IL-7 stimulation (Swainson et al. 2006), and IL-7R α expression on naive human CD4⁺ and naive mouse CD8⁺ T cells is down-regulated after TCR priming, i.e. on effector T cells (Lang et al. 2005; Lozza et al. 2008). Lozza et al. showed that low-, intermediate-, or high-strength stimulation of naive human CD4⁺ T cells could induce IL-7R α ^{high} CD4⁺ T cells, but that these strengths of stimulation respectively determine death, T_{CM} or T_{EM} commitment of the IL-7R α ^{high} CD4⁺ T cells (Lang et al. 2005; Lozza et al. 2008). In contrast, re-expression of IL-7R α by mouse CD8⁺ T cells is dependent on antigen clearance (Carrio et al. 2004; Lang et al. 2005). IL-7R α ^{high} CD8⁺ T cells can potentially survive and develop more efficiently into long-lived memory T cells and can prompt greater recall responses to their specific antigen than their IL-7R α ^{low} CD8⁺ T-cell counterparts (Fig. 1) (Kaeck et al. 2003). In 1990, Grabstein et al. demonstrated that IL-7 is able to stimulate the proliferation of peripheral activated T cells in mice (resting peripheral T cells stimulated with mitogen or antigen) (Grabstein et al. 1990). Furthermore, Schluns et al. showed that IL-7 is required for the homeostatic proliferation of murine CD4⁺ and CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts and for the survival of peripheral CD8⁺ T cells (Schluns et al. 2000). Despite this IL-7 dependence of naive and memory T cells, it was shown in mice that the number of spleen and lymph node CD4⁺ and CD8⁺ T cells decreased only slightly (20–40%) after injection of an anti-IL-7 blocking monoclonal antibody (Sudo et al. 1993). However, contrasting results were obtained in other studies in which the rate of survival was poor in most Th2 effector cells lacking IL-7R α in intact, lymphopenic, and class II knockout hosts (Li et al. 2003). It was also shown that the majority of CD4⁺ memory T cells die in IL-7^{-/-} hosts (Kondrack et al. 2003; Seddon et al. 2003) or in mice treated with an anti-IL-7 blocking antibody (Kondrack et al. 2003).

Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells express low levels of IL-7R α (Hartigan-O'Connor et al. 2007). Recent studies in mice have shown that murine peripheral CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells also express low levels of IL-7R α and that IL-7R α ^{-/-} and IL-

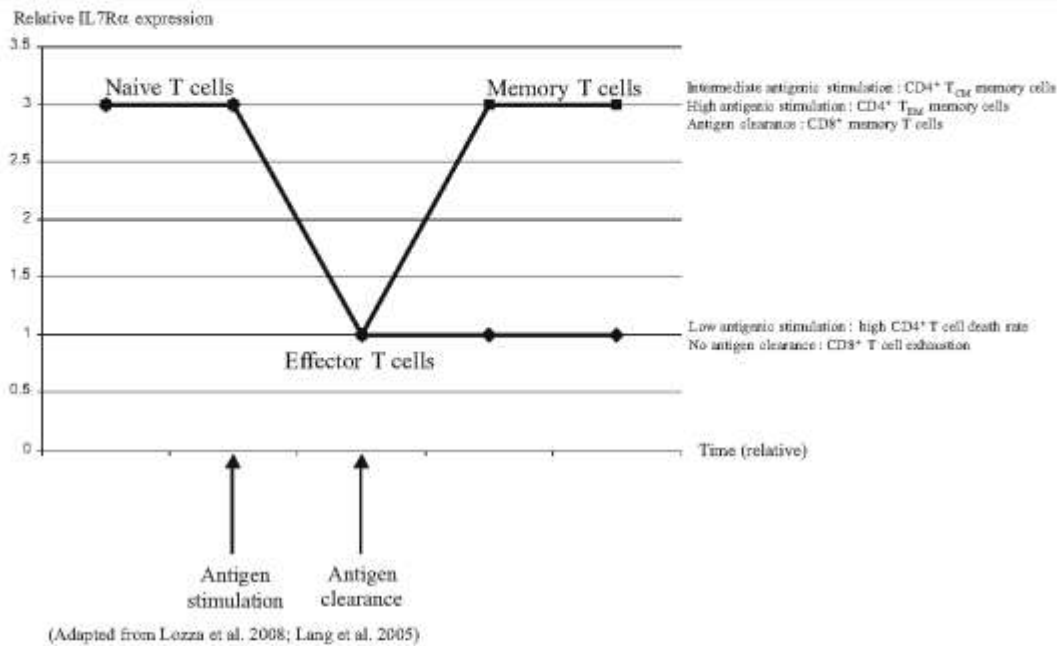


Fig. 1. IL-7R α expression in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subsets following antigen priming.

-7⁺ mice display reduced numbers, but normal proportions, of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells despite severe lymphopenia (Bayer et al. 2008; Peffault de Latour et al. 2006).

IL-7R α MEMORY T CELLS AND HETEROLOGOUS IMMUNITY IN TRANSPLANTATION

Alloimmune responses remain a major problem in solid-organ transplantation, leading to both early and late graft loss. In 1990, Akbar et al. reported a high percentage of CD45RO⁺ memory cells vs. CD45RA⁺ naive cells in the kidneys grafts of transplant patients undergoing rejection. They demonstrated that these cells shifted from a CD45RA⁺ to a transitional double-positive CD45RA⁺ CD45RO⁺ phenotype and then to a CD45RO⁺ proliferating and activated phenotype in the grafts being rejected (Akbar et al. 1990). In these patients the role of memory cells in the rejection process was demonstrated by a correlation between the frequency of kidney graft-infiltrating memory T cells and graft rejection (Akbar et al. 1990). In other studies, the pre-transplant frequency of donor-specific memory T cells producing interferon- γ was shown to correlate with early and late acute rejection episodes (Heeger et al. 1999; Poggio et al. 2007). Moreover, Codarri et al. showed that an alloreactive IL-7R α ^{high} memory population was increased in the peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic humoral rejection compared with stable kidney transplant patients and in stable liver transplant patients compared with healthy indi-

viduals (Codarri et al. 2007). These memory cells, which were present in equal numbers of kidney transplant patients with stable graft function and living donors before transplantation, strikingly increased as early as one month after transplantation in patients exhibiting stable graft function at one year. IL-7R α was also predominant in the graft-infiltrating cells of patients with chronic humoral rejection (Codarri et al. 2007).

As regards acute rejection, it would be of interest to study whether the frequency of memory cell populations before transplantation or one month thereafter is also predictive of chronic allograft rejection, as memory T cells can act through heterologous immunity in both acute and chronic rejection (Adams et al. 2003a; Adams et al. 2003b). Heterologous immunity is defined by the capacity of an antigen-specific memory T cell to react to an unrelated antigen. In this concept, memory T cells that are generated in response to environmental antigens (viral infections) or alloantigens (previous blood transfusions or transplantations, pregnancies, etc.) can cross-react with allogeneic determinants. In fact, T cells specific to a given antigen can cross-react with a new antigen or with an auto- (Zhao et al. 1998) or an allo-antigen (Burrows et al. 1994) due to the degeneracy of the T-cell repertoire. For instance, lymphocytic choriomeningitis virus, pichinde virus, and murine cytomegalovirus infections in mice produce a memory cell population that protects the mouse against vaccinia virus infections (Welsh et al. 2004). Heterologous immunity has been shown to be a potent barrier to transplantation tolerance and consequently a potential cause of graft loss (Adams et al. 2003a; Bingaman and Farber 2004). Other studies have shown a strong corre-

lation between Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation and acute rejection episodes, likely due to cross-reactivity of virus-specific memory T cells with alloantigens (Jabs et al. 2004; Reinke et al. 1994). Finally, a correlation has been described between the reappearance of virus, virus-specific memory cells, and transplant rejection. In fact, murine γ -herpesvirus-specific effector-memory cell populations generated after infection were shown to exhibit cross-reactivity with alloantigen and to interfere with tolerance induction of allogeneic skin graft. Moreover, this cross-reactivity of memory T cells was shown *in vitro* in humans with EBV-specific memory T cells that could recognize and be reactivated by the given alloantigen (Burrows et al. 1994; Stapler et al. 2008). Memory cells can cross-react with alloantigens, and their frequency prior to transplantation has been shown to correlate with the appearance and severity of early and late acute rejection episodes (reviewed in Koehn et al. 2006) (Heeger et al. 1999; Najafian et al. 2002; Nickel et al. 2004).

TARGETING IL-7R α MEMORY CELLS AS A THERAPEUTIC TREATMENT TO PROLONG ALLOGRAFT SURVIVAL

Given the involvement of memory T cells in rejection, targeting memory T cells via IL-7R α or IL-7 in graft recipients may be considered. This would provide a complement and/or alternative to immunosuppressive protocols that induce lymphopenia leading to memory-like T cell-induced accelerated graft rejection. The latter phenomenon was shown in a study in which homeostatic proliferation subsequent to nonspecific depletion treatments was shown to be a potent barrier to tolerance induction because it induced the differentiation of naive T cells into long-lived memory-like cells and thus increased memory functions (Hickman and Turka 2005; Moxham et al. 2008). In addition, Moxham et al. used RAG $^{-/-}$ mice as recipients and the genetically induced lymphopenia was exacerbated compared with mice in which an anti-IL-7 antibody was used. Moreover, protocols using costimulation blockade alone are efficient in delaying acute rejection, but have no effect on memory T cells (Zhai et al. 2002), as the latter are also resistant to regulation by regulatory T cells (Yang et al. 2007). An anti-IL-7R α antibody would achieve a more efficient depletion of long-lived memory T cells, conserving at least the effector immune responses of the host against viral infections, pathogens, and the like, but inhibiting responses to graft alloantigens. In fact, effector cells are less concerned by survival via IL-7 because priming of naive T cells promotes the down-regulation of IL-7R α and because homeostatic proliferation partly depends on IL-7 (Schluns et al. 2000).

Zhai et al. showed that sensitization by an allogeneic skin graft and treatment with CD154 monoclonal antibody was ineffective in blocking rejection of a sub-

sequent cardiac allograft by primed/memory alloreactive CD8 $^{+}$ T cells in mice. However, the addition of an anti-CD8 monoclonal antibody to deplete memory CD8 $^{+}$ T cells efficiently prolonged allograft survival (Zhai et al. 2002). In a model of kidney transplantation in cynomolgus monkeys, the animals underwent a conventional immunosuppressive regimen (tacrolimus, mycophenolate mofetil, prednisone) and a conditioning regimen (total body irradiation, equine ATG, anti-CD154 monoclonal antibody) after transplantation to prepare for donor bone-marrow transplantation. Then a humanized anti-CD8 monoclonal antibody was administered for one month after donor bone-marrow transplantation. The depletion of the CD8 $^{+}$ T-cell pool, including memory T cells, enabled mixed chimerism to be established and delayed allograft rejection (Koyama et al. 2007). One study also used this concept in a mouse model to determine if FTY720, known to sequester naive and newly activated T cells, also sequestered memory CD4 $^{+}$ T lymphocytes, preventing their encounter with alloantigens in the periphery and preventing graft infiltration (Zhang et al. 2006). This treatment, associated with a donor-specific transfusion and an anti-CD154 antibody to block the costimulation of naive T cells, also led to prolonged allograft survival (Zhang et al. 2006). However, the authors also noted a late antibody-mediated rejection, which was explained by the fact that, unlike central memory CD4 $^{+}$ T cells, effector memory CD4 $^{+}$ T cells express low levels of homing receptors, thereby minimizing the effect of FTY720 sequestration and allowing T-cell help for antibody-mediated rejection (Zhang et al. 2006). Another study showed that anti-IL-7 antibody together with costimulation blockade suppressed the generation of allospecific functional CD8 $^{+}$ memory T cells, inhibited naive CD8 $^{+}$ T-cell proliferation, and prolonged allograft survival (Wang et al. 2006). In short, these studies showed a striking implication of CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ memory T cells in graft loss and demonstrated that targeting CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ memory T cells may be an efficient way to prolong allograft survival, notably via the targeting of IL-7/IL-7R α (Wang et al. 2006).

An advantage of targeting IL-7 or IL-7R α would be to spare regulatory T cells, which are mostly CD4 $^{+}$ CD25 $^{\text{high}}$ IL-7R α^{low} T cells (Hartigan-O'Connor et al. 2007). Wang et al. used a neutralizing anti-IL-7 monoclonal antibody in a mouse cardiac transplant model and concluded that regulatory T cells were not involved in delayed allograft rejection, as they found the same frequency of regulatory T cells in the treated mice as in naive mice (Wang et al. 2006). However, it cannot be excluded that these cells play an important role in regulating the residual cells persisting after anti-IL-7 monoclonal antibody treatment (Shen et al. 2005). In contrast, Moxham et al. showed an accelerated rejection of kidney allografts in their lymphopenic mouse RAG $^{-/-}$ model due to more responsive memory T cells created through homeostatic proliferation and despite the high frequency of regulatory T cells (Moxham et al. 2008).

Nevertheless, this study did not demonstrate whether or not regulatory T cells are functional and can potentially suppress the activity of memory-like T cells created in the RAG⁻ host. In fact, lymphopenia may have led to the creation of a high-avidity TCR memory cell population that is uncontrolled by regulatory T cells, contrary to a low-avidity TCR memory cell population (Shen et al. 2005). Moreover, it is unknown if the regulatory T cells created are specific for effector cells directed against graft alloantigen (Yang et al. 2007). It is also important to take into account the fact that naive CD8⁺ T cells primed without costimulatory signals down-regulate IL-7R α and re-express it after antigen clearance, even though they have become long-lived tolerized T cells (Hammerbeck and Mescher 2008). This could be of importance in protocols targeting IL-7R α , as such potentially regulatory cells would also be deleted (Hammerbeck and Mescher 2008). However, a regulation of IL-7R α expression by Foxp3 and an inverse correlation between Foxp3 and IL-7R α expression were shown on different subsets of CD4⁺ regulatory T cells, which may potentially be applicable to CD8⁺ regulatory T cells (Liu et al. 2003; Liu et al. 2006). This suggests that anergized CD8⁺ T cells in the study of Hammerbeck et al. are not functional regulatory T cells in that they express IL-7R α .

