

**Université de Nantes**

**Faculté de Médecine**

# **Induction de Lymphocytes T Régulateurs humains par activation de la voie Notch**

## **THESE DE DOCTORAT**

Ecole doctorale CHIMIE BIOLOGIE  
Discipline BIOLOGIE  
Spécialité IMMUNOLOGIE  
Présentée

et soutenue publiquement par

**VIGOUROUX Stéphane**

Le 29 Mars 2007, devant le jury ci-dessous

Président : M. MOULLIER Philippe

Rapporteurs : M. SEMANA Gilbert

M. VIE Henri

Mme TAYLOR Naomi

Examinateurs : M. AVET LOISEAU Hervé

M. GUILLET Benoit

Directeur de thèse : M. MOULLIER Philippe

# RESUME

Les lymphocytes T régulateurs (LTR) sont des cellules immuno-suppressives intervenant dans la régulation de la tolérance périphérique. Bien que ces cellules furent initialement décrites en 1971, ce n'est qu'en 1995 qu'un premier phénotype est décrit: les LTR CD4+CD25+ qui sont des cellules naturellement présentes dans le sang périphérique. L'utilisation potentielle de ces cellules dans les domaines de l'alloréactivité et de l'autoimmunité s'est rapidement heurtée à leur faible nombre, leur faible capacité de prolifération et leur manque de spécificité antigénique. Afin de contourner ces obstacles, certaines équipes ont réussi à induire des LTR lors de présentations antigéniques, permettant ainsi d'obtenir des cellules plus nombreuses avec une spécificité antigénique connue.

Notch est une famille de récepteurs transmembranaires exprimés à la surface de l'ensemble des lymphocytes. Notch joue un rôle important dans la différenciation de la lymphopoïèse. L'activation de Notch est secondaire à la liaison avec son ligand Jagged1.

Nous avons démontré dans 2 modèles de stimulation antigénique *in vitro* (stimulation virale et allogénique) que la surexpression de Jagged1 sur des lymphocytes B humains transformés par l'Epstein Barr virus (EBV) utilisées comme cellules présentatrices d'antigènes et mises en culture avec des lymphocytes T humains permettait l'induction de LTR spécifiques de l'EBV dans le premier modèle et des alloantigènes dans le second. Ces résultats démontrent que l'activation forcée de Notch lors d'une présentation antigénique permet l'induction de LTR spécifiques d'antigènes et ajoutent donc au rôle de Notch dans la lymphopoïèse un rôle possible dans la régulation du système immunitaire périphérique.

# SOMMAIRE

## I - Les lymphocytes T régulateurs

A - Introduction	8
B - La découverte des Lymphocytes T régulateurs	10
C - Les Lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+	12
D - Les lymphocytes T régulateurs induits	15
E - Quelques définitions	16
F - Les stratégies d'induction des lymphocytes T régulateurs	18
F - 1 / Présentation antigénique au sein d'un tissu muqueux (oral, trachéal, nasal) ou cutané	20
F - 2 / Costimulation sous-optimale lors de la présentation antigénique	22
F - 3 / Signal positif résultant d'une interaction ligand-récepteur	28
F - 4 / Signal positif résultant de l'action d'une cytokine	30
G - Bases moléculaires et cellulaires de la spécificité antigénique des Lymphocytes T Régulateurs induits	34
H - Mécanismes d'action des Lymphocytes T Régulateurs Induits	40

## **II / La voie Notch**

A - Description de la voie Notch	43
B - Propriétés de la voie Notch	49
B - 1 / Propriétés physiologiques	49
B - 1 - 1 / Embryogenèse du système nerveux	49
B - 1 - 2 / Hématopoïèse	49
B - 1 - 3 / Système immunitaire	50
B - 2 / Propriétés pathologiques	52

## **III / Hypothèse de travail**

54

## **IV / Inscription de ce travail au sein de l'activité générale du laboratoire**

56

## **V / Résultats**

59

A / Résultats communs aux 2 articles originaux (1 et 2)	60
B / Article 1	63
C / Discussion de l'article 1	73
D / Article 2	77
E / Discussion de l'article 2	85

F / Article 3 89

G / Discussion de l'article 3 98

**VI / Conclusion et perspectives** 99

**VII / Références** 104

## Liste des abréviations

Ad5 : adénovirus type 5

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

CD : cellule dendritique

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

CTL : lymphocyte T cytotoxique

EBV : virus d'Epstein-Barr

GM-CSF : *granulocytes monocytes cell stimulating factor*

GFP : *green fluorescent protein*

GvHD : graft-versus-host disease

IFN : interferon

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

kDA : kiloDalton

LCL : lymphoblastoid cell line

MOI : multiplicité d'infection

pfu : *particules forming units*

PBMC : *peripheral blood mononuclear cells*

PCR : *polymerase chain reaction*

RT-PCR : *reverse transcriptase PCR*

TCR : récepteur des lymphocytes T

TGF- $\beta$  : *transforming growth factor  $\beta$*

## Liste des Tableaux et Figures

**Tableau 1:** Les récepteurs Notch et leurs ligands chez les drosophiles et les mammifères. (p43)

**Figure 1:** L'induction de lymphocytes T régulateurs spécifique d'un antigène. (p18)

**Figure 2a:** Cellules T régulatrices spécifiques d'antigènes: bases cellulaires et moléculaires de la spécificité antigénique. (p34)

**Figure 2b:** Reconnaissance spécifique des lymphocyte T CD8+ effecteurs par les LTR. (p35)

**Figure 3:** Lymphocytes T régulateurs induits : 3 mécanismes de suppression (p39).

**Figure 4:** Les récepteurs Notch et leurs ligands chez les mammifères. (p44)

**Figure 5:** Mécanismes moléculaires intra-cellulaires de la voie de signalisation Notch. (p46)

**Figure 6:** Organigramme présentant l'ensemble des projets de recherche du laboratoire. (p57)

**Figure 7** Transduction de LCL-EBV par l'Ad5/F35 Jagged-1 avec activation secondaire de la voie de signalisation Notch dans les lymphocytes T. (p60-61)

## **I / Les lymphocytes T régulateurs**

### **A / Introduction**

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du milieu intérieur par la détection, la destruction et l'élimination des agents infectieux pathogènes. Ces fonctions sont assurées par une réaction immunitaire que l'on divise classiquement en 2 phases (Abbas AK et Lichtman AH, 2003). La première est une réponse immunitaire innée, non spécifique, précoce car survenant dans les premières heures. Elle repose sur les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes « Natural Killer » et le système du complément. La deuxième phase est une réponse adaptative, spécifique et plus tardive, reposant sur les lymphocytes B et T. La spécificité de la réponse adaptative repose sur les récepteurs d'antigènes exprimés à la surface des lymphocytes B (les immunoglobulines) et des lymphocytes T (les TCR) car chaque récepteur a une affinité pour un antigène donné.