PERSPECTIVES

It is possible to consider different types of therapeutic treatments involving an IL-7/IL-7R α signaling pathway, i.e. targeting IL-7 or targeting IL-7R α , which would block IL-7 availability by these cells in each case. However, the approach is not the same, as targeting IL-7 allows the use of IL-7R α for other cytokines, such as TSLP (Jiang et al. 2007), and in each case it allows the survival of cells with other cytokine receptors, such as IL-15R (Berard et al. 2003). Moreover, these approaches are different as the lymphopenia induced by IL-7 targeting is less severe than that induced by IL-7R α targeting. This would thus conserve a part of the immune response against viral infections and possibly against alloantigens. Thus further work needs to be done to identify the advantages and drawbacks of each strategy.

Another question that arises from a potential IL-7/IL-7R α pathway blockade is the use of a blocking or a neutralizing/cytotoxic antibody against IL-7 or IL-7R α . Indeed, a blocking antibody against IL-7 or IL-7R α , or even a neutralizing anti-IL-7 antibody (as in the study of Wang et al. 2006), would only permit an exhaustion of the pool of IL-7R α ⁺ cells, but would not avoid the stimulation of residual cells and thus a potential response against the allograft. A cytotoxic anti-IL-7R α antibody would permit the whole depletion of the pool of IL-7R α ⁺ cells, although generating a lymphopenia that may not have more benefits than classical immunosuppressive drugs, except for the avoidance of cytotoxicity and regulatory T-cell conservation.

Finally, blocking the IL-7/IL-7R α pathway would potentially diminish the generation of alloreactive memory cells, as obtained in the work of Wang et al. (Wang et al. 2006), but in a manner dependent on a costimulation blockade. This is an interesting finding, as IL-7R α is not only expressed on memory cells, but also on naive cells. Thus in the study of Wang et al., lack of IL-7 should lead not only to a decrease in memory T cell population, but also to a decrease of the naive T-cell population, given the dependence of these cells to IL-7. However, IL-7 blockade alone is inefficient in prolonging allograft survival. These data suggests either that even in the absence of IL-7, naive T cells can be costimulated to develop an effector response or that naive T cells may be less dependent on IL-7 than memory T cells. It would be interesting to study in which manner these two cell subtypes are different in their dependence on IL-7 and if an IL-7R α ⁺ cell blockade/depletion would give similar results on cell behavior and allograft survival than an IL-7 blockade. Further *in vivo* studies are needed to follow IL-7R α ⁺ cell contraction and confirm memory T-cell depletion after treatment with a neutralizing IL-7 or a cytotoxic IL-7R α antibody. Most studies deal with mouse knockouts of IL-7 or IL-7R α , which are extreme phenotypes that do not necessarily reflect the behavior of cells treated with anti-IL-7/IL-7R α antibodies, as there can be persistent low levels of IL-7 or IL-7R α ⁺ cells despite the treatment. Thus it is also important to study the profile of persistent cells in terms of activation, proliferation, and cytokine production and function. Notably, the use of a cytotoxic anti-IL-7R α antibody may be an interesting way to bypass naive T-cell costimulation during the alloimmune response. Indeed, it would not only deplete memory T cells but also the pool of naive T cells, preventing their priming by alloantigens, their differentiation in effector T cells and finally their development in memory T cells. Such a new reagent may be a useful therapeutic agent in situations in which memory cells must be kept under control.

Acknowledgment: This work was supported in part by grants from the Centaure Foundation (Transplantation Research Network) and the Progreffe Foundation.

REFERENCES

- Adams AB, Pearson TC, Larsen CP (2003a) Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol Rev* 196:147–160
- Adams AB, Williams MA, Jones TR et al (2003b) Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* 111:1887–1895
- Akbar AN, Amlot PL, Timms A et al (1990) The development of primed/memory CD8⁺ lymphocytes *in vitro* and in rejecting kidneys after transplantation. *Clin Exp Immunol* 81:225–231
- Al-Shami A, Spolski R, Kelly J et al (2004) A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development. *J Exp Med* 200:159–168.

- Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A et al (2008) A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 181:225–234.
- Berard M, Brandt K, Bullone-Paus S et al (2003) IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol* 170:5018–5026
- Bingaman AW, Farber DL (2004) Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am J Transplant* 4:846–852
- Boesteanu A, Silva AD, Nakajima H et al (1997) Distinct roles for signals relayed through the common cytokine receptor gamma chain and interleukin 7 receptor alpha chain in natural T cell development. *J Exp Med* 186:331–336
- Brook MO, Wood KJ, Jones ND (2006) The impact of memory T cells on rejection and the induction of tolerance. *Transplantation* 82:1–9
- Burrows SR, Khanna R, Burrows JM et al (1994) An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 179:1155–1161
- Carrio R, Bathe OF, Malek TR (2004) Initial antigen encounter programs CD8+ T cells competent to develop into memory cells that are activated in an antigen-free, IL-7- and IL-15-rich environment. *J Immunol* 172:7315–7323
- Carrio R, Rolle CE, Malek TR (2007) Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. *Eur J Immunol* 37:3078–3088
- Cho BK, Rao VP, Ge Q et al (2000) Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med* 192:549–556
- Codarri L, Vallotton L, Cluffreda D et al (2007) Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4+CD25+CD45RO+IL-7Ralphahigh cell population in solid organ transplant recipients. *J Exp Med* 204:1533–1541
- Conlon PJ, Morrissey PJ, Nordan RP et al (1989) Murine thymocytes proliferate in direct response to interleukin-7. *Blood* 74:1368–1373
- Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D et al (1998) Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 351:623–628
- de Lalla C, Festuccia N, Albrecht I et al (2008) Innate-like effector differentiation of human invariant NKT cells driven by IL-7. *J Immunol* 180:4415–4424
- Denis V, Dupuis P, Bizouarne N et al (1996) Selective induction of peripheral and mucosal endothelial cell addressins with peripheral lymph nodes and Peyer's patch cell-conditioned media. *J Leukoc Biol* 60:744–752
- Dus D, Krawczyński A, Zalecki P et al (2003) IL-7 receptor is present on human microvascular endothelial cells. *Immunol Lett* 86:163–168
- Fishman JA, Rubin RH (1998) Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 338:1741–1751
- Gallon L, Gagliardini E, Benigni A et al (2006) Immunophenotypic analysis of cellular infiltrate of renal allograft biopsies in patients with acute rejection after induction with alemtuzumab (Campath-1H). *Clin J Am Soc Nephrol* 1:539–545
- Giliani S, Mori L, de Saint Basile G et al (2005) Interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunol Rev* 203:110–126
- Grabstein KH, Namen AE, Shanebeck K et al (1990) Regulation of T cell proliferation by IL-7. *J Immunol* 144:3015–3020
- Hammerbeck CD, Mescher MF (2008) Antigen controls IL-7R alpha expression levels on CD8 T cells during full activation or tolerance induction. *J Immunol* 180:2107–2116
- Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G (2000) An essential role for the IL-7 receptor during intrathymic expansion of the positively selected neonatal T cell repertoire. *J Immunol* 165:2410–2414
- Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E et al (2007) Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 319:41–52
- Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S et al (1999) Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 163:2267–2275
- Hickman SP, Turka LA (2005) Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1713–1721
- Jabs WJ, Maurmann S, Wagner HJ et al (2004) Time course and frequency of Epstein-Barr virus reactivation after kidney transplantation: linkage to renal allograft rejection. *J Infect Dis* 190:1600–1604
- Jiang Q, Coffield VM, Kondo M et al (2007) TSLP is involved in expansion of early thymocyte progenitors. *BMC Immunol* 8:11
- Johnson SE, Shah N, Bajer AA et al (2008) IL-7 activates the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in normal human thymocytes but not normal human B cell precursors. *J Immunol* 180:8109–8117
- Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ et al (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4:1191–1198
- Kim K, Lee CK, Sayers TJ et al (1998) The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol* 160:5735–5741
- Klonowski KD, Williams KJ, Marzo AL et al (2006) Cutting edge: IL-7-independent regulation of IL-7 receptor alpha expression and memory CD8 T cell development. *J Immunol* 177:4247–4251
- Koehn B, Gangappa S, Miller JD et al (2006) Patients, pathogens, and protective immunity: the relevance of virus-induced alloreactivity in transplantation. *J Immunol* 176:2691–2696

- Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT et al (2003) Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 198:1797–1806
- Konforte D, Simard N, Paige CJ (2009) IL-21: an executor of B cell fate. *J Immunol* 182:1781–1787
- Koyama I, Nadazdin O, Boskovic S et al (2007) Depletion of CD8 memory T cells for induction of tolerance of a previously transplanted kidney allograft. *Am J Transplant* 7:1055–1061
- Lang KS, Recher M, Navarini AA et al (2005) Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol* 35:738–745
- LeBien TW (2000) Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96:9–23
- Li J, Huston G, Swain SL (2003) IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* 198:1807–1815
- Li L, Masucci MG, Levitsky V (2000) Effect of interleukin-7 on the in vitro development and maturation of monocyte derived human dendritic cells. *Scand J Immunol* 51:361–371
- Liu H, Hu B, Xu D et al (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol* 171:5012–5017
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z et al (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701–1711
- Lozza L, Rivino L, Guarda G et al (2008) The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4+IL-7Rhi T cells. *Eur J Immunol* 38:30–39
- Moore TA, von Freeden-Jeffrey U, Murray R et al (1996) Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7 $^{-/-}$ mice. *J Immunol* 157:2366–2373
- Moxham VF, Karegli J, Phillips RE et al (2008) Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. *J Immunol* 180:3910–3918
- Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV et al (2002) Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 13:252–259
- Namen AE, Lupton S, Hjerrild K et al (1988) Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333:571–573
- Napolitano LA, Stoddart CA, Hanley MB et al (2003) Effects of IL-7 on early human thymocyte progenitor cells in vitro and in SCID-hu Thy/Liv mice. *J Immunol* 171:645–654
- Nickel P, Presber F, Bold G et al (2004) Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation* 78:1640–1646
- Park LS, Friend DJ, Schmierer AE et al (1990) Murine interleukin 7 (IL-7) receptor. Characterization on an IL-7-dependent cell line. *J Exp Med* 171:1073–1089
- Park LS, Martin U, Garika K et al (2000) Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med* 192:659–670
- Pearl JP, Parris J, Hale DA (2005) Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant* 5:465–474
- Peffault de Latour R, Dujardin HC, Mishellany F et al (2006) Ontogeny, function, and peripheral homeostasis of regulatory T cells in the absence of interleukin-7. *Blood* 108:2300–2306
- Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH et al (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180:1955–1960
- Poggio ED, Augustine JJ, Clemente M et al (2007) Pretransplant cellular alloimmunity as assessed by a panel of reactive T cells assay correlates with acute renal graft rejection. *Transplantation* 83:847–852
- Puel A, Ziegler SF, Buckley RH et al (1998) Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet* 20:394–397
- Reche PA, Soumelis V, Gorman DM et al (2001) Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 167:336–343
- Reinke P, Fietze E, Ode-Hakim S et al (1994) Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet* 344:1737–1738
- Sakata T, Iwagami S, Tsuruta Y et al (1990) Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol* 48:205–212
- Sawchuk SS, Gates R, Hirsch R (1995) Contrasting in vivo effects on T helper cell functions induced by mitogenic (intact) versus nonmitogenic (F(ab')₂) anti-CD3 monoclonal antibody. *Transplantation* 60:1331–1337
- Schluns KS, Klepper WC, Jameson SC et al (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426–432
- Seddon B, Tomlinson P, Zamojska R (2003) Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 4:680–686
- Shen S, Ding Y, Tadokoro CE et al (2005) Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *J Clin Invest* 115:3517–3526
- Stapler D, Lee ED, Selvaraj SA et al (2008) Expansion of effector memory TCR Vbeta4+ CD8+ T cells is associated with latent infection-mediated resistance to transplantation tolerance. *J Immunol* 180:3190–3200
- Sudo T, Nishikawa S, Ohno N et al (1993) Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9125–9129
- Swainson L, Verhoeven E, Cosset FL et al (2006) IL-7R alpha gene expression is inversely correlated with cell cycle progression in IL-7-stimulated T lymphocytes. *J Immunol* 176:6702–6708
- Takeuchi S, Katz SI (2006) Use of interleukin 7 receptor-alpha

- knockout donor cells demonstrates the lymphoid independence of dendritic cells. *Blood* 107:184–186
- Thulesen S, Nielsen M, Petersen TR et al (2000) Interleukin 15 is a growth factor for human thymocytes with preferential effect on CD8(+) cells. *Cytokine* 12:751–755
- von Freeden-Jeffrey U, Vieira P, Lucian LA et al (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519–1526
- Wang Y, Dai H, Liu Z et al (2006) Neutralizing IL-7 promotes long-term allograft survival induced by CD40/CD40L costimulatory blockade. *Am J Transplant* 6:2851–2860
- Welsh RM, Selin LK, Szomolanyi-Tsuda E (2004) Immunological memory to viral infections. *Annu Rev Immunol* 22:711–743
- Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J et al (2004) Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med* 10:87–92
- Yang J, Brook MO, Carvalho-Gaspar M et al (2007) Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19954–19959
- Zhai Y, Meng L, Gao F et al (2002) Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients. *J Immunol* 169:4667–4673
- Zhang Q, Chen Y, Fairchild RL et al (2006) Lymphoid sequestration of alloreactive memory CD4 T cells promotes cardiac allograft survival. *J Immunol* 176:770–777
- Zhao ZS, Granucci F, Yeh L et al (1998) Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* 279:1344–1347

Annexe 2

WHAT CAN WE LEARN FROM THE TRANSCRIPTIONAL CHARACTERIZATION OF SPONTANEOUSLY
TOLERANT TRANSPLANT RECIPIENTS?

Par: Richard Danger, Maud Racapé, Jean-Paul Soulillou and Sophie Brouard

In Press dans *Current Opinion in Organ Transplantation*, 2010

What can we learn from the transcriptional characterization of spontaneously tolerant transplant recipients?

Richard Danger^{a,b,*}, Maud Racapé^{a,b,*}, Jean-Paul Souillou^{b,c} and Sophie Brouard^a

^aINSERM U643, ^bUniversité de Nantes, Faculté de Médecine and ^cCHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, France

Correspondence to Dr Sophie Brouard, INSERM U643-ITERT, 30, Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France
Tel: +33 2 40 08 78 42; fax: +33 2 40 08 74 11; e-mail: Sophie.Brouard@univ-nantes.fr

* R.D. and M.R. contributed equally to this work.

Current Opinion in Organ Transplantation 2010, 15:435–440

Purpose of review

Even if improvements of immunosuppressive treatments enabled to prevent acute rejection in solid organ transplantation, current immunosuppressive regimens are implicated in long-term side effects without the resolution of chronic rejection. Thus, during last years, research focused mainly on immunosuppression weaning off studies based on individualized follow-up of patients. Beyond animal models, studies have been emphasized by descriptions of a particular group of transplant patients displaying an operational tolerance in the absence of immunosuppressive treatments. Herein we will review recent advances in transcriptional characterization of spontaneously tolerant transplant recipients.

Recent findings

Transcriptomic profiling in the blood of these so-called 'operationally tolerant' patients succeeded to establish tolerance footprint that could be used to detect a tolerance profile among transplanted patients under immunosuppression, in order to adapt their treatment and eventually wean off them.

Summary

The advent of this field raise questions about how to blend and cross transcriptomic studies in the different areas of transplantation, how to use such set of genes to have a clear view of the graft status at a given time and what will be their contributions.

Keywords

immunosuppression weaning off, solid organ transplantation, tolerance, transcriptomic profiling

Curr Opin Organ Transplant 15:435–440
© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
1087-2418

Introduction

The first experiment establishing 'actively acquired tolerance' in contrast with 'actively acquired immunity' to a foreign antigen was made in 1953 by Billingham *et al.* [1], who showed that exposure of mice to foreign antigens at a fetal stage induced tolerance to a skin graft expressing the same antigens at the adult stage. From these experiments it was deduced that immune system formation and lymphocyte 'education' to the self was taking place early in embryonic development, and later that lymphocytes undergoing positive and negative selections in the thymus were able to tolerate self-antigens and reject nonself ones [2,3]. These results led to various strategies to induce central tolerance to foreign antigens, such as intrathymic injection of alloantigens [4–6] and mixed chimerism [7,8]. The mechanisms of peripheral tolerance, leading to anergy, deletion or suppression of self-reactive T cells in periphery [9], were also broadly exploited via costimulation blockade. Either CTLA4

Ig [10,11] or anti-CD40/CD40L [12,13] were used to induce peripheral tolerance in various rodent models and long-term survival of bone marrow transplantation in human [14].

Through these different studies in animal models, the definition of 'true' tolerance has been proposed as a well functioning graft lacking histological lesions of rejection, in the absence of immunosuppression, in an immunocompetent host accepting a second graft of the same donor, while able to reject a third-party graft. Because several of these key elements cannot be demonstrated in humans, this state has been referred to as 'operational tolerance'. For example, in renal transplantation graft biopsies are often unavailable, particularly given that this state of clinical operational tolerance has been observed by chance and not in the context of planned tolerance-inducing protocols. Furthermore, spontaneously operationally tolerant patients are usually incompliant and refuse invasive investigative procedures [15]. However, some

weaning off protocols with up to 5-year follow-up biopsies are now achieved in liver transplantation. Indeed, intentional immunosuppression withdrawal trials have been conducted in liver because liver is able to regain a normal graft function after a failed attempt of weaning off, which is not the case for kidney where acute rejection episodes, much prevalent in withdrawal trials [16] have been demonstrated to be negative predictor of renal transplantation outcomes [17]. These patients are thus defined as patients with stable graft function without any immunosuppressive treatment, retaining the capacity to respond to other immune challenges [18]. Such patients are rare in solid organ transplantation, with cases described in liver [19[•]] and renal transplant patients [15]. As accidental cases of operational tolerance in liver transplantation and renal transplantation were often due to patients noncompliance to immunosuppression, weaning strategies are recently developing on an intention-to-treat in patients who received a liver transplantation for treatment of nonimmune-mediated liver diseases [19[•]]. In the field of renal transplantation, the transplant community achieved to establish transplant tolerance in a few studies. Kawai *et al.* [20] showed that a nonmyeloablative regimen prior to renal transplantation and donor bone marrow infusion lead to stable renal function after withdrawing of immunosuppression in four out of five patients and T cell unresponsiveness to donor alloantigens [20]. The only case of tolerance induction obtained in lung transplantation on a child was probably owing to previous bone marrow transplantation from the same donor, allowing chimerism and graft acceptance [21].

The need for transcriptional characterization of operationally tolerant patients

Currently, recipients' follow-up includes blood and urine tests on creatinine and protein levels for renal transplantation and liver chemistries (enzymes \pm serum bilirubin) for liver transplantation to identify graft dysfunction and biopsy to establish the diagnosis. This monitoring allows modulation of the treatment but can hardly prevent a chronic dysfunction of the transplant. Indeed, such parameters attest of an established and often irreversible alteration and earlier parameters are needed. Minimizing immunosuppression is currently employed in liver transplantation with effective tolerance to the liver in approximately 20% of cases [19[•]]. In liver transplantation the onset of an acute rejection episode does not seem to increase the risk of graft loss after immunosuppression reintroduction, which is not the case in renal transplantation, complicating weaning procedures. The search for gene modulations before graft injury could be a useful tool that may help to enroll patients in immunosuppression weaning procedures. Transcriptional characterization of tolerant recipients and using of reliable biomarkers would allow discriminating a tolerance profile

without the need of invasive allograft biopsy. The goal of such biomarkers would also be to anticipate a rejection or the responsiveness to antirejection therapies or to predict a long-term graft survival among recipients receiving maintenance immunosuppression, thus facilitating individualization of immunosuppressive therapy (weaning or reintroduction) as reviewed in [22]. The aim of European and American consortiums (RISET, Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance, ITN, Immune Tolerance Network) is to discover new biomarkers to identify transplanted patients who might be candidates for immunosuppression withdrawal, with the support of transcriptomic profiling studies.

Ever since the first cases of operational tolerance in the clinic were described [15], the problem of adequate comparators has remained unsolved but fundamental. This paradox is owing to the clinical situation of these patients that display stable graft function but no longer receive immunosuppression, a state that, until now, was only achievable in rodents. Healthy volunteers share with tolerant patients the absence of immunosuppression but have not received a transplant. Patients with chronic rejection have a transplant but are under immunosuppression and likely display a contrasted inflammatory response. Stable patients who share graft function stability with tolerant patients are probably the best control but are under immunosuppression. Regarding liver transplantation, the use of samples from the same patients before and after weaning off protocol is also interesting and may reveal on the effect of immunosuppression withdrawal on these biomarkers. In addition, the use of patients who failed attempting at weaning off is also a good comparator given that there is a formal demonstration of the absence of tolerance although there is a presence of immunosuppression treatment [23]. Finally, because no kidney biopsy is usually available for spontaneously operationally tolerant patients, it is not possible to exclude a 'minimal' form of subclinical chronic rejection in the graft of these patients. Thus, such a comparison would avoid detection of confusing potential biomarkers of subclinical chronic rejection lesions.

A question raise from the various studies led in the field of transcriptomic profiling about the more appropriate compartment to analyze. The gold standard for assessing the graft status is the histological examination of the biopsy. A few biopsy analysis reports were performed in tolerant patients but no gene analysis was performed [24–26]. Indeed, biopsy harvesting is an invasive procedure, susceptible to sampling errors and that cannot be easily repeated [27]. Furthermore, spontaneous tolerant patients are often noncompliant and only agree minimal invasive procedures for transplant monitoring. Thus, developing graft monitoring thanks to reliable noninvasive biomarkers would allow an easier follow-up care for

patients and a more timely and effective therapeutic intervention. Several RNA sources are possible. In renal transplantation, urine seems to be an appropriate compartment to study, being directly in contact with the grafted kidney and a noninvasive compartment to collect. No data are available in literature about pangenomic profiling of urinary cells, but a few studies were interested in the transcriptomic profile of perforin and granzyme B in urinary cells by quantitative and reverse transcription-PCR, being able to diagnose acute rejection of renal allografts [28,29]. Other mRNA sources, like bronchoalveolar lavage fluids for lung recipients [30] are imaginable if tolerance induction would be affordable in other organs than liver or kidney. Actually, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the blood are the most commonly studied compartment for gene expression profiling in tolerance [31–34,35**] and Horwitz *et al.* [34] demonstrated that gene expression in PBMC correlates with histological diagnosis of acute cellular rejection in endomyocardial biopsies. However PBMC does not always reflect graft mechanisms as reported by Ashton-Chess *et al.* Indeed, granzyme B mRNA was increased in biopsies from chronic antibody mediated rejection patients whereas it was reduced in PBMC compared with stable patients [36]. This does not exclude the use of blood biomarkers as diagnostic or prognostic tools but could limit the mechanistic interpretation of the results. Recently, the measure of microRNAs in serum or plasma has been proposed as a useful approach for blood-based biomarker identification for patients with renal acute rejection [37*] with the advantage that plasma or serum request less laboratory manipulations than PBMC isolation. Nevertheless, their implication in tolerance has never been studied.

The contribution of transcriptomic profiling studies

Gene expression profiling appears a promising way for identification of biological pathways implicated in long-term graft survival. For that, DNA microarray technology appears a useful tool allowing the screening of the entire genome in one experiment. The over-fitting bias, corresponding to the thousands of genes measured with only a few samples is the general limit of such tools. Numerous improvements are regularly proposed to correct microarrays bias. Such bioinformatic considerations will not be developed herein but one has to keep in mind that main drawbacks of microarray analysis are false positive gene identification and a possibly high variation in the number of identified differential genes depending on microarray platform, data processing and statistical analysis used. Microarray results need to be confirmed with other technologies such as quantitative PCR or with protein tools and independent samples. Blood profile from operationally tolerant recipients has been analyzed using micro-

arrays in renal transplantation [31,35**,38,39] and liver transplantation [32,40]. Using Stanford's lymphochips containing 11 820 immune related genes, Brouard *et al.* [31] identified a gene signature of 49 genes which segregated patients with drug-free long-term graft function and patients with chronic rejection lesions with high specificity. Moreover, microarray pathway analysis demonstrated that transforming growth factor β (TGF- β) regulated more than a quarter of the genes distinguishing operationally tolerant patients from those with chronic rejection. Furthermore, using a nonstatistical analysis based on the identification of leader genes, they confirmed the gene network triggered by the TGF- β gene and its potential central role in operational tolerance at a peripheral level. They also identified some molecules as key leader genes in transplant tolerance and particularly they point on a B-cell signature and molecules such as BANK1 preventing hyperactive B-cell responses [38,39]. Based on these data, Pallier *et al.* recently demonstrated that enriched B cells from tolerant patients exhibited a particular B-cell gene profile, with a decreased Fc γ RIIA/Fc γ RIIB ratio transducing an inhibitory signal and an increase in BANK1, which could be associated to an inhibitory profile. Furthermore, using custom oligonucleotide microarrays, Li *et al.* [41] reported that 21 of the 49 genes confirmed the potential diagnosis use of this pattern in PBMC from renal recipients with tolerance induction protocol and three genes predicted long-term graft function with 100% sensitivity and 80% specificity in an independent data-set containing seven tolerant patients. Thus, this pattern may diagnose the status of drug-free stable graft function in transplanted recipients. Using custom microarrays with 4607 genes focused on transplantation, Sagoo *et al.* [35**] performed gene profiling on two independent cohorts of renal recipients, including a training set of 11 operationally tolerant patients from the European Indices of Tolerant network and a test set of 24 operationally tolerant patients from the American Immune Tolerance Network.

From these two groups, they identified respectively 255 and 1352 differential genes which exhibit an intersection of only 174 genes which can be explained by differences of the two groups of operationally tolerant patients, notably a high human leukocyte antigen (HLA) mismatch (med = 4) for the training set and no HLA mismatch for the test set. Whatever, the authors highlighted an enrichment of B-cell-related genes, and selecting the 10 top ranked genes they created a cross-platform biomarker signature discriminating tolerant patients from others with good specificity and sensibility.

In 2007, Martinez-Llordella *et al.* [32] analyzed the peripheral blood gene expression profile of 16 liver recipients with drug-free long-term graft function, 16 recipients requiring continuous immunosuppression and 10 healthy

438 Tolerance induction

individuals [32]. They identified a pattern of genes, which discriminated tolerant and nontolerant patients with high accuracy. This signature included genes encoding for $\gamma\delta$ T cell and NK (natural killer) receptors and proteins involved in cell proliferation arrest. Again, a number of these tolerance-specific genes appeared to be regulated or implicated in TGF- β signaling pathways. Same group further extended their studies by designing a clinically applicable molecular test able to accurately identify liver stable recipients who could be weaned off immunosuppression [40]. Using Affymetrix microarrays the authors succeeded in identifying three gene signatures composed of two, six and seven genes, which discriminated tolerant from nontolerant patients both in training and independent groups. Furthermore, gene expression analysis of the entire dataset revealed enrichment for tolerant patients in genes encoding for a variety of cell-surface receptors expressed by NK, CD8⁺, and $\gamma\delta$ TCR⁺ T but not other blood cells such as B cells or regulatory T lymphocytes. Finally, the expression profile of 33 genes described in this study was used to predict the outcome of immunosuppression withdrawal in stable liver recipients were 56 recipients rejected their graft and 40 successfully discontinued immunosuppression [42]. This gene signature associated with clinical data predicted outcome in 79% of tolerant and rejecting recipients, indicating that such a gene-signature could be employed in combination with clinical data to accurately predict the outcome of elective immunosuppression withdrawal in liver transplantation.

These gene-profiling studies performed in total PBMC permit the identification of gene signatures associated with tolerance. Some of these identified cell-specific gene enrichments highlight some cell populations, notably CD8⁺, and $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells in liver tolerance [32] and B populations in kidney tolerance [35^{**},43^{**}]. These findings open new study ways to improve our knowledge in cell subtype involvement in long-term graft function. Furthermore, in order to identify other cell-specific genes future total PBMC profiling studies could also use cell type-specific significance analysis of microarrays (csSAM) method, which would identify differential genes in a microarray dataset for each cell type based on cell count from whole blood [44]. On the contrary, gene analysis in particular sorted blood cell populations could be a promising approach.

Altogether, these transcriptomic studies demonstrated that operationally tolerant recipients without immunosuppression exhibit differential peripheral gene profiles compared with patients with chronic rejection or stable recipients. This key point encourages studies allowing identification of blood biomarkers in order to detect stable patients which could be weaned off immunosuppression or require immunosuppression maintenance. How-

ever, cohorts used to identify such signatures are still small and there is a need of validation on larger cohort of patients before any further clinical use.