Afin d'assurer une homéostasie harmonieuse, la réponse immunitaire doit cependant être contrôlée dans son intensité et sa durée. Il faut en effet éviter qu'elle ne menace l'intégrité des tissus voisins de l'infection, voire l'organisme en entier. Ce contrôle de la réponse immunitaire aussi appelé tolérance immunologique repose sur la reconnaissance spécifique des antigènes à épargner par les lymphocytes. Les mécanismes de tolérance sont centraux et périphériques. La tolérance centrale repose sur la reconnaissance d'auto-antigènes par les lymphocytes immatures dans la moelle osseuse (pour les lymphocytes B) ou le thymus (pour les lymphocytes T). Cette reconnaissance entraîne l'apoptose des lymphocytes auto-réactifs. L'absence

de réponse immunitaire contre les auto-antigènes absents du thymus et de la moelle osseuse est assurée par la tolérance périphérique. Elle repose sur la reconnaissance des antigènes en l'absence de signaux de costimulation adaptés ou sur une reconnaissance anormalement persistante et répétée. La tolérance périphérique entraîne l'apoptose ou l'anergie des lymphocytes matures ainsi stimulés. Un dernier mécanisme de tolérance périphérique repose sur un sous-type de lymphocytes dont la fonction a été plus récemment mise en évidence: les lymphocytes T suppresseurs ou régulateurs. Ce mécanisme se différencie de tous les autres par la propriété fondamentale de transférer la tolérance, par exemple d'un animal à l'autre. Il s'agit donc d'un mécanisme « actif ». C'est certainement le mécanisme de tolérance le plus complexe, le moins connu, et celui dont le fonctionnement fait actuellement l'objet de travaux de recherche en immunologie.

## B / La découverte des Lymphocytes T régulateurs

La première démonstration de l'existence de cellules immuno-suppressives fut apportée en 1971 par Gershon RK et Kondo K dans un modèle expérimental murin. Cette démonstration fut menée en 2 étapes. Une première étape a consisté à tolérer des souris pour des hématies de mouton. Le protocole d'induction de tolérance comprenait une thymectomie, une irradiation à doses léthales, puis une allogreffe de molle osseuse avec réinjection de thymocytes suivie d'injections répétées d'hématies de mouton pendant 1 mois. La deuxième étape fut de montrer que la tolérance immunologique ainsi obtenue était transférable par l'injection de cellules spléniques de souris tolérées à des animaux naïfs. Les auteurs ont montré que la tolérance était spécifique des hématies de mouton puisque la réponse immunitaire contre des hématies de cheval n'était pas abolie. Ce travail ancien est tout à fait remarquable puisqu'il démontre non seulement l'existence de cellules lymphoïdes immuno-suppressives mais également leur spécificité antigénique. Le phénotype lymphocytaire T des cellules immuno-suppressives sera démontré dans les années suivant cette découverte (Asherson GL et Zembala M, 1976 ; Pierce CW et Kapp JA, 1980).

Malgré la qualité de ces travaux initiaux, un certain nombre de questions firent douter quelques immunologistes de l'existence des lymphocytes T régulateurs (LTR). En effet, certains modèles expérimentaux démontrant l'existence des LTR étaient peu reproductibles, probablement en raison de leur grande complexité. Ainsi un article publié en 1988 dans le « Scandinavian Journal of Immunology » par Goran Muller s'intitule-t-il de manière provocatrice: « Les cellules T suppressives existent-

elles ? ». Les doutes exposés dans cet article peuvent se résumer en 3 points. Premièrement, les expériences initiales n'avaient pas pu décrire de marqueurs de surface permettant de caractériser phénotypiquement les LTR. Aucune population « pure » de LTR n'avait ainsi jamais pu être isolée. Deuxièmement, le mécanisme d'action des LTR supposé dans les expériences initiales reposait sur la sécrétion d'une substance soluble immunosuppressive « I-J » dont la production dépendait du gène murin I-J. Ce gène avait été localisé dans les années 70 de manière approximative au sein du Complexe Majeur d'Histocompatibilité I murin. Malheureusement, lorsque les techniques de séquençages de l'ADN devinrent disponibles au début des années 80, il fut impossible de démontrer l'existence du gène I-J (Steinmetz M et al, 1982). Il apparaissait donc que le facteur I-J n'existe pas, jetant ainsi dans la communauté scientifique de sérieux doutes sur l'existence des cellules immunosuppressives. Enfin, un troisième argument fut l'impossibilité de démontrer l'existence de réarrangements fonctionnels des gènes du TCR (Kronenberg M et al, 1985). Cependant, malgré la validité de ces arguments, certaines observations expérimentales demeuraient difficiles à expliquer sans l'existence de cellules immunosuppressives. C'est pourquoi l'absence de preuves indiscutables de l'existence des LTR (absence de marqueurs spécifiques de surface, de gène I-J et de réarrangements fonctionnels du TCR) n'apportait pas définitivement la preuve de l'inexistence de ces cellules comme cela fut élégamment discuté par Janeway CR en 1988 dans un article répondant à celui de Moller dans le même journal. Les incertitudes persistèrent jusque dans les années 90 où furent pour la première fois caractérisés phénotypiquement des LTR: les lymphocytes T CD4+CD25+.

## C / Les Lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+

Malgré les doutes des années 70 et 80, certains immunologistes ont poursuivi leurs travaux de recherche sur les LTR, persuadés non seulement de l'intérêt fondamental mais aussi des nombreuses applications thérapeutiques potentielles dans les vastes domaines de l'auto-immunité, de l'allergie et de la transplantation d'organes ou de moelle osseuse. C'est ainsi qu'en 1995, Sakaguchi S et al ont décrit pour la première fois un phénotype de LTR: les lymphocytes T CD4+CD25+. Ce travail a en effet démontré dans un modèle murin que l'injection de lymphocytes T CD4+ déplétés de la fraction CD25+ provoquait l'apparition de nombreuses manifestations auto-immunes (telle que thyroïdite, gastrite, diabète, arthrite). De manière intéressante, l'injection simultanée de lymphocytes T CD4+CD25+ permettait de prévenir l'apparition de ces manifestations avec un effet bénéfique dépendant du nombre de cellules injectées. Les auteurs ont également démontré les propriétés immnosuppressives des lymphocytes T CD4+CD25+ dans le domaine de l'alloréactivité avec un effet bénéfique sur la survie de greffons cutanés murins. Collectivement, ces résultats démontrent donc que les lymphocytes T CD4+CD25+ peuvent inhiber les réactions immunitaires dirigées contre les auto-antigènes et les allo-antigènes. Depuis cet article originel, de nombreux travaux ont confirmé chez le rongeur et chez l'homme l'existence de LTR CD4+CD25+ naturellement présents dans le sang circulant et jouant un rôle essentiel dans le contrôle des lymphocytes T périphériques autoréactifs. La propriété pour ces cellules de transférer la tolérance *in vitro* d'une culture cellulaire à l'autre ou *in vivo* d'un animal à l'autre les distingue des autres mécanismes de tolérance périphérique telle que l'anergie (Schwartz RH,

1996), la déplétion (Miller JF et Basten A, 1996) ou l'ignorance immunologique (Zinkemagel RM et al, 1997).