Interestingly, comparisons of gene lists from renal and liver recipients revealed little overlap even if they are directly compared employing the same transcriptional platform [45]. The absence of similarity of long-term stable graft function between these two organs argues for the fact that, graft acceptance mechanisms seems to be organ specific. This organ specificity is an important point which opposite the fact that tolerance is a systemic and unique immunological mechanism and which prevent the use of a general biomarker for all transplanted organs. On the contrary, several genes or pathway appears to be involved in these different processes [31,32,39]. Even if these genes are not by themselves good biomarkers because their expression is not modulated (as it is the case for TGF- β), their study should highlight potential pathway or mechanisms involved in operational tolerance.

Identified among the 49 gene set from Brouard *et al.* [31] to be specific of operational tolerance, SMILE, also known as TMTC3 (transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3), was also found to be decreased in the graft biopsies from patients undergoing a chronic antibody mediated rejection and related to endoplasmic reticulum stress [46]. The implication of this molecule and of endoplasmic reticulum stress in organ transplantation could increase our understanding of allograft injury and tolerance mechanisms. Recently, Alvarez *et al.* [47] showed that 13 long-term stable kidney recipients including three who had successfully stopped their immunosuppression presented a higher expression of FOXP3, CCR7 and CXCR4 than chronic rejection patients whereas tolerant patients did not exhibit significant differences. This study confirmed previous observations of an overexpression of FOXP3 in tolerant patients from renal transplantation [48] and from liver transplantation [49,50], but further investigations are needed to define if FOXP3, CCR7 and CXCR4 could be associated to long-term stability only or to drug-free long-term graft function. Other potential promising genes for drug-free long-term graft function diagnosis are the α -1,2 mannosidase and TOAG-1 genes, which have initially been described with higher expression in rat kidney and mouse heart biopsies of tolerance transplantation models [51]. Furthermore, Sagoo *et al.* [35^{**}] showed a higher α -1,2 mannosidase/Foxp3 ratio in operationally tolerant patients compared with chronic rejection patients in PBMC. Whereas this study is a positive example of the use of animal models transposed to human in the biomarker research field, such extrapolations from small experimental rodent models to human clinic examples are rare and setbacks are actually not reported.

Conclusion

Finally, in the purpose of creation of a composite score diagnostic or predictive of operational tolerance state, the use of biomarkers of 'nontolerant' state such as acute and chronic rejection should be included [22]. Association with clinical parameters and with nontolerance biomarkers could create a composite score which could let us hope increase success of wean off procedures in the future for liver transplantation and renal transplantation. Indeed, the constitution of a composite score, based on potential transcriptomic biomarkers of operational tolerance and clinical parameters, such as the time from transplantation as mentioned by Benitez *et al.* [42] but also other clinical parameters that predict graft outcome such as 6 months creatinemia, number of acute rejection episodes in the first year [52] seem promising way. A major cutoff in all these transcriptomic studies is the small number of patients, which limits the statistic power of analysis and increases the observation of an outlier event. Thus, the constitution of larger patient cohorts to identify or validate surrogate molecular biomarkers is necessary and would be only achieved thanks to large consortiums [53,54].

Acknowledgments

R.D. is supported by grants from the Foundation pour la Recherche Médicale (FRM) and from the CENTAURE foundation (RTRS, France). M.R. is supported by a grant from the Riset consortium (Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance).

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (p. 539).

- 1 Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172:603–606.
- 2 Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49:273–280.
- 3 MacDonald HR, Lees RK, Schneider R, *et al.* Positive selection of CD4+ thymocytes controlled by MHC class II gene products. *Nature* 1988; 336:471–473.
- 4 Jones ND, Fluck NC, Mellor AL, *et al.* The induction of transplantation tolerance by intrathymic (i.t.) delivery of alloantigen: a critical relationship between i.t. deletion, thymic export of new T cells and the timing of transplantation. *Int Immunol* 1998; 10:1637–1646.
- 5 Oluwole SF, Chowdhury NC, Ingram M, *et al.* Mechanism of acquired thymic tolerance induced by a single major histocompatibility complex class I peptide with the dominant epitope: differential analysis of regulatory cytokines in the lymphoid and intra-graft compartments. *Transplantation* 1999; 68:418–429.
- 6 Remuzzi G, Ferrazzi P, Bontempelli M, *et al.* Preliminary results of intrathymic injection of donor cells to prevent acute rejection in human heart transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:1291–1294.
- 7 Ildstad ST, Sachs DH. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 1984; 307:168–170.
- 8 Sharabi Y, Sachs DH. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med* 1989; 169:493–502.
- 9 Rocha B, von Boehmer H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 1991; 251:1225–1228.
- 10 Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, *et al.* Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 1992; 257:789–792.
- 11 Sayegh MH, Zheng XG, Magee C, *et al.* Donor antigen is necessary for the prevention of chronic rejection in CTLA4g-treated murine cardiac allograft recipients. *Transplantation* 1997; 64:1646–1650.
- 12 Zheng XX, Markees TG, Hancock WW, *et al.* CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. *J Immunol* 1999; 162:4983–4990.
- 13 Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, *et al.* Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:13967–13972.
- 14 Guinan EC, Boussiotis VA, Neuberger D, *et al.* Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N Engl J Med* 1999; 340:1704–1714.
- 15 Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6:736–746.
- 16 Ekberg H, Grinyó J, Nashan B, *et al.* Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the CAESAR Study. *Am J Transplant* 2007; 7:560–570.
- 17 Opelz G, Döhler B. Influence of time of rejection on long-term graft survival in renal transplantation. *Transplantation* 2008; 85:661–666.
- 18 Ballet C, Roussey-Kesler G, Aubin JT, *et al.* Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am J Transplant* 2006; 6:2796–2801.
- 19 Orlando G, Soker S, Wood K. Operational tolerance after liver transplantation. • *J Hepatol* 2009; 50:1247–1257.
This review describes clinical cases of operational tolerance obtained in the field of liver transplantation and discuss about induction protocols.
- 20 Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, *et al.* HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008; 358:353–361.
- 21 Di Cocco P, Bonanni L, D'Angelo M, *et al.* Clinical operational tolerance after solid organ transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41:1278–1282.
- 22 Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation* 2008; 86:192–199.
- 23 Porcheray F, Wong W, Saidman SL, *et al.* B-cell immunity in the context of T-cell tolerance after combined kidney and bone marrow transplantation in humans. *Am J Transplant* 2009; 9:2126–2135.
- 24 VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, *et al.* Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000; 106:145–155.
- 25 Starzl TE, Murase N, Demetris AJ, *et al.* Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* 2004; 77:926–929.
- 26 Burlingham WJ, Grailer AP, Fechner JH, *et al.* Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* 1995; 59:1147–1155.
- 27 Thauan O, Legendre C, Morelon E, *et al.* To biopsy or not to biopsy? Should we screen the histology of stable renal grafts? *Transplantation* 2007; 84:671–676.
- 28 Li B, Hartono C, Ding R, *et al.* Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001; 344:947–954.
- 29 Suthanthiran M. Human renal allograft rejection: molecular characterization. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13 (Suppl 1):21–24.
- 30 Gimino VJ, Lande JD, Berryman TR, *et al.* Gene expression profiling of bronchoalveolar lavage cells in acute lung rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1237–1242.
- 31 Brouard S, Mansfield E, Braud C, *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:15448–15453.
- 32 Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, *et al.* Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7:309–319.
- 33 Lu BS, Yu AD, Zhu X, *et al.* Sequential gene expression profiling in lung transplant recipients with chronic rejection. *Chest* 2006; 130:847–854.

440 Tolerance induction

- 34 Horwitz PA, Tsai EJ, Putt ME, *et al.* Detection of cardiac allograft rejection and response to immunosuppressive therapy with peripheral blood gene expression. *Circulation* 2004; 110:3815–3821.
- 35 Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, *et al.* Indices of Tolerance: development of cross-platform biomarkers to detect renal transplant tolerance in man. *J Clin Invest* 2010; 120:1848–1861.
- This study explores immune and transcriptomic parameters, which could be surrogate biomarkers in blood of different groups of renal transplanted patients. Interestingly, two independent groups are used including a total of 35 operationally tolerant renal recipients.
- 36 Ashton-Chess J, Dugast E, Colvin RB, *et al.* Regulatory, effector, and cytotoxic T cell profiles in long-term kidney transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:1113–1122.
- 37 Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, *et al.* MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:5330–5335.
- This review provides evidence that acute rejection is associated with an increase in intragraft expression of microRNA.
- 38 Braud C, Baeten D, Giral M, *et al.* Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: part I. Blood gene expression statistical analysis. *J Cell Biochem* 2008; 103:1681–1692.
- 39 Sivozhelezov V, Braud C, Giacomelli L, *et al.* Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplants recipients. part II. Nonstatistical gene microarray analysis. *J Cell Biochem* 2008; 103:1693–1706.
- 40 Martínez-Llordella M, *et al.* Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; 118:2845–2857.
- 40 Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, *et al.* Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; 118:2845–2857.
- 42 Benitez CE, Lozano JJ, Martínez-Llordella M, *et al.* Use of transcriptional biomarkers to identify liver transplant recipients who can successfully discontinue immunosuppressive therapy. Oral communication of the American Transplant Congress 2010. Session 71: Immune Monitoring II: Rejection and Tolerance (517).
- 43 Pallier A, Hillion S, Danger R, *et al.* Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International*, 2010 (in press).
- This paper highlights a significant increase of total B cells in blood of renal operational tolerant recipients, this study also describes that these B cells displayed a memory and an inhibitory phenotype which may be potentially involved in operational tolerance.
- 44 Shen-Orr SS, Tibshirani R, Khatri P, *et al.* Cell type-specific gene expression differences in complex tissues. *Nat Methods* 2010; 7:287–289.
- 45 Lozano JJ, Pallier A, Martínez-Llordella M, *et al.* Absence of significant overlap in blood transcriptional patterns between operationally tolerant liver and kidney recipients. Oral communication of the American Transplant Congress 2010. Session 71: Immune Monitoring II: Rejection and Tolerance(522).
- 46 Racapé M, Duong Van Huyen JP, Danger R, *et al.* SMILE: a new molecule overexpressed in the blood of operationally tolerant patients is involved in endoplasmic reticulum stress response. Oral communication of the American Transplant Congress 2010. Session 46: Tolerance/Immune Deviation I (336).
- 47 Alvarez CM, Opelz G, Garcia LF, Susal C. Expression of regulatory T-cell-related molecule genes and clinical outcome in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2009; 87:857–863.
- 48 Louis S, Braudeau C, Giral M, *et al.* Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81:398–407.
- 49 Pons JA, Ramirez P, Martínez-Alarcón L, *et al.* FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation* 2008; 86:1370–1378.
- 50 Li Y, Zhao X, Cheng D, *et al.* The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation* 2008; 86:1837–1843.
- 51 Sawitzki B, Bushell A, Steger U, *et al.* Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007; 7:1091–1102.
- 52 Danger R, Giral M, Souillou JP, Brouard S, *et al.* Rationale and criteria of eligibility for calcineurin inhibitor interruption following kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13:609–613.
- 53 Hernandez Fuentes M, Sawitzki B, Perucha E, *et al.* Identification of immune tolerance in renal transplants [abstract]. American Transplant Congress 2008.
- 54 Newell K, Asare A, Kirk, A, *et al.* A unique B cell signature associated with operational tolerance [abstract]. American Transplant Congress 2008.

Annexe 3

Enrichissement en fonctions impliquant des genes diminués dans les cellules HeLa transfectées par un siRNA SMILE

GO NUMBER	GO CATEGORY NAME	TOTAL GENES	CHANGED GENES	p-value	
1	GO:0032940	secretion by cell	136	14	0,000550
2	GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	303	22	0,002199
3	GO:0006082	organic acid metabolic process	305	22	0,002388
4	GO:0045045	secretory pathway	114	11	0,003544
5	GO:0006508	proteolysis	378	25	0,003965
6	GO:0016192	vesicle-mediated transport	334	22	0,007058
7	GO:0046903	secretion	182	14	0,008350
8	GO:0044255	cellular lipid metabolic process	345	22	0,010152
9	GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	1958	91	0,010267
10	GO:0030163	protein catabolic process	168	13	0,010346
11	GO:0006066	alcohol metabolic process	190	14	0,011947
12	GO:0043285	biopolymer catabolic process	234	16	0,014630
13	GO:0019538	protein metabolic process	2039	93	0,015656
14	GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	141	11	0,016685
15	GO:0006629	lipid metabolic process	407	24	0,018131
16	GO:0044267	cellular protein metabolic process	1906	87	0,019677
17	GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	126	10	0,019712
18	GO:0009117	nucleotide metabolic process	126	10	0,019712
19	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	189	13	0,025232
20	GO:0055086	nucleobase nucleoside and nucleotide metabolic process	138	10	0,034312
21	GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	226	14	0,044629
22	GO:0009308	amine metabolic process	206	13	0,045829
23	GO:0009057	macromolecule catabolic process	291	17	0,046136
24	GO:0009056	catabolic process	448	24	0,048405



Annexe 4

Enrichissement en fonctions impliquant des genes augmentés dans les cellules HeLa transfectées par un siRNA SMILE