Les LTR CD4+CD25+ se différencient dans le thymus (Sun Y et al, 2006). Les autres caractéristiques comprennent une faible capacité de prolifération après stimulation allogénique ou polyclonale, une inhibition non spécifique des réponses lymphocytaires T CD4+CD25- et T CD8+ avec un effet inhibiteur d'autant plus marqué que le nombre de LTR CD4+CD25+ est important (effet dose-dépendant ; Thornton AM et Shevach EM, 2000). De plus, l'immunosuppression nécessite un contact cellulaire étroit avec les cellules cibles qui peuvent être des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et/ou des lymphocytes (Dieckmann D et al, 2001 ; Jonuleit H et al, 2001 ; Piccirillo CA et Shevach EM, 2001). Précisons qu'au-delà de la démonstration de la nécessité de ce contact cellulaire, aucun mécanisme d'action moléculaire précis n'a pu être démontré. Les cellules T CD4+CD25+ expriment à leur surface de plus grandes quantités de molécules CD45RO, CD62-Ligand, et CTLA-4 que les cellules CD4+CD25-, sans qu'aucun rôle fonctionnel n'ait pu jusqu'à présent être attribué à l'une ou l'autre de ces molécules (Fu S et al, 2004). Des travaux ultérieurs ont affiné le phénotype en démontrant l'expression de surface du récepteur GITNF-R (Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor ; Shimizu J et al, 2002 ; Mc Hugh RS et al, 2002) et de Foxp3 (Fontenot JD et al, 2003 ; Hori S et al, 2003). Il est intéressant de souligner que ces travaux ont attribué à GITNF-R et à Foxp3 un rôle fonctionnel puisque leur blocage abolissait les propriétés immunsuppressives. De plus, on sait maintenant qu'il est possible de dériver des LTR à partir de lymphocytes T CD4+CD25- par transfert du gène Foxp3 (Chai JG,

2005) ou par activation directe de la molécule (Hong J et al, 2005). Foxp3 semble donc jouer un rôle fonctionnel majeur dans la physiologie des LTR CD4+CD25+.

Malgré ces progrès substantiels dans la connaissance des LTR CD4+CD25+, certains obstacles apparaissaient sur la voie d'une potentielle utilisation thérapeutique de ces cellules. Le faible pourcentage de LTR CD4+CD25+ au sein de la population lymphocytaire T ainsi que l'immunosuppression non spécifique de ces cellules font partie de ces obstacles et ont motivé de nombreux travaux de recherche pour tenter d'induire des LTR porteurs d'un phénotype moins restreint et d'une spécificité antigénique connue.

## D / Les lymphocytes T régulateurs induits

Il est donc rapidement apparu que l'utilisation thérapeutique des LTR CD4+CD25+ poserait un certain nombre de problèmes. Outre le faible nombre de ces cellules qui ne représentent chez l'homme que 5 à 10% des lymphocytes T CD4+, il a été démontré que la fonction immunosuppressive résidait seulement dans la fraction des cellules exprimant fortement le CD25 (Baecher-Allan C, 2001), ce qui réduit d'autant le nombre des cellules inhibitrices. De plus, il faut souligner les faibles capacités prolifératives de ces cellules qui ajoutent encore à la difficulté. Une autre limite importante est l'absence de spécificité antigénique reconnue (Thornton AM et Shevach EM, 2000). Il apparaît en effet difficile d'envisager l'utilisation thérapeutique chez l'homme de cellules immunsuppressives non spécifiques ou porteuses de nombreuses spécificités antigéniques non déterminées.

Afin de contourner ces obstacles, certaines équipes ont orienté leur travaux de recherche pour induire des LTR en présence d'un antigène avec le double objectif d'obtenir un plus grand nombre de LTR et surtout des LTR spécifiques de l'antigène présenté lors de l'induction. Des résultats encourageants ont effectivement prouvé qu'il était possible d'induire des LTR caractérisés par un phénotype non restreint et une spécificité antigénique donnée. Nous allons maintenant exposer les connaissances acquises dans ce domaine en insistant sur les stratégies d'induction, la spécificité antigénique et le mécanisme d'action de ces cellules. Nous allons avant cela préciser quelques définitions générales relatives aux LTR.

## E / Quelques définitions

Il n'y a à ce jour pas de terminologie consensuelle pour désigner les cellules régulatrices. Le terme « suppresseur » fut l'un des premiers historiquement utilisé dans l'article de Gershon RK et Kondo K en 1971. Le terme « régulateur », plus récent est celui actuellement préféré peut-être en raison des années de scepticisme entourant la description initiale de ces cellules. Les termes actuellement les plus usités sont « cellules T régulatrices » ou « lymphocytes T régulateurs ».

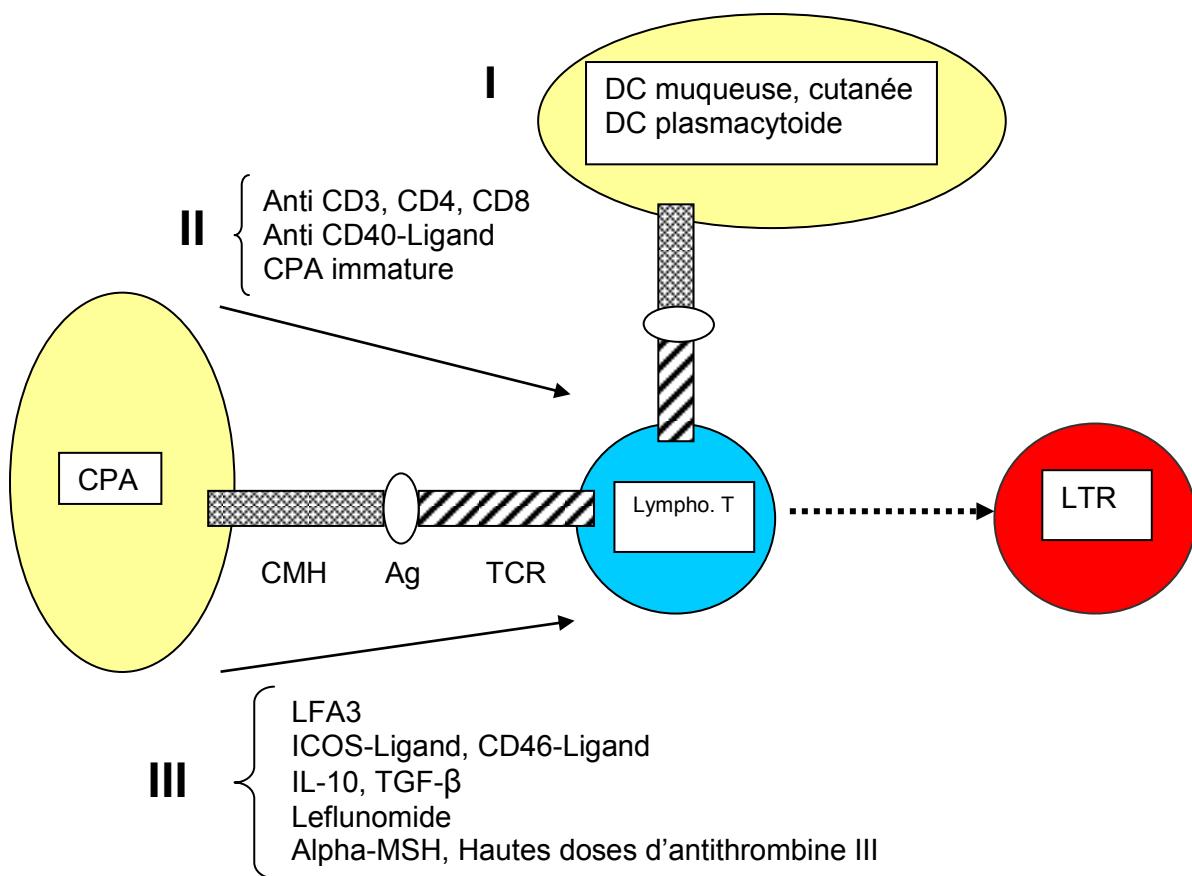
La propriété fondamentale d'un LTR est sa capacité à transférer l'inhibition d'une réponse immunitaire. Dans la définition des LTR, le phénotype (marqueurs de surface) et le type de cytokines sécrétées restent encore des indicateurs moins clairs et plus controversés. L'inhibition de la réponse immunitaire est communément évaluée *in vitro* par l'inhibition de la prolifération et/ou de la cytotoxicité. *In vivo*, c'est l'inhibition des manifestations auto-immunes, allergiques ou des rejets d'organes qui est le plus souvent évaluée. Les LTR naturellement présents dans le sang périphérique et sans spécificité antigénique sont caractérisés par le phénotype T CD4+CD25+. Au contraire, les LTR induits *in vitro* ou *in vivo* lors d'une présentation antigénique ont un phénotype beaucoup moins restreint puisqu'ils peuvent être CD4+CD25+ (Belghith M et al, 2003 ; Manhke K et al, 2003 ; Walker MR et al, 2005) mais aussi CD4+CD25- (Graca L et al, J Immunol., 2002 ; Unger WW et al, 2003), CD8+ (Gilliet M et Liu YJ, 2002 ; Dhodapkar MV et Steinman RM, 2002 ; Xystrakis E et al, 2004 ; Rifa'i M et al, 2004), CD8+CD28- (Liu Z et al, 1998) ou même CD4-CD8- (Zhang ZX et al, 2000 ; Fischer K et al, 2005). Cette hétérogénéité phénotypique

réflète probablement les multiples voies d'induction possibles des LTR ainsi que leur différents modes de contrôle de la réponse immunitaire.

## F / Les stratégies d'induction des lymphocytes T régulateurs

Les stratégies d'induction des LTR sont très variées. Elles peuvent être réparties en 3 groupes. Une première stratégie consiste à présenter l'antigène à tolérer au sein de tissus porteurs de propriétés « tolérigenes » comme les muqueuses (orale, trachéale, nasale) ou la peau. Une deuxième stratégie est la stimulation antigénique en l'absence de signaux de costimulation adéquats. Enfin, une troisième stratégie possible est l'utilisation au moment de la présentation antigénique d'un signal supplémentaire résultant d'une interaction ligand-récepteur ou de l'action d'une cytokine.

Ces 3 stratégies sont schématisées sur la Figure 1 de la page suivante. Nous allons maintenant exposer les données expérimentales démontrant chacune de ces stratégies.



**Figure 1 : L'induction de lymphocytes T régulateurs spécifiques d'un antigène.**

Trois stratégies peuvent être distinguées :

**I /** Présentation antigénique par des cellules dendritiques (CD) spécifiquement dédiées à l'induction de lymphocytes T régulateurs (LTR): CD cutanée, muqueuse ou CD plasmacytoïde. Les mécanismes moléculaires soutenant les propriétés tolérigenes de ces cellules dendritiques sont inconnues.

**II /** Présentation antigénique par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) avec une costimulation sous-optimale obtenue par des anticorps monoclonaux bloquants anti-CD3, CD4, CD8 ou CD40-Ligand ou des CPA immatures n'exprimant pas suffisamment de molécules de costimulation.

**III /** Présentation antigénique par des CPA matures mais avec un signal additionnel « régulateur » fourni soit par des molécules de surface telles que LFA-3, ICOS-Ligand, CD46-Ligand ou des facteurs solubles tels que IL-10, TGF-β, leflunomide, α-MSH (hormone stimulante des mélanocytes), ou de fortes doses d'antithrombine III.

## F-1 / Présentation antigénique au sein d'un tissu muqueux (oral, trachéal, nasal) ou cutané

Une présentation antigénique au sein de la muqueuse digestive est un mécanisme bien connu d'induction de tolérance. L'importance physiologique de ce phénomène réside probablement dans la nécessité de prévenir toute réaction immunologique délétère contre des antigènes alimentaires ou bactériens présents dans le tube digestif (Weiner HL, 2001 ; Sosroseno W et al, 2003). Il a été démontré que la dose d'antigène introduit par voie orale influait sur le mécanisme de tolérance. En effet, de faibles doses entraînent l'induction de LTR tandis que de fortes doses induisent une anergie clonale ou une délétion des lymphocytes réactifs. Plusieurs travaux dans des modèles murins auto-immuns ont montré que l'administration de faibles doses d'un auto-antigène par voie orale permet l'induction de LTR spécifiques de l'antigène. Ces LTR sont de type « TH3 » par opposition aux lymphocytes TH1 et TH2. Ces LTR TH3, CD4+ ou CD8+ sont caractérisés par une sécrétion importante de TGF- $\beta$  (Ploix C et al, 1999 ; Zhang X et al, 2001 ; Weiner HL, 2001). La sécrétion de TGF- $\beta$  dans ce contexte apparaît plus comme un marqueur des cellules TH3 car sa contribution à l'immunosuppression demeure incertaine.

De manière comparable, l'administration d'insuline humaine par voie orale (Bergerot I et al, 1994) ou par aérosol (Harrison LC et al, 1996) à des souris NOD (non obese diabetic) entraîne l'induction de LTR respectivement CD4+ et CD8+, qui inhibent la réponse immunitaire contre l'insuline lorsque celle-ci est secondairement introduite par une voie immunostimulante. L'introduction seulement de l'ADN de l'insuline par voie nasale chez la souris NOD produit les mêmes effets (Every et al,

2006). Dans un modèle murin d'encéphalomyélite allergique, l'administration sous-cutanée de l'allergène induit des LTR CD4+ spécifiques de l'antigène exerçant une immunosuppression par un mécanisme nécessitant un contact cellulaire entre les LTR et les cellules cibles (Bynoe MS et al, 2003).