GO NUMBER	GO CATEGORY NAME	TOTAL GENES	CHANGED GENES	p-value	
1	GO:0048869	cellular developmental process	954	72	6,6932E-09
2	GO:0030154	cell differentiation	954	72	6,6932E-09
3	GO:0048468	cell development	685	50	6,0037E-06
4	GO:0032502	developmental process	1580	89	5,1371E-05
5	GO:0007154	cell communication	1735	90	0,000921
6	GO:0048519	negative regulation of biological process	729	45	0,000922
7	GO:0007165	signal transduction	1589	83	0,001292
8	GO:0006915	apoptosis	495	33	0,001343
9	GO:0012501	programmed cell death	502	33	0,001696
10	GO:0007267	cell-cell signaling	236	19	0,001863
11	GO:0008219	cell death	526	34	0,001915
12	GO:0016265	death	526	34	0,001915
13	GO:0050793	regulation of developmental process	473	31	0,002455
14	GO:0009605	response to external stimulus	262	20	0,002679
15	GO:0042981	regulation of apoptosis	339	24	0,002844
16	GO:0051093	negative regulation of developmental process	209	17	0,002868
17	GO:0043066	negative regulation of apoptosis	158	14	0,003062
18	GO:0019725	cellular homeostasis	158	14	0,003062
19	GO:0043067	regulation of programmed cell death	344	24	0,003435
20	GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	127	12	0,003534
21	GO:0043069	negative regulation of programmed cell death	161	14	0,003635
22	GO:0008283	cell proliferation	445	29	0,003664
23	GO:0042592	homeostatic process	233	18	0,003804
24	GO:0048522	positive regulation of cellular process	634	38	0,003944
25	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	147	13	0,004331
26	GO:0007049	cell cycle	565	34	0,005982
27	GO:0009611	response to wounding	171	14	0,006206
28	GO:0022402	cell cycle process	323	22	0,006631
29	GO:0048523	negative regulation of cellular process	698	40	0,006715
30	GO:0048518	positive regulation of biological process	677	39	0,006822
31	GO:0007610	behavior	106	10	0,007565
32	GO:0050896	response to stimulus	1070	56	0,009199
33	GO:0055082	cellular chemical homeostasis	110	10	0,009738
34	GO:0006950	response to stress	616	35	0,012551
35	GO:0006811	ion transport	304	20	0,013496
36	GO:0007166	cell surface receptor linked signal transduction	560	32	0,015522
37	GO:0007186	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	210	15	0,015605
38	GO:0006916	anti-apoptosis	120	10	0,017242
39	GO:0051094	positive regulation of developmental process	214	15	0,018234
40	GO:0065008	regulation of biological quality	507	29	0,020563
41	GO:0000003	reproduction	218	15	0,021190
42	GO:0045941	positive regulation of transcription	199	14	0,021523
43	GO:0032501	multicellular organismal process	1379	67	0,021962
44	GO:0048878	chemical homeostasis	143	11	0,022081
45	GO:0019953	sexual reproduction	125	10	0,022298
46	GO:0006793	phosphorus metabolic process	599	33	0,022868
47	GO:0006796	phosphate metabolic process	599	33	0,022868
48	GO:0022008	neurogenesis	127	10	0,024595
49	GO:0045935	positive regulation of nucleobase nucleoside nucleotide and nucleic acid metabolic process	207	14	0,028990
50	GO:0000279	M phase	209	14	0,031122
51	GO:0007275	multicellular organismal development	1056	52	0,034857
52	GO:0003008	system process	380	22	0,036431
53	GO:0006812	cation transport	215	14	0,038208
54	GO:0042127	regulation of cell proliferation	278	17	0,040111
55	GO:0050877	neurological system process	278	17	0,040111
56	GO:0051179	localization	1644	76	0,042147
57	GO:0006928	cell motility	199	13	0,043828
58	GO:0051674	localization of cell	199	13	0,043828
59	GO:0048856	anatomical structure development	909	45	0,045032

Annexe 5

EXAMEN MACROSCOPIQUE ET HISTOPATHOLOGIQUE DES SOURIS SAUVAGES ET HETEROZYGOTES KO
POUR SMILE

Par: PLATE FORME DE DIAGNOSTIC ET DE SERVICE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE, Ecole Nationale
Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation

Laëticia Dorso, Jérôme Abadie



ONIRIS
Atlanpôle-La Chanterie
BP 40706
44307 NANTES CEDEX 03 - FRANCE

PLATE FORME DE DIAGNOSTIC ET DE SERVICE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Laëtitia DORSO
Docteur en médecine vétérinaire, MSc
Diplomate ECVP

laetitia.dorso@oniris-nantes.fr

Jérôme ABADIE
Maître de Conférences
Docteur en médecine vétérinaire, PhD
Diplomate ECVP

Tél : 02 40 68 76 54
Fax : 02 40 18 00 02
E-mail : jerome.abadie@oniris-nantes.fr

Nantes, le 3 juin 2010

A l'attention de : **Sophie BROUARD**

Souris K467 « Smile »

Nous avons procédé à l'examen macroscopique et histopathologique de 28 souris (15 mâles (11 hétérozygotes K467L-/WT et 4 sauvages K467WT/WT) et 13 femelles (10 hétérozygotes K467L-/WT et 3 sauvages K467WT/WT) selon les données commémoratives qui nous ont été transmises.

Les prélèvements histopathologiques observés ont été colorés à l'hémalun-éosine-safran (coloration histologique topographique conventionnelle).

RESULTATS DE L'ANALYSE MACROSCOPIQUE

L'examen nécropsique des 28 souris n'a mis en évidence aucune lésion macroscopique. Des prélèvements systématiques en vue d'une analyse histologique ont été effectués sur la totalité des souris.

RESULTATS DE L'ANALYSE HISTOLOGIQUE

Pour chaque souris, un tableau synthétique récapitulant l'ensemble des caractéristiques phénotypiques observées sur les organes et tissus prélevés est indiqué.

ALS (Absence de Lésion Significative)

NO (Non Observé)

	1 (101464)	2 (101465)
Peau	ALS	NO
Cœur	ALS	ALS
Aorte	NO	NO
Trachée	ALS	ALS
Poumon	Stase sanguine capillaire diffuse modérée	Stase sanguine capillaire diffuse modérée
Moelle osseuse	NO	ALS
Thymus	ALS	ALS
Rate	ALS	Hémosidérose diffuse marquée
Langue	ALS	ALS
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	ALS	ALS
Caecum	Bactéries filamenteuses dans les cryptes	Bactéries filamenteuses dans les cryptes
Colon	NO	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Légère hémosidérose des cellules de Kupffer
Pancréas	Caryomégalie de quelques cellules acineuses	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	NO	ALS
Testicule	NO	Rares cellules géantes hyperacidophiles dans la lumière des tubes séminifères
Ovaire		
Utérus		
Glandes sexuelles annexes	ALS	ALS
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	ALS	ALS
Thyroïde	NO	NO
Surrénale	ALS	ALS
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs modérés de	Dépôts conjonctifs modérés de

	porphyrine	porphyrine
	3 (101466)	4 (101467)
Peau	NO	NO
Cœur	ALS	ALS
Aorte	ALS	ALS
Trachée	ALS	ALS
Poumon	Stase sanguine capillaire diffuse modérée	Stase sanguine capillaire diffuse légère
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	ALS	NO
Rate	Hémossidérose diffuse légère	NO
Langue	NO	ALS
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	NO
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	ALS	NO
Caecum	ALS	NO
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	NO	ALS
Testicule	ALS	ALS
Ovaire		
Utérus		
Glandes sexuelles annexes	ALS	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	ALS	Légères hémorragies méningées, focales, récentes
Thyroïde	NO	NO
Surrénale	ALS	NO
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine

	5 (101468)	6 (101469)
Peau	NO	ALS
Cœur	ALS	ALS
Aorte	NO	NO
Trachée	ALS	NO
Poumon	Stase sanguine capillaire diffuse modérée	ALS
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	ALS	ALS
Rate	Hémossidérose diffuse légère	ALS
Langue	ALS	ALS
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	NO
Caecum	Bactéries filamenteuses dans les cryptes	NO
Colon	Bactéries filamenteuses dans les cryptes Prolifération bactérienne de surface	ALS
Glande salivaire	NO	ALS
Foie	Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie, cytomégalie Inclusions cytoplasmiques intranucléaires Foyers de myélopoïèse extramédullaire	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire
Pancréas	Caryomégalie de quelques cellules acineuses	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule	ALS	Quelques cellules géantes dans la lumière de tubes séminifères atrophiés Atrophie séminifères modérée à marquée
Ovaire		
Utérus		
Glandes sexuelles annexes	ALS	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	Légères hémorragies méningées, focales, récentes	ALS
Thyroïde	NO	NO
Surrénale	NO	NO
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine

	7 (101470)	8 (101471)
Peau	ALS	ALS
Cœur	ALS	ALS
Aorte	NO	NO
Trachée	NO	ALS
Poumon	ALS	Stase sanguine capillaire diffuse légère
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	NO	NO
Rate	NO	ALS
Langue	ALS	ALS
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	NO	ALS
Iléon	NO	ALS
Caecum	Bactéries filamenteuses dans les cryptes	ALS
Colon	ALS	NO
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire Inclusions cytoplasmiques intranucléaires	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée
Pancréas	NO	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule	ALS	ALS
Ovaire		
Utérus		
Glandes sexuelles annexes	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires	ALS
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	NO	ALS
Encéphale	ALS	ALS
Thyroïde	NO	ALS
Surrénale	NO	NO
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine

	9 (101472)	10 (101473)
Peau	ALS	ALS
Cœur	ALS	Hyalinisation de quelques cardiomyocytes
Aorte	NO	NO
Trachée	ALS	ALS
Poumon	ALS	Stase sanguine capillaire diffuse légère
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	ALS	NO
Rate	NO	ALS
Langue	ALS	ALS
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	ALS	NO
Caecum	ALS	ALS
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée	Ectasie veineuse modérée Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule	ALS	ALS
Ovaire		
Utérus		
Glandes sexuelles annexes	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	Légères hémorragies méningées, focales, récentes	Légères hémorragies méningées, focales, récentes
Thyroïde	NO	NO
Surrénale	NO	NO
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine

	11 (101474)	12 (101475)
Peau	ALS	ALS
Cœur	ALS	ALS
Aorte	ALS	NO
Trachée	ALS	ALS
Poumon	Légères hémorragies pulmonaires récentes	ALS
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	ALS	ALS
Rate	NO	ALS
Langue	ALS	Légère lipomatose des muscles linguaux
Œsophage	NO	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	NO
Caecum	ALS	ALS
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	Légères hémorragies interstitielles récentes
Vessie	ALS	ALS
Testicule	ALS	ALS
Ovaire		
Utérus		
Glandes sexuelles annexes	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires	ALS
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	Légères hémorragies méningées, focales, récentes	Légères hémorragies méningées, focales, récentes
Thyroïde	ALS	ALS
Surrénale	NO	NO
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	NO	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine

	13 (101476)	14 (101477)
Peau	ALS	ALS
Cœur	ALS	ALS
Aorte	ALS	ALS
Trachée	ALS	ALS
Poumon	Légères hémorragies pulmonaires récentes	Stase sanguine capillaire diffuse modérée
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	ALS	Nombreux macrophages à corps tingibles dans le cortex
Rate	ALS	ALS
Langue	ALS	ALS
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	ALS
Caecum	NO	NO
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée	Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule	ALS	ALS
Ovaire		
Utérus		
Glandes sexuelles annexes	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	NO
Encéphale	ALS	ALS
Thyroïde	ALS	ALS
Surrénale	NO	NO
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine

	15 (101478)	16 (101479)
Peau	NO	ALS
Cœur	ALS	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires
Aorte	ALS	ALS
Trachée	NO	NO
Poumon	Légères hémorragies pulmonaires récentes Stase sanguine capillaire diffuse modérée	Stase sanguine capillaire diffuse modérée
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	Nombreux macrophages à corps tingibles dans le cortex	NO
Rate	ALS	NO
Langue	ALS	ALS
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	NO	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	ALS
Caecum	ALS	ALS
Colon	ALS	NO
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire	Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire
Pancréas	ALS	ALS
Rein	Légères hémorragies interstitielles récentes	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule	ALS	
Ovaire		ALS
Utérus		Epithélium mitotique non sécrétant Léger infiltrat neutrophilique dans le chorion
Glandes sexuelles annexes	Rares cellules géantes dans les canaux épидидymaires	Kératinisation de l'épithélium vaginal
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	Légères hémorragies méningées, focales, récentes	ALS
Thyroïde	NO	ALS
Surrénale	NO	ALS
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine	NO

	17 (101480)	18 (101481)
Peau	ALS	ALS
Cœur	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires Infiltrat lymphoplasmocytaire minime dans le tissu adipeux péricardique	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires Infiltrat lymphoplasmocytaire minime dans le tissu adipeux péricardique
Aorte	NO	ALS
Trachée	ALS	ALS
Poumon	Stase sanguine capillaire diffuse modérée	Stase sanguine capillaire diffuse légère
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	ALS	ALS
Rate	Hémosidérose diffuse marquée	Légère hémosidérose diffuse
Langue	ALS	Légère lipomatose des muscles linguaux
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	NO
Caecum	NO	ALS
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	NO
Testicule		
Ovaire	Corps blanc	ALS
Utérus	Œdème léger du chorion Léger infiltrat neutrophilique du chorion Épithélium non sécrétant	Épithélium mitotique Infiltrat neutrophilique marqué du chorion + fibrose du chorion Nombreux granulocytes neutrophiles pycnotiques, caryorrhétiques au voisinage de l'épithélium
Glandes sexuelles annexes	Kératinisation marquée de l'épithélium vaginal + sécrétion mucoïde abondante dans la lumière	NO
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	ALS	NO
Thyroïde	NO	ALS
Surrénale	ALS	NO
Œil	ALS	ALS
Glande de	Dépôts conjonctifs modérés de	Dépôts conjonctifs modérés de

Harder	porphyrine	porphyrine
	19 (101482)	20 (101483)
Peau	ALS	ALS
Cœur	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires
Aorte	NO	ALS
Trachée	ALS	NO
Poumon	Stase sanguine capillaire diffuse légère	Stase sanguine capillaire diffuse légère
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	Légères hémorragies médullaires récentes	Nombreux macrophages à corps tingibles dans le cortex
Rate	ALS	NO
Langue	Légère lipomatose des muscles linguaux	NO
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	NO
Caecum	ALS	ALS
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire	Stéatose microvacuolaire diffuse modérée Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule		
Ovaire	ALS	ALS
Utérus	Léger infiltrat neutrophilique du chorion Epithélium non sécrétant	Léger œdème du chorion Epithélium non sécrétant
Glandes sexuelles annexes	NO	NO
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	ALS	Légères hémorragies méningées récentes
Thyroïde	ALS	NO
Surrénale	NO	ALS
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine

	21 (101484)	22 (101485)
Peau	ALS	ALS
Cœur	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires
Aorte	NO	ALS
Trachée	ALS	ALS
Poumon	Stase sanguine capillaire diffuse légère	Stase sanguine capillaire diffuse légère
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	ALS	ALS
Rate	Légère hémosidérose diffuse	ALS
Langue	ALS	ALS
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	NO
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	NO
Caecum	NO	ALS
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule		
Ovaire	Corps blanc	ALS
Utérus	Léger infiltrat neutrophilique du chorion Epithélium non sécrétant	Infiltrat neutrophilique marqué du chorion Exocytose neutrophilique transépithéliale marquée Epithélium non sécrétant
Glandes sexuelles annexes	NO	NO
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	Légères hémorragies méningées récentes	ALS
Thyroïde	ALS	ALS
Surrénale	NO	ALS
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine

	23 (101486)	24 (101487)
Peau	ALS	ALS
Cœur	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires
Aorte	ALS	NO
Trachée	ALS	ALS
Poumon	ALS	Stase sanguine capillaire diffuse légère
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	ALS	ALS
Rate	NO	Légère hémossidérose diffuse
Langue	Légère lipomatose des muscles linguaux	Légère lipomatose des muscles linguaux
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	ALS	NO
Caecum	NO	ALS
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire	Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule		
Ovaire	ALS	ALS
Utérus	Epithélium non sécrétant	Epithélium non sécrétant
Glandes sexuelles annexes	Dégénérescence ballonisante des cellules épithéliales Exocytose neutrophilique transépithéliale marquée	NO
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	ALS	Légères hémorragies méningées récentes
Thyroïde	NO	NO
Surrénale	NO	ALS
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs modérés de porphyrine	NO

	25 (101488)	26 (101489)
Peau	ALS	ALS
Cœur	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires
Aorte	ALS	ALS
Trachée	ALS	ALS
Poumon	Stase sanguine capillaire diffuse légère	Stase sanguine capillaire diffuse légère
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	NO	NO
Rate	Hémosidérose diffuse modérée	ALS
Langue	Légère lipomatose des muscles linguaux	Légère lipomatose des muscles linguaux
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	NO
Caecum	ALS	ALS
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	ALS
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée	Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule		
Ovaire	ALS	ALS
Utérus	Œdème diffus, modéré du chorion Nombreuses mitoses des cellules épithéliales	Epithélium non sécrétant
Glandes sexuelles annexes	Kératinisation vaginale diffuse, marquée	NO
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	NO	ALS
Encéphale	ALS	ALS
Thyroïde	NO	ALS
Surrénale	NO	ALS
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine

	27 (101490)	28
Peau	ALS	ALS
Cœur	Pigment brun intracytoplasmique dans les cellules endothéliales valvulaires	NO
Aorte	ALS	NO
Trachée	ALS	NO
Poumon	Stase sanguine capillaire diffuse légère	NO
Moelle osseuse	ALS	ALS
Thymus	NO	NO
Rate	Légère hémossidérose diffuse	NO
Langue	Légère lipomatose des muscles linguaux	NO
Œsophage	ALS	ALS
Estomac	ALS	ALS
Duodénum	ALS	ALS
Iléon	NO	NO
Caecum	NO	NO
Colon	ALS	ALS
Glande salivaire	ALS	NO
Foie	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée Foyers de myélopoïèse extramédullaire	Stéatose microvacuolaire diffuse légère Nombreux hépatocytes binucléés Caryomégalie isolée
Pancréas	ALS	ALS
Rein	ALS	ALS
Vessie	ALS	ALS
Testicule		
Ovaire	Corps blanc	ALS
Utérus	Nombreux granulocytes neutrophiles pycnotiques sous-épithéliaux Exocytose neutrophilique transépithéliale marquée	Infiltrat neutrophilique dans le chorion Exocytose neutrophilique transépithéliale modérée
Glandes sexuelles annexes	NO	NO
Muscle strié	ALS	ALS
Moëlle épinière	ALS	ALS
Encéphale	ALS	ALS
Thyroïde	ALS	NO
Surrénale	NO	NO
Œil	ALS	ALS
Glande de Harder	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine	Dépôts conjonctifs légers de porphyrine

CONCLUSION

L'examen histopathologique des 28 souris n'a pas mis en évidence de particularités phénotypiques significatives dans la population analysée.

Les lésions rapportées peuvent être classées en 2 catégories :

- les **lésions dites agoniques**, c'est-à-dire concomitantes avec la mort de l'animal ou artéfactuelles attribuables au mode d'euthanasie.
- les **lésions incidentales**, c'est-à-dire non attribuables au background génétique mais répertoriées dans la littérature comme présentes chez un certain nombre d'animaux et n'ayant aucune signification pathologique.

Parmi les **lésions agoniques** sont classées :

- les hémorragies récentes, peu extensives au niveau du poumon (3 mâles sur 28 animaux), du rein (3/28 exclusivement des mâles), du thymus (1 femelle sur 28 animaux) et des méninges (10/28, 7 mâles et 3 femelles)
- la stase sanguine diffuse, capillaire au niveau des poumons (20/28, 9 mâles et 11 femelles)

Parmi les **lésions incidentales** sont considérées :

- la stéatose, la myélopoïèse extramédullaire et les atypies cytonucléaires (hépatocytes binucléés, caryomégalie, inclusions cytoplasmiques intranucléaires) au niveau du foie (28/28)
- la caryomégalie isolée des cellules acineuses pancréatiques (2 mâles sur 28 animaux)
- la présence de rares cellules géantes dans la lumière des tubes séminifères ou des canaux épидидymaires (10 mâles sur 15)
- la présence de cellules granulocytes neutrophiles dans le chorion utérin (8 femelles sur 13), l'exocytose neutrophilique transépithéliale (3 femelles sur 13), les mitoses épithéliales (2 femelles sur 13) sont des aspects normaux de l'utérus murin, présentant des variations d'intensité selon les différentes phases du cycle œstral
- la kératinisation du vagin (3 femelles sur 13), la présence de sécrétion mucoïde (1 femelle sur 13) et l'exocytose neutrophilique transépithéliale associée à la dégénérescence ballonisante de l'épithélium (1 femelle sur 13) sont des aspects normaux du vagin murin, présentant des variations selon les différentes phases du cycle œstral
- la pigmentation des cellules endothéliales valvulaires par de la mélanine (12 femelles sur 28 animaux) est rapportée fréquemment dans la littérature surtout sur les souris de souche C57BL6 et C57BL10. Cependant, aucune préférence de sexe n'est rapportée : ces résultats peuvent être expliqués par un effet de coupe, les valvules cardiaques n'étant pas toujours présentes sur les plans de coupe

- les bactéries filamenteuses présentes à la surface de l'épithélium digestif font partie de la flore digestive normale des souris

- les dépôts conjonctifs, d'intensité variable, de porphyrine au niveau des glandes de Harder : ce pigment est constitutif des sécrétions des glandes de Harder, cependant si l'intensité de ces sécrétions augmentent (à l'occasion de stress par exemple), un écoulement oculaire rouge noirâtre peut être noté. La chromodacryorrhée est le nom donné à cette sécrétion excessive, témoignant souvent d'une atteinte marquée des glandes de Harder (stress intense, infection en cours)

Deux lésions isolées ont enfin été observées:

- l'atrophie séminifère notée chez la souris n°6 (101469)

- la hyalinisation des cardiomyocytes notée chez la souris n°10 (101473)

L'incidence faible de ces lésions (1 animal sur 28), ne permet pas de considérer ces deux lésions comme significatives (poids pathologique faible).

En conclusion, les analyses nécropsiques et histopathologiques complètes n'ont pas permis de mettre en évidence de différence morphologique dans la population des souris examinées. Même si elles n'ont pu être formellement distinguées entre elles, ces résultats sont en faveur d'une absence de particularités phénotypiques permettant de distinguer les souris hétérozygotes K467L-/WT et les souris sauvages K467WT/WT.

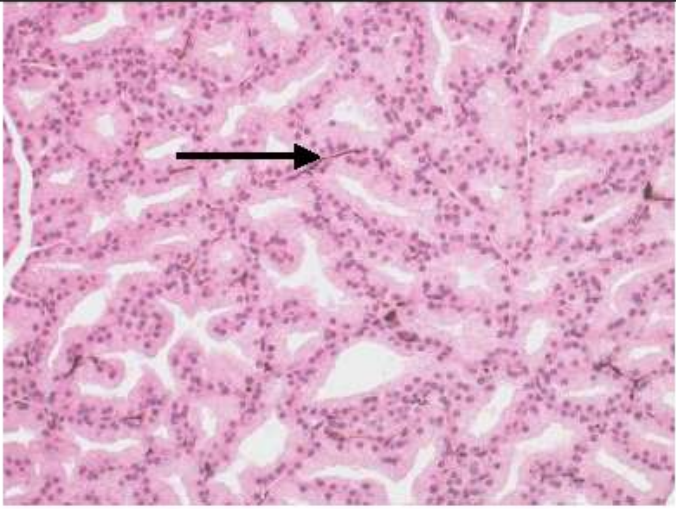
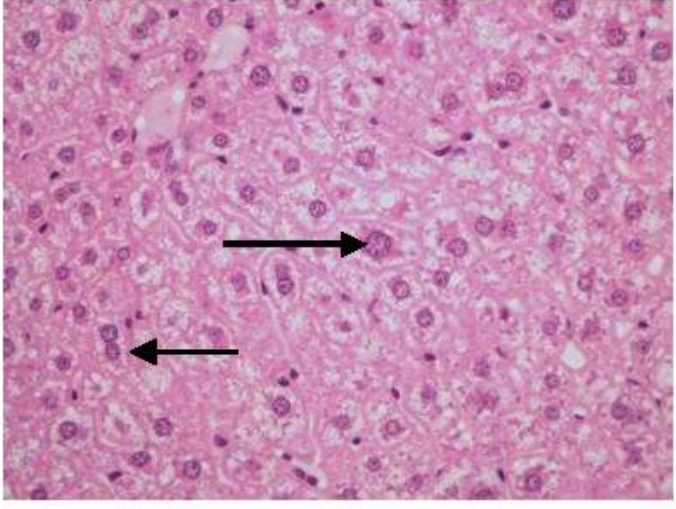
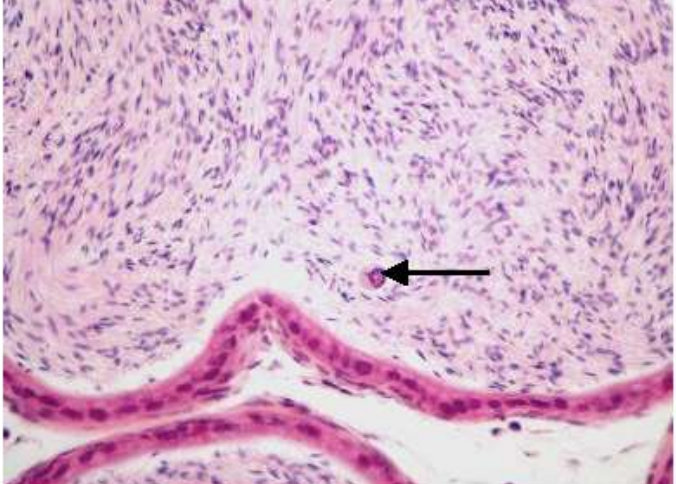
Laëtitia Dorso
DVM, MSc, DESVAP, Dipl ECVP

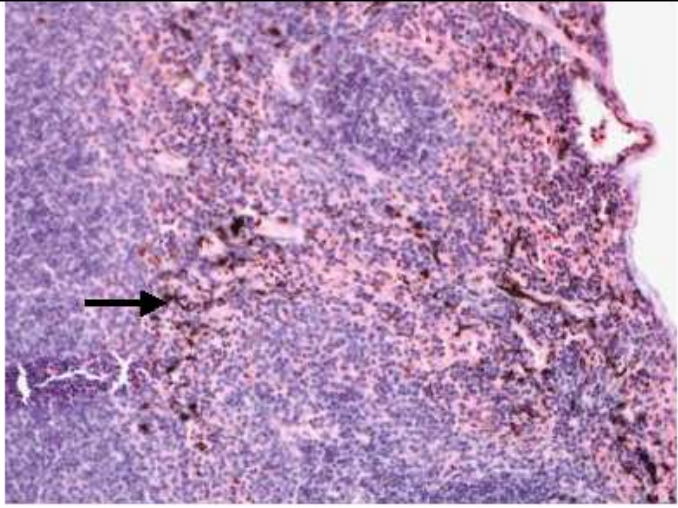
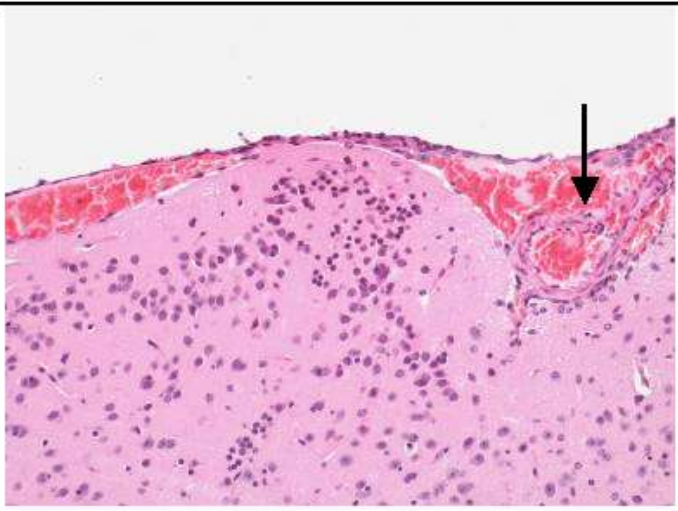