La tolérisation d'allo-antigènes peut également être obtenue par cette stratégie. En effet, l'introduction orale d'allo-antigènes chez des rats permet l'induction de LTR CD8+ que l'on retrouve localisés préférentiellement au sein des greffons rénaux allogéniques. Lorsque ces LTR sont secondairement injectés à des animaux naïfs, un prolongement de la survie des greffons est observé (Zhou J et al, 2001). De la même manière, la délivrance intra-trachéale de splénocytes allogéniques (Akiyama Y et al, Transplantation, 2002) ou de peptides allogéniques (Akiyama Y et al, Hum Immunol., 2002) prolonge la survie de greffons cardiaques par induction de LTR allospécifiques sécrétant de l'IL-4 et de l'IL-10. Les propriétés inhibitrices des LTR ainsi induits peuvent être augmentées par des anticorps bloquants la voie CD40-CD40-Ligand, permettant alors d'obtenir une survie indéfinie des greffons cardiaques (Uchida N et al, 2003).

En résumé, l'ensemble de ces travaux montre que les muqueuses digestive, nasale et trachéale ainsi que la peau fournissent un environnement favorisant l'induction de LTR. Les voies d'introduction de l'antigène ainsi que les phénotypes des LTR sont spécifiques à chaque modèle expérimental, soulignant ainsi la complexité de l'induction des LTR. Il convient également de souligner que le mécanisme précis d'induction (sous-populations spécifiques de cellules dendritiques et/ou cytokines particulières) reste pour l'instant inconnu.

## F-2 / Costimulation sous-optimale lors de la présentation antigénique

Lorsqu'un lymphocyte T reconnaît son antigène spécifique présenté par une CPA, plusieurs signaux de costimulation assurent une stabilité de la présentation antigénique ainsi qu'une activation et une expansion clonale optimales. Ces signaux résultent d'interactions entre ligands et récepteurs.

La molécule de surface CD3 est composée de 3 protéines ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) associées avec l'hétérodimère TCR $\alpha\beta$ . Elle permet une liaison optimale du TCR avec le complexe CMH/peptide. Les protéines CD4 et CD8 se lient respectivement aux molécules CMH-II et CMH-I et, en même temps que la molécule CD3, transduisent les signaux initiant l'activation cellulaire T pendant la reconnaissance antigénique. Les molécules CD4 et CD8 permettent également une interaction suffisamment forte et prolongée entre CPA et lymphocyte.

D'autres molécules importantes interviennent dans la costimulation. Le CD40-Ligand (CD154) exprimé sur le lymphocyte CD4 activé après la reconnaissance antigénique se lie avec le CD40 sur la cellule dendritique. Après l'engagement du CD40, il y a une surexpression de CD80 et CD86 sur la cellule dendritique, entraînant ainsi une cascade de signaux à l'origine d'une activation et d'une prolifération optimale des lymphocytes T. Les molécules CD28 et CTLA-4 sont membres de la superfamille des immunoglobulines. Les deux se lient aux ligands CD80 et CD86. CTLA-4 a une plus forte affinité de liaison et est exprimé sur les

lymphocytes T activés et mémoires et agit donc comme un régulateur négatif pour mettre fin à la réponse immunitaire. La molécule CD28 est quant à elle plutôt exprimée sur les lymphocytes T naïfs et entraîne l'activation, la sécrétion d'IL-2 et la prolifération. En résumé, CD28 permet la différenciation des cellules T naïves en cellules T effectrices tandis que CTLA-4 met fin à la réponse immunitaire.

Le blocage de certains de ces signaux au moment de l'engagement du TCR peut favoriser l'induction de LTR. Cet effet a été démontré pour la première fois par Waldmann et al en utilisant des anticorps monoclonaux bloquant les molécules CD4 et CD8 (Qin S et al, 1993 ; Waldmann H et Cobbold S). En travaillant sur des modèles murins de greffe de peau, de cœur et de moelle osseuse, ce groupe a démontré la possibilité d'induire des LTR CD4+ capable de transférer la tolérance à des animaux naïfs. Dans ces expériences, une activité régulatrice allo-spécifique était retrouvée dans les 2 populations CD25+ et CD25- (Wise MP et al, 1998 ; Graca L et al, J Immunol., 2002). De manière intéressante, l'action bénéfique des LTR était maintenue seulement s'ils étaient continuellement exposés aux allo-antigènes du greffon. De la même manière, Belghith et al, en 2003, ont montré que le blocage de la molécule CD3 permettait l'induction de LTR prévenant l'apparition du diabète dans un modèle de souris NOD. Ces LTR étaient spécifiques d'antigènes, prédominaient dans la population CD4+CD25+ et exerçaient leur action immunosuppressive par l'intermédiaire d'une sécrétion de TGF-β.

Le blocage de la voie CD40-CD40-Ligand favorise également l'induction de LTR. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-CD40-Ligand dans des modèles murins de greffe allogéniques de moelle osseuse et de peau a permis l'induction de LTR

CD4+ spécifiques des molécules HLA du donneur. Les LTR ainsi induits inhibent les réponses allogéniques T naïves et mémoires in vitro et in vivo (Taylor PA et al, 2002 ; Graca L et al, 2000). Cette activité régulatrice nécessite un contact cellulaire entre les LTR et les cellules cibles. Le blocage de CD40-Ligand a aussi permis de prévenir le développement du diabète dans un modèle murin (Homann D et al, 2002) ou les LTR étaient d'un phénotype particulier avec expression de CD11c (un marqueur des cellules dendritiques), et NK1.1 (un marqueur des cellules NK), ceci constituant un exemple supplémentaire de la grande variété et de la grande complexité des mécanismes immunorégulateurs mis en jeu par le système immunitaire.

Comme on pouvait le supposer, le blocage d'autres signaux de costimulation peut avoir les mêmes conséquences. Ainsi, le blocage des molécules CD40 et CD86 sur les cellules dendritiques lors de la présentation antigénique a pour effet l'induction de LTR allo-spécifiques in vitro (Koenen HJ et Joosten I, 2000). Il est intéressant de noter que le blocage des signaux de costimulation au niveau de la cascade biochimique et non au niveau du récepteur lui-même peut avoir le même effet. Par exemple, le blocage de la translocation nucléaire de NFkB permet d'induire des LTR CD4+ spécifiques d'antigènes (Martin E et al, 2003). Ceci laisse entrevoir la possibilité intéressante de développer des stratégies basées sur le blocage ciblées de petites molécules intra-cellulaires dans le but d'induire des LTR.

Les résultats expérimentaux que nous venons de développer indiquent que les LTR peuvent être induits en bloquant chaque molécule de costimulation. Il est alors probable qu'en l'absence de toutes ces molécules, les chances seront grandes

d'induire également des LTR spécifiques d'antigènes. C'est ce que l'on observe effectivement avec les cellules dendritiques immatures (CDi, Cong Y et al, 2005). Les CDi sont une classe de CPA exprimant peu les molécules costimulatrices CD40, CD80 et CD86 ainsi que les molécules du CMH. Elles sécrètent également de plus faibles quantités de cytokines immunostimulantes telle que l'IL-12 en comparaison avec les DC matures (Kuwana M, 2002). Les DCi humaines peuvent être générées in vitro en cultivant des monocytes pendant 5 à 6 jours en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Lorsque des DCi ainsi produites sont cultivées en présence de lymphocytes T CD4+ naïfs provenant de sang de cordons ombilicaux, des LTR sont générés. Ces LTR sont peu répondeurs à une stimulation allogénique (même en utilisant secondairement des CD allogéniques matures comme cellules stimulatrices) et ils sont surtout suppresseurs dans des expériences de transfert adoptif. Ils expriment CTLA-4 à leur surface et sécrètent de l'IL-10. L'inhibition nécessite un contact cellulaire mais à la différence de la majorité des LTR induits, l'inhibition dans ce modèle n'est pas spécifique des alloantigènes utilisés lors de l'induction. Toutefois, cette absence de spécificité n'est sans doute pas la conséquence de l'utilisation de DCi mais résulte plus probablement de l'utilisation de cellules T CD4+ naïves de cordons ombilicaux comme précurseurs de LTR. En effet, lorsque des DCi sont chargées par un peptide du virus influenza et injectées en sous-cutané à des donneurs volontaires sains, il est possible d'obtenir des LTR CD8+ sécrétant de l'IL-10 et inhibant la prolifération des lymphocytes T autologues spécifiques du virus (Dhopakar MV et al, 2001 ; Dhopakar MV et Steinman RM, 2002). De la même manière, Jiang et al ont démontré in vitro l'induction de LTR CD4+ humains alospécifiques après une présentation peptidique par des DCi. (Jiang S et al, 2003). De plus, Steinbrick et al en 2002 ont démontré que des DCi traitées par IL-10 afin de

diminuer encore l'expression des molécules de costimulation, étaient capables de générer des LTR humains CD4+ et CD8+ spécifiques de peptides et d'alloantigènes. Ces LTR agissaient d'une manière dose-dépendante avec un contact cellulaire nécessaire avec les cellules cibles. Enfin, lorsque des cellules allogéniques mononucléées irradiées du sang périphérique déplétées en cellules CD2+ sont utilisées comme CPA immatures, elles induisent des LTR CD8+CD28-allospécifiques fonctionnant de manière dose-dépendante avec un contact cellulaire avec les cellules cibles là encore nécessaire (Liu Z et al, 1998).

Des observations similaires ont été faites avec des DCi murines, suggérant un phénomène généralisable à toutes les DCi. Le récepteur DEC-205 est impliqué dans l'endocytose et est présent presque exclusivement sur les DCi murines. Mahnke et al ont couplé l'ovalbumine (OVA) à un anticorps dirigé contre DEC-205 et l'ont injecté à des souris Balb/C porteuses de lymphocytes T exprimant un TCR transgénique spécifique de l'OVA. Ce protocole expérimental a permis l'induction de LTR CD4+CD25+ spécifiques de l'OVA qui provenaient d'une population cellulaire CD4+CD25-. Les LTR ainsi obtenus supprimaient la réponse immunitaire d'une manière dose-dépendante avec nécessité d'un contact cellulaire avec les cellules cibles.

Bien que l'exposition à des DCi favorise généralement l'induction de LTR tandis que l'exposition à des DC matures induit des lymphocytes T effecteurs, il y a au moins une exception. En effet, lorsque des cellules T dites plasmacytoïdes provenant d'amygdales humaines sont stimulées par IL-3 et CD40-Ligand, elles se différencient en cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp) (Grouard G et al, 1997).

Ces DCp sont apparemment matures puisqu'elles expriment de grandes quantités de CD40, CD80 et CD86 tandis qu'elles ont des propriétés limitées de phagocytose et d'endocytose. Elles peuvent toutefois induire *in vitro* des LTR CD8+ allospécifiques. A la différence des autres LTR induits, ces cellules exercent leur activité immunosuppressive en produisant de l'IL-10 car les effets peuvent être bloqués par un anticorps anti-IL-10 (Gilliet M et Liu YJ, 2002 ; Wei S et al, 2005).

En résumé, une costimulation non optimale lors d'une présentation antigénique, quelle que soit la manière dont elle est obtenue, permet l'induction de LTR aussi bien chez la souris que chez l'homme, *in vitro* et *in vivo*. Il a d'ailleurs été suggéré que l'interaction avec des DCi représentait un mécanisme physiologique important pour établir et maintenir la tolérance aux antigènes du soi, par exemple en contrôlant la durée et l'intensité des réactions immunitaires après des infections virales ou bactériennes (Roncarolo, MG et al, 2001).

## F-3 / Signal positif résultant d'une interaction ligand-récepteur

A coté de l'absence d'une costimulation optimale dont nous venons de détailler les effets dans les paragraphes précédents, certains résultats démontrent que les LTR peuvent aussi être induits par des signaux « positifs » fournis aux lymphocytes T lors d'une stimulation antigénique avec une costimulation optimale. Dans ce cas, c'est comme s'il y avait un signal régulateur en plus du signal antigénique.

L'engagement de la molécule CD2 à la surface des lymphocytes T par son ligand LFA-3 (leukocyte function-associated antigen) ou CD58 exprimé sur les cellules dendritiques renforce l'adhésion intercellulaire et l'activation lymphocytaire secondaire à l'activation du TCR. Wakkach et al en 2001 ont démontré que l'engagement de CD2 sur des lymphocyte humains T CD4+ naïfs entraîne leur différenciation en LTR et que des LTR HLA-DR1 spécifiques pouvaient être générés à partir de donneurs HLA-DR1 négatifs quand LFA3 était co-exprimé avec HLA-DR1 sur les CPA. De manière comparable, la stimulation de la molécule ICOS (Inducible Costimulatory molecule) à la surface des lymphocytes T pendant la présentation antigénique permet l'induction de LTR spécifiques d'antigènes.

ICOS est une molécule impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire mémoire de type TH2. Après activation, ICOS se lie à la phosphoinositide-dependent kinase 3 (PIK3) et active la phosphoinositide-dependent kinase1 (PIK1) et la protéine kinase B (PKB). La stimulation de ICOS augmente la production d'interféron-γ, d'IL-4

et d'IL-10 (Rudd CE et Schneider H, 2003). Les propriétés tolérigènes de la voie ICOS-ICOS-Ligand ont été démontrées *in vitro* ainsi que dans un modèle murin d'asthme (Akbari O et al, 2002) dans lequel, après introduction intra-nasale de l'allergène (ovalbumine), les cellules dendritiques induisaient des LTR CD4+ spécifiques d'antigènes. Dans ce modèle, la surexpression d'ICOS-Ligand sur les cellules dendritiques et la sécrétion d'IL-10 étaient tous deux nécessaires à l'induction des LTR car les anticorps anti-IL10, anti-ICOS et anti-ICOS-Ligand bloquaient tous le phénomène.