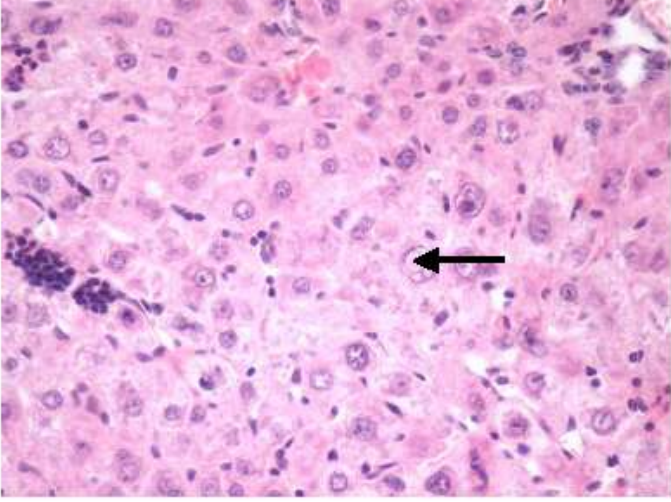

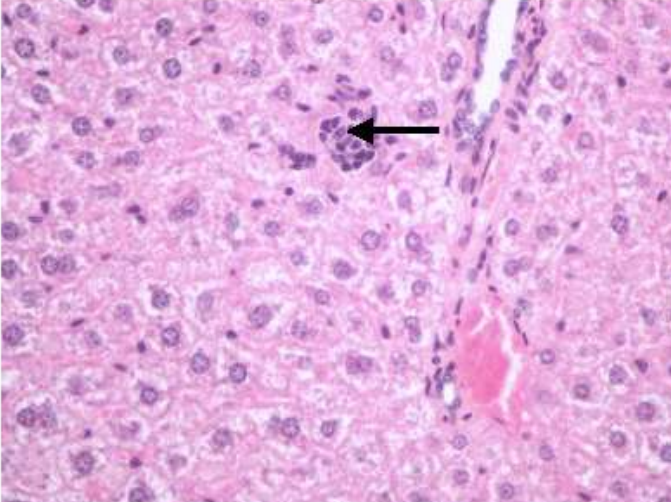
Jérôme Abadie
DVM, PhD, DESVAP, Dipl ECVP

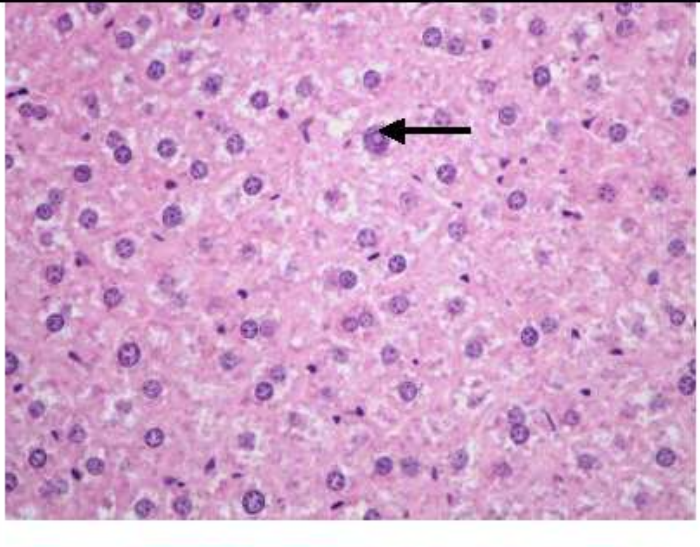
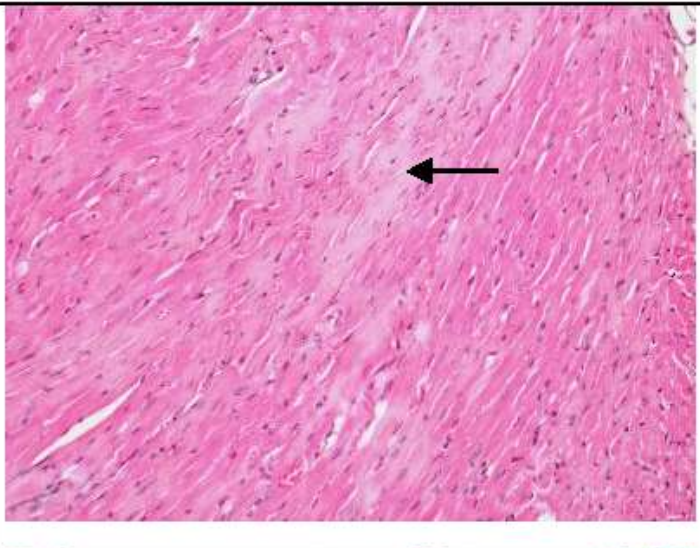
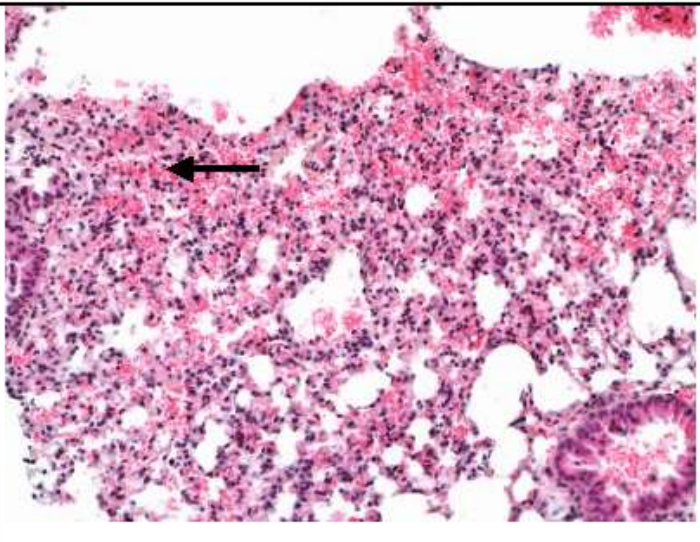


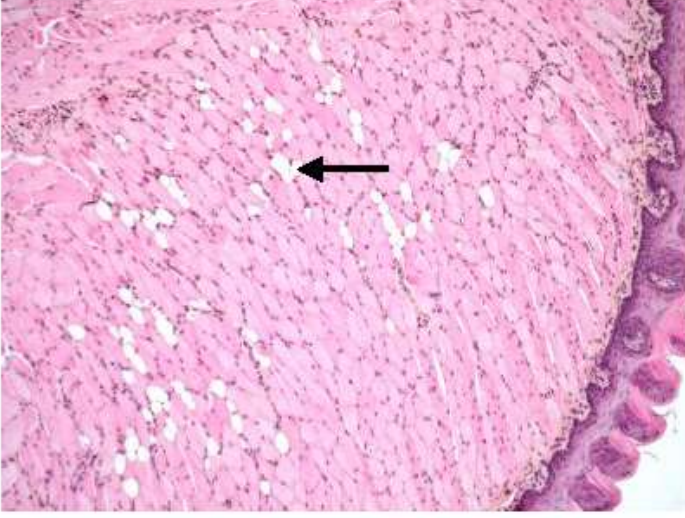
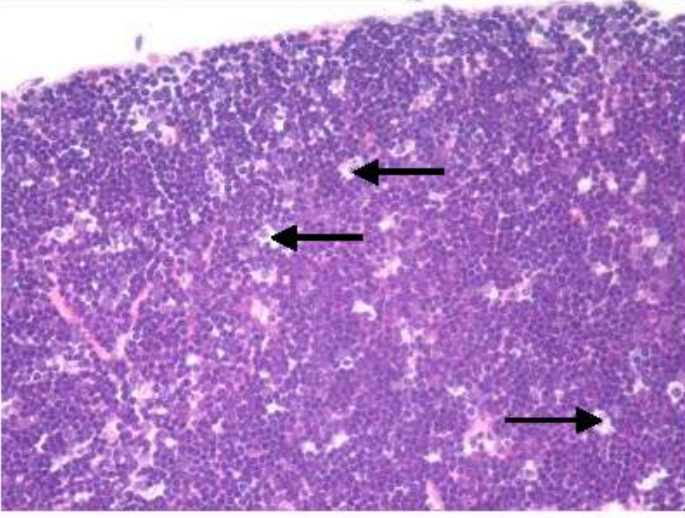
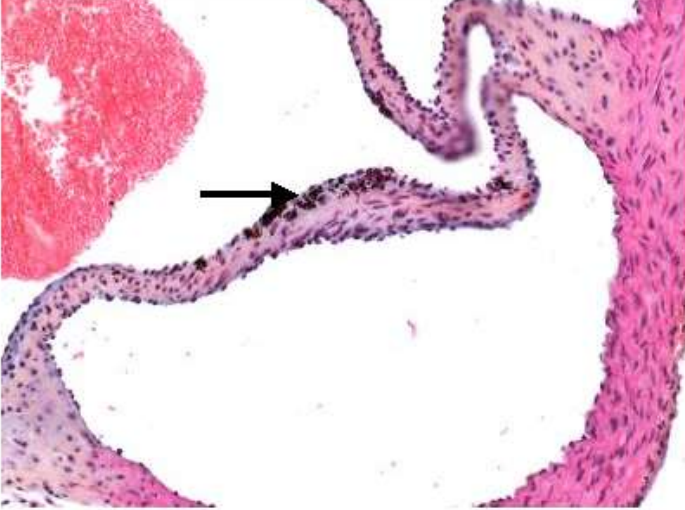
ANNEXES

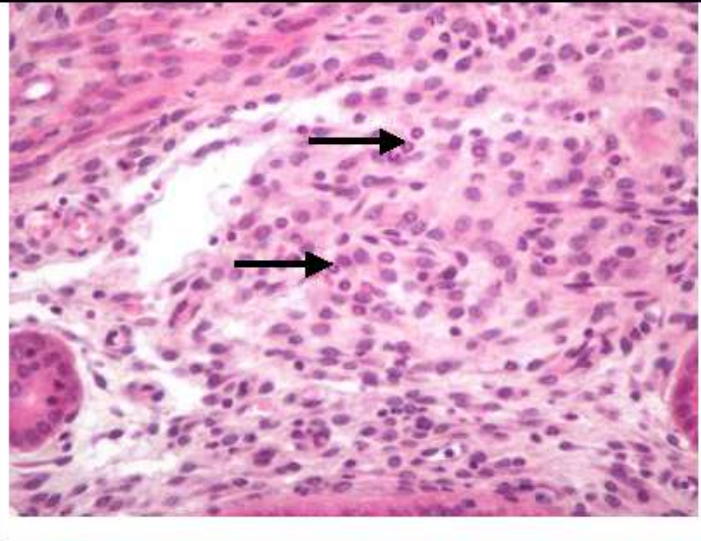
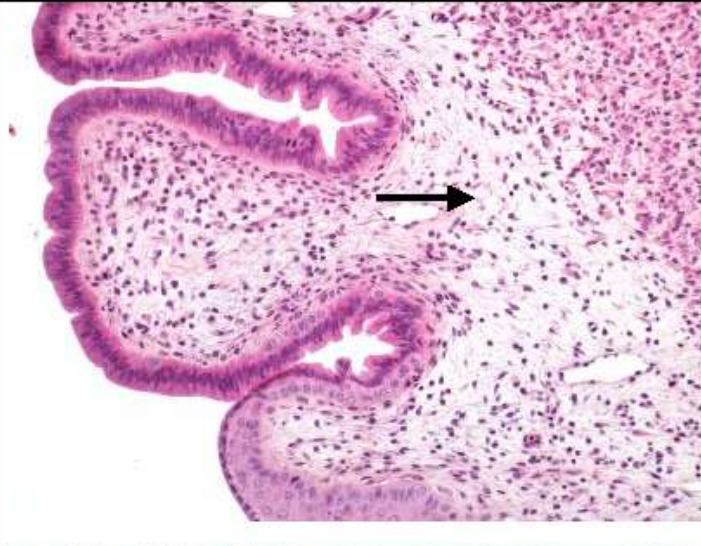
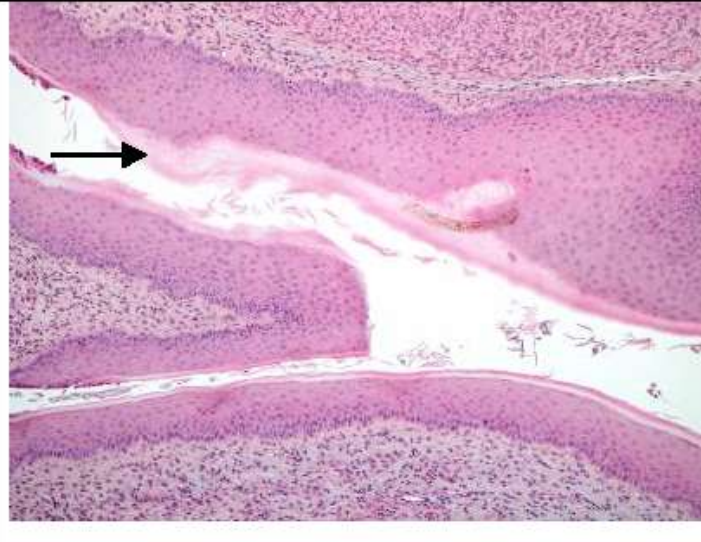
<p>Souris N° 1, 101464</p> <p>Glande de Harder, dépôts conjonctifs de porphyrine (HES x 400)</p>	 <p>A histological micrograph of a Harder's gland from mouse 101464. The image shows glandular acini with a pinkish-purple hue. A black arrow points to a cluster of dark, granular deposits within the connective tissue stroma, identified as porphyrin deposits.</p>
<p>Souris N° 1, 101464</p> <p>Foie, hépatocytes binucléés, caryomégalie et stéatose microvacuolaire (HES x 400)</p>	 <p>A histological micrograph of liver tissue from mouse 101464. The image displays hepatocytes with several binucleated cells and enlarged nuclei (karyomegalia). Two black arrows point to these specific cellular features. The cytoplasm of the hepatocytes contains small, clear vacuoles, characteristic of microvacuolar steatosis.</p>
<p>Souris N° 3, 101465</p> <p>Epididyme, cellule géante dans les canaux épидидymaires (HES x 200)</p>	 <p>A histological micrograph of the epididymis from mouse 101465. The image shows the epididymal ducts lined by a simple cuboidal epithelium. A black arrow points to a large, multinucleated cell (giant cell) located within the lumen of one of the ducts.</p>