Enfin, l'engagement simultané de CD3 et de CD46 (molécule régulatrice du complément) en présence d'IL-2 induit des LTR CD4+ sécrétant de l'IL-10, suggérant ainsi un rôle possible du système du complément dans la tolérance immunologique (Kemper et al, 2003 ; Barchet W et al, 2006). De manière intéressante, certains résultats démontrent que les bactéries du genre *Streptococcus* pourraient échapper au système immunitaire en se liant à la molécule CD46 et ainsi induire des LTR dont l'action immunosuppressive assurerait leur survie dans l'organisme infecté (Price JD et al, 2005).

#### F-4 / Signal positif résultant de l'action d'une cytokine

Tandis que les interactions ligand-récepteur à la surface cellulaire jouent certainement un rôle dans l'induction de LTR, de nombreuses données expérimentales suggèrent que des médiateurs solubles tels que l'IL-10 et le TGF-β contribuent aussi au phénomène. Groux et al, en 1996 et 1997, ont ainsi pu induire des LTR CD4+ spécifiques d'antigènes en stimulant des lymphocytes T CD4+ naïfs spécifiques de l'ovalbumine provenant de souris transgéniques DO11-10 en utilisant une combinaison d'IL-10, de CPA spléniques et d'ovalbumine. Les LTR ainsi générés étaient de type Tr1. Les LTR Tr1 sont caractérisés par une sécrétion importante d'IL-10 et une faible sécrétion d'IL-2, d'IL-4 et de TGF-β. Dans les travaux de Groux, les LTR Tr1 ainsi générées inhibaient la survenue d'une colite auto-immune dans un modèle murin. La même approche expérimentale a permis d'induire avec succès des LTR Tr1 humains allospécifiques. Comme ces LTR Tr1 ont été induits en présence de CPA, l'IL-10 peut avoir agit soit en modulant l'expression des molécules de costimulation sur les CPA, soit en agissant directement sur les lymphocytes T. L'IL-10 a certainement la propriété de diminuer l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 sur les cellules dendritiques (Moore KW et al, 2001 ; Sato K et al, 2003 ; Wakkach A et al, 2003) à des niveaux insuffisants pour l'induction de lymphocytes T effecteurs, mais adaptés pour l'induction de LTR. Il existe moins d'arguments pour penser que l'IL-10 agisse directement sur les lymphocytes T. En effet, la plupart des résultats expérimentaux suggèrent qu'après exposition à l'IL-10 dans un système sans CPA, les lymphocytes T CD4+ deviennent anergiques mais non suppresseurs (Levings MK et al, 2001 ; Barrat FJ et al, 2002 ; Groux H et al, 2003).

Bien que le mécanisme précis par lequel l'IL-10 induit des LTR reste à déterminer dans bon nombre de modèles, cette cytokine joue un rôle majeur dans l'induction de LTR dans de nombreux modèles expérimentaux animaux et pourrait constituer un mécanisme par lequel des microorganismes immunogènes établissent une infection persistante et échappent ainsi aux réponses immunitaires de type T helper ou cytotoxique. Par exemple, la bactérie *Bordetella Pertussis* interagit avec les cellules dendritiques murines pour leur faire sécréter de l'IL-10 et ainsi générer des LTR Tr1 spécifiques d'antigènes à partir de lymphocytes T naïfs (McGuirk P et al, 2002). Les LTR Tr1 ainsi induits sécrètent à leur tour de l'IL-10 pour favoriser l'immunosuppression.

Dans le domaine de l'immunologie anti-tumorale également, l'IL-10 inhibe les réponses aux antigènes tumoraux par induction de LTR (Seo N et al, 2001). La combinaison d'IL-10 et de TGF- $\beta$  pourrait avoir des effets additifs ou synergiques pour l'induction de LTR. De tels effets n'ont pas été formellement démontrés jusqu'à présent, mais cette combinaison est capable d'induire *in vitro* des LTR CD4+ allospécifiques inhibant un modèle murin de maladie du greffon contre l'hôte (Chen ZM et al, 2003). Les LTR ainsi induits sécrètent de l'IL-10 mais leur action immuno-suppressive dépend de contacts cellulaires avec les cellules cibles.

Dans un travail plus récent, Luo X et al en 2005 ont démontré dans un modèle de souris diabétique NOD que le TGF- $\beta$  introduit par voie systémique au moyen d'un adénovirus porteur du gène induisait *in vivo* des LTR CD4+CD25+Fop3+ protégeant efficacement du diabète. Enfin, les propriétés du TGF- $\beta$  pour induire des LTR ont été confirmées dans des travaux *in vitro* démontrant l'induction de LTR

CD4+CD25+Foxp3+ (Fu S et al, 2004) ou CD4+CD25-Foxp3+ (Fantini MC et al, 2004) ainsi que dans un modèle murin de greffe cardiaque dans lequel les greffons étaient génétiquement modifiés pour sécréter du TGF- $\beta$  (Csencsits K et al, 2005).

Bien que l'attention se soit focalisée jusqu'à présent surtout sur l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , il est clair que d'autres peptides ou protéines solubles peuvent induire des LTR spécifiques d'antigènes. Le leflunomide par exemple est un immunosuppresseur principalement indiqué dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Dans un modèle murin de dermatite allergique, Weigmann et al ont montré que l'action de cette molécule permettait d'induire des LTR CD4+ et CD8+ spécifiques de l'allergène (Weigmann et al, 2006). De plus, Taylor et Namba en 2001 ont pu démontré dans un modèle de rétinite autoimmune qu'une présentation peptidique en présence de l'hormone  $\alpha$ -melanocyte stimulating ( $\alpha$ -MSH) induisait des LTR CD4+ spécifiques d'antigènes inhibant la réponse immunitaire par l'intermédiaire de TGF- $\beta$ . D'autres molécules habituellement considérées comme étrangère au répertoire immunitaire peuvent également participer. Ainsi, l'administration de hautes doses d'antithrombine-III permet une survie indéfinie de greffons cardiaques allogéniques murins par l'induction de LTR (Aramaki O et al, 2003).