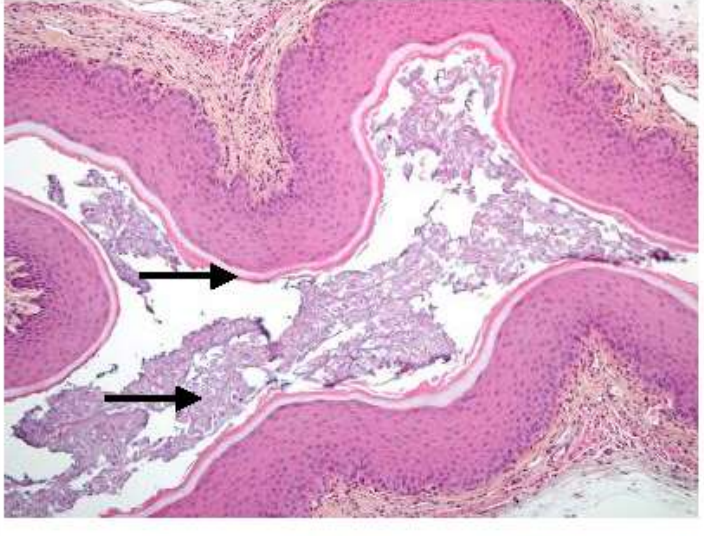
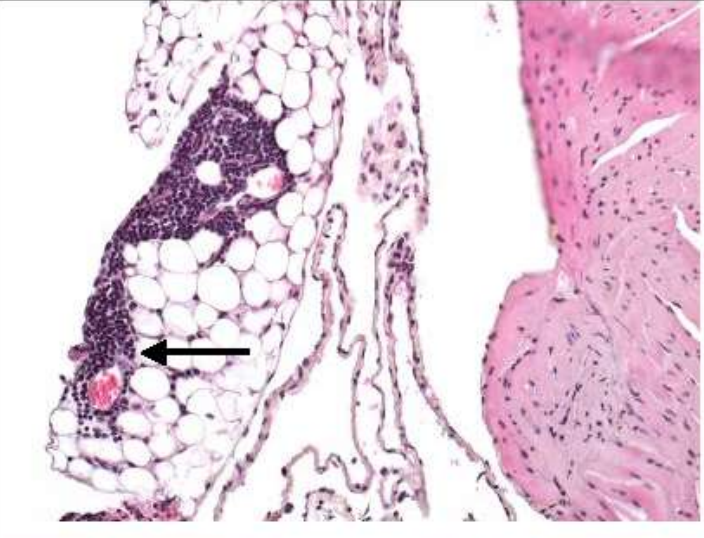
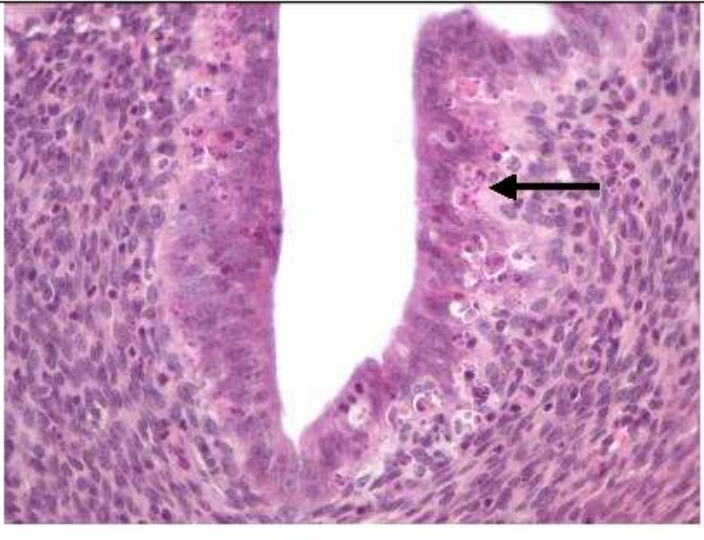
<p>Souris N° 3, 101465</p> <p>Rate, hémossidérose diffuse (HES x 100)</p>	
<p>Souris N°4, 101467</p> <p>Encéphale, légères hémorragies méningées, focales, récentes (HES, x 100)</p>	
<p>Souris N°5, 101468</p> <p>Pancréas, caryomégalie des cellules acineuses (HES, x 400)</p>	

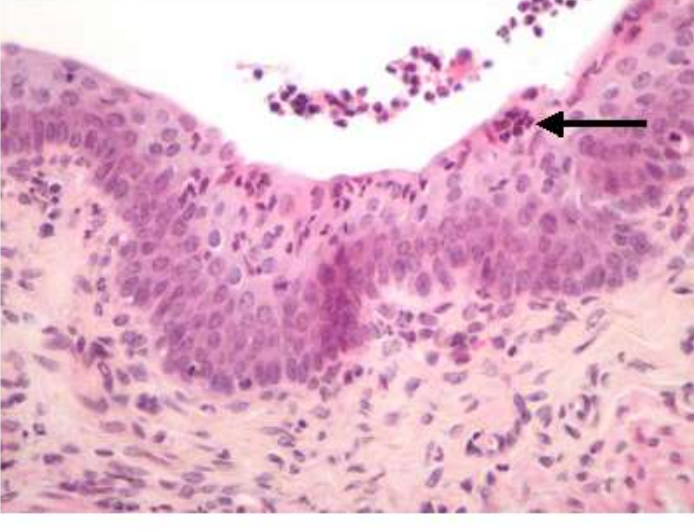
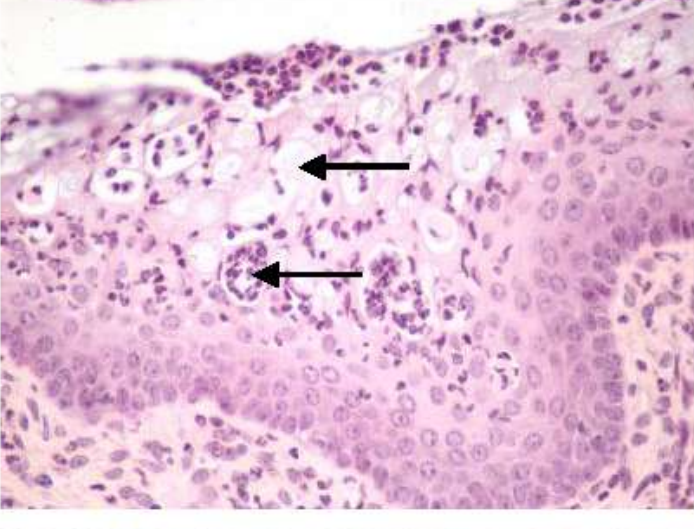

<p>Souris N°5, 101468</p> <p>Foie, inclusion cytoplasmique intranucléaires et atypies cellulaires (cytomégalie, caryomégalie) (HES, x 400)</p>	
<p>Souris N°6, 101469</p> <p>Testicule, atrophie des tubes séminifères, (HES, x 100)</p>	
<p>Souris N°6, 101469</p> <p>Foie, foyer de myélopoïèse extramédullaire, (HES, x 400)</p>	

<p>Souris N°7, 101470</p> <p>Foie, inclusion cytoplasmique intranucléaire, (HES, x 400)</p>	 <p>A high-magnification micrograph of liver tissue stained with HES. The image shows numerous hepatocytes with prominent nuclei. A black arrow points to a specific nucleus containing a small, dark, cytoplasmic inclusion body.</p>
<p>Souris N°10, 101473</p> <p>Cœur, hyalinisation des cardiomyocytes, (HES, x 200)</p>	 <p>A micrograph of heart tissue stained with HES. The image shows a dense field of pink-stained muscle fibers. A black arrow points to a region where the normal striated structure of the cardiomyocytes is replaced by a more homogeneous, eosinophilic (pink) material, indicating hyaline degeneration.</p>
<p>Souris N°11, 101474</p> <p>Poumon, hémorragies pulmonaires interstitielles (HES, x 100)</p>	 <p>A low-magnification micrograph of lung tissue stained with HES. The image shows a complex network of alveolar spaces and interstitial tissue. A black arrow points to a region where the interstitial space is filled with a dense accumulation of red-stained material, representing interstitial hemorrhages.</p>

<p>Souris N°12, 101475</p> <p>Langue, lipomatose des muscles linguaux (HES, x 100)</p>	 <p>A histological section of mouse tongue muscle stained with HES. The image shows a dense field of pink muscle fibers with numerous small, white, lipid-laden cells interspersed throughout. A black arrow points to one of these lipid-laden cells.</p>
<p>Souris N°14, 101477</p> <p>Thymus, nombreux macrophages à corps tingibles (HES, x 100)</p>	 <p>A histological section of mouse thymus stained with HES. The image shows a dense population of small, dark-staining lymphocytes. Several larger, pale-staining cells with foamy or vacuolated cytoplasm are visible, which are macrophages containing tingibile bodies. Three black arrows point to these macrophages.</p>
<p>Souris N°16, 101479</p> <p>Cœur, cellules de l'endothélium vasculaire pigmentées (HES, x 400)</p>	 <p>A high-magnification histological section of mouse heart endothelium stained with HES. The image shows the inner lining of a blood vessel, characterized by a single layer of cells. Some of these cells are darkly pigmented. A black arrow points to one of these pigmented endothelial cells.</p>

<p>Souris N°16, 101479</p> <p>Utérus, infiltrat neutrophilique dans le chorion (HES, x 400)</p>	 A high-magnification histological section of a mouse uterus stained with HES. The chorion is visible, showing a dense infiltrate of neutrophils. Two black arrows point to the infiltrate.
<p>Souris N°16, 101479</p> <p>Utérus, léger œdème du chorion (HES, x 200)</p>	 A lower magnification histological section of a mouse uterus stained with HES. The chorion shows signs of edema. A black arrow points to the edematous area.
<p>Souris N°16, 101479</p> <p>Vagin, kératinisation marquée de l'épithélium (HES, x 100)</p>	 A low-magnification histological section of a mouse vagina stained with HES. The epithelium shows marked keratinization. A black arrow points to the keratinized layer.

<p>Souris N°17, 101480</p> <p>Vagin, kératinisation marquée de l'épithélium et sécrétion mucoïde intraluminaire (HES, x 100)</p>	 <p>This micrograph shows a cross-section of the mouse vagina. The epithelium is thick and pink-stained, indicating keratinization. The lumen contains a clear, mucoid secretion. Two black arrows point to the mucoid secretion within the lumen.</p>
<p>Souris N°17, 101480</p> <p>Cœur, infiltrat lymphoplasmocytaire périvasculaire péricardique (HES, x 400)</p>	 <p>This micrograph shows a section of the mouse heart. There is a dense, dark-stained infiltrate of lymphoplasmocytic cells surrounding the blood vessels in the pericardium. A black arrow points to this infiltrate.</p>
<p>Souris N°18, 101481</p> <p>Utérus, granulocytes neutrophiles pycnotiques, caryorrhétiques sous-épithéliaux (HES, x 400)</p>	 <p>This micrograph shows a section of the mouse uterus. There are numerous neutrophilic granulocytes with pycnotic and karyorrhectic nuclei located beneath the epithelium. A black arrow points to one of these cells.</p>

<p>Souris N°22, 101485</p> <p>Utérus, exocytose neutrophilique transépithéliale marquée (HES, x 400)</p>	 <p>A high-magnification histological section of the uterine epithelium. The surface is covered by a layer of cells, and a black arrow points to a cluster of neutrophils that have migrated through the epithelial layer, a process known as trans-epithelial exocytosis.</p>
<p>Souris N°23, 101486</p> <p>Vagin, ballonnisation des cellules épithéiales et exocytose marquée de granulocytes neutrophiles (HES, x 200)</p>	 <p>A histological section of the vaginal epithelium. The epithelial cells are significantly swollen (ballooning). Two black arrows point to neutrophils that have exocytosed from the epithelial layer into the underlying tissue.</p>
<p>Souris N°25, 101488</p> <p>Vagin, kératinisation diffuse marquée (HES, x 200)</p>	 <p>A histological section of the vagina showing a thickened epithelium with a prominent, diffuse layer of keratinization. A black arrow points to this keratinized layer.</p>

Souris N°25, 101488

Utérus, nombreuses mitoses
de l'épithélium (HES, x
400)



RESUMÉ

Les progrès des traitements immunosuppresseurs ont conduit à des améliorations de la survie du greffon en transplantation rénale, mais ces traitements sont responsables d'effets secondaires majeurs conduisant à la dysfonction chronique de l'organe et à son rejet. Un des objectifs actuels en transplantation est donc d'induire une tolérance à long terme du greffon sans immunosuppression. Nous avons accès à une cohorte de patients présentant ce profil, et leur caractérisation par typage pangénomique peut permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs afin de déterminer les patients sous traitement présentant ce profil de tolérance et étant à même de subir une diminution ou un sevrage du traitement. Dans cette optique, l'étude de Brouard et al. en 2007 a défini un groupe de 49 gènes présents dans le sang et prédictifs de l'état de tolérance opérationnelle. Parmi ces gènes, nous nous sommes intéressés à la molécule SMILE ou TMTC3, surexprimée dans le sang des patients tolérants, et dont la fonction est à ce jour inconnue. Nous avons pu montrer que l'absence de SMILE entraînait une diminution de l'activité du protéasome et du catabolisme protéique. Ceci est à l'origine d'une hypertrophie du réticulum endoplasmique (RE) suggérant un état de stress de la cellule. De plus, l'absence de SMILE conjuguée à un inhibiteur du protéasome appelé Bortezomib® sensibilise de manière plus importante les cellules au stress du RE et augmente l'expression des transcrits d'XBP1, une molécule directement impliquée dans la réponse aux protéines mal repliées. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de travail dans le contexte de la compréhension de la tolérance à l'allogreffe.

Mots clés: transplantation rénale, tolérance opérationnelle, typage transcriptomique, biomarqueur, stress du réticulum endoplasmique, réponse aux protéines mal repliées

Advances in immunosuppression treatments have led to improvements of graft survival in renal transplantation, but these long-term treatments are associated with major side-effects responsible for chronic dysfunction and rejection of the allograft. A current therapeutic goal in transplantation is thus to induce a long-term tolerance to the allograft without the need for immunosuppression. We have access to a patient cohort displaying this profile, and their characterization by transcriptomic profiling could allow to identify diagnostic or prognostic biomarkers in order to determine, among immunosuppressed patients, which ones display this type of profile and could be weaned off immunosuppression. For this purpose, a study by Brouard et al. in 2007 defined a set of 49 genes predictive of the operational tolerance state, and among these 49 genes we chose to study the molecular function of the SMILE molecule (TMTC3), overexpressed in the blood of operationally tolerant patients and whose function is still unknown. We showed that SMILE down-regulation triggers a decrease in proteasome activity and in transcripts involved in protein catabolism. These phenomenons induce an endoplasmic reticulum (ER) hypertrophy, suggesting a stress state of the cell. Moreover, the lack of SMILE together with a proteasome inhibitor treatment called Bortezomib® sensitizes cells to ER stress and increases transcript expression of XBP1, a molecule directly involved in unfolded protein responses. These results on this unknown molecule open new perspectives of work in the context of graft tolerance understanding.

Keywords: renal transplantation, operational tolerance, transcriptomic profiling, biomarker, endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response