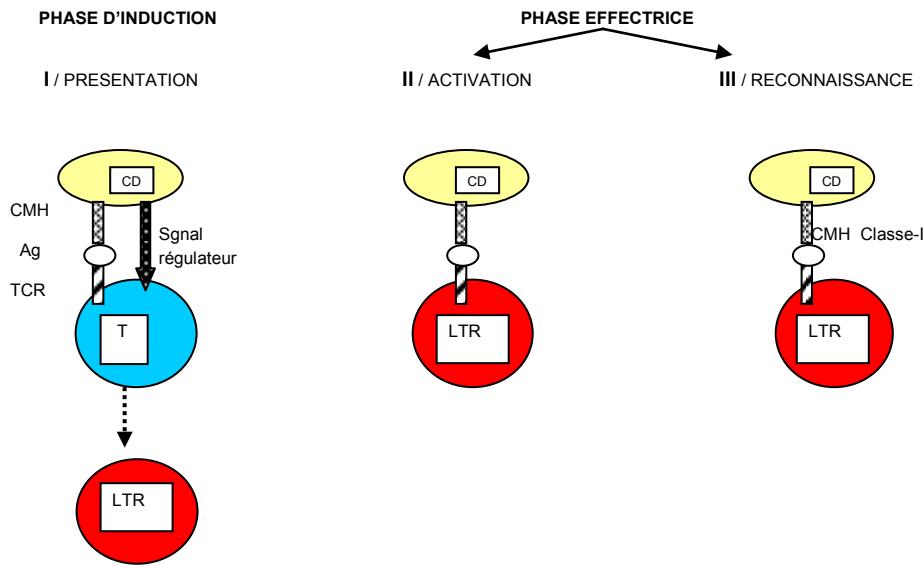
Au total, comme résumé sur la Figure 1 page 18, de nombreux facteurs solubles et de nombreuses interactions ligands-récepteurs peuvent induire diverses populations de LTR spécifiques d'antigènes. Il est frappant d'observer que chaque modèle expérimental induit un type particulier de LTR. Il semble donc que le phénotype et le mode d'action des LTR induits dépendent en grande partie du modèle expérimental choisi. Cependant, la spécificité antigénique semble une

propriété commune aux LTR induits alors qu'elle n'a pas été démontrée pour les LTR CD4+CD25+ naturellement présents dans le sang périphérique. Cette spécificité antigénique étant quasi-constante, il semble important de connaître les bases moléculaires et cellulaires qui la sous-tendent. Nous allons donc maintenant exposer les résultats expérimentaux de la littérature qui démontrent les mécanismes de cette spécificité antigénique.

## G / Bases moléculaires et cellulaires de la spécificité antigénique des Lymphocytes T Régulateurs induits

Comme illustré sur la Figure 2, pages 34 et 35, la spécificité antigénique des LTR induits résulte d'interactions cellulaires et moléculaires soit lors de la présentation antigénique initiale, soit au moment de l'activation des LTR, soit lors de la reconnaissance des cellules cibles par les LTR.

Nous allons maintenant détailler les données expérimentales décrivant les bases de cette spécificité antigénique.



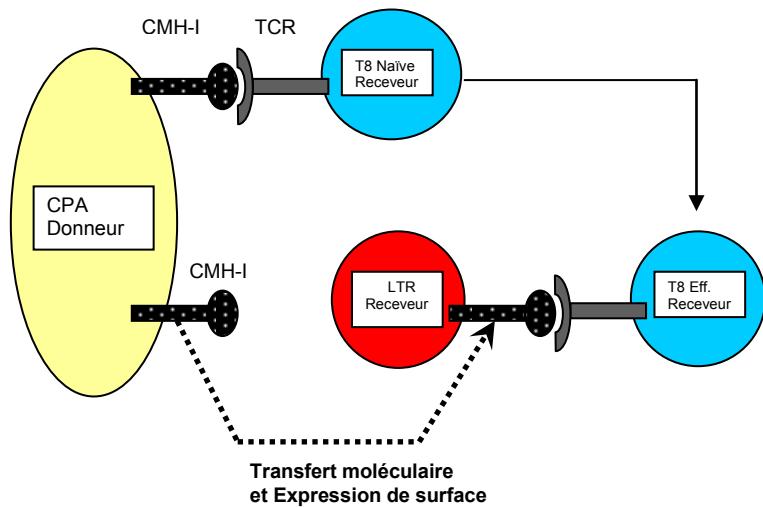
**Figure 2a: Lymphocytes T régulateurs spécifiques d'antigènes: bases cellulaires et moléculaires de la spécificité antigénique.**

La spécificité antigénique est assurée à 3 étapes : présentation, activation, reconnaissance.

**I / Présentation.** Une cellule dendritique (CD) présente un antigène (Ag) à un lymphocyte T (T) avec un signal régulateur fourni par la CD ou accompagnant celle-ci. Le signal régulateur induit la différenciation du lymphocyte T spécifique de l'antigène présenté en lymphocyte T régulateur spécifique de cet antigène (LTR).

**II / Activation.** Le LTR doit rencontrer à nouveau le même antigène pour être activé et inhiber la réponse immunitaire spécifique. Cette activation dépendante de l'antigène assure une suppression limitée à une région et une cible particulière.

**III / Reconnaissance.** Deux mécanismes supportent la reconnaissance spécifique de la cellule cible (CPA ou lymphocyte T) par le LTR. Premièrement, certains LTR reconnaissent spécifiquement des antigènes du CMH-I sur des CPA allogéniques. Le second mécanisme est illustré sur la Figure 2b.



**Figure 2b: Reconnaissance spécifique des lymphocyte T CD8+ effecteurs par les LTR.**

Ce mécanisme a été décrit dans un modèle murin de greffe cutanée allogénique (Zhang ZX et al, 2000). Les LTR acquièrent des molécules allogéniques CMH-I des CPA et les expriment à leur surface. Ce transfert moléculaire permet aux LTR de reconnaître spécifiquement les lymphocytes T CD8+ effecteurs cytotoxiques autologues portant un TCR spécifique de la molécule CMH-I transférée.

La première étape repose sur la présentation d'un peptide/antigène par une CPA à un lymphocyte T, accompagnée d'un « signal régulateur » qui peut être l'absence d'une costimulation adéquate, la présence d'une cellule dendritique immature ou plasmacytoïde, une interaction ligand-récepteur spécifique, ou encore la présence de facteurs solubles tels que IL-10 et TGF- $\beta$ . Les LTR induits dans la tolérance muqueuse digestive utilisent probablement un ou plusieurs de ces mécanismes, mais comme le « signal régulateur » n'a pas encore été précisément identifié dans ce modèle, il est possible que des mécanismes supplémentaires non encore décrits existent. Il reste également encore à déterminer si pendant une présentation antigénique avec « signal régulateur », les lymphocytes T activent un programme intra-cellulaire induisant leur différenciation en cellules régulatrices ou si des populations de LTR pré-existantes déjà différencierées répondent simplement à des facteurs de croissance et de prolifération.

Une fois induits, les LTR deviennent fonctionnels lorsqu'ils rencontrent à nouveau le même peptide/antigène. La nécessité de cette seconde rencontre assure une activité inhibitrice spécifique du ou des antigènes présentés à l'induction et limitée à un espace désiré en faisant de l'activation fonctionnelle des LTR un phénomène local dépendant de la reconnaissance antigénique (Steinbrink K et al, 2002 ; Groux H et al, 1997 ; Barrat FJ et al, 2002 ; Wang HY et al, 2004). Ce concept d'activation locale secondaire est conforté par certaines observations dans des modèles expérimentaux murins d'induction de tolérance montrant des LTR localisés spécifiquement au sein des greffons tolérisés (Graca L et al, J Exp Med, 2002 ; Young KJ et al, 2002). De plus, une revue récemment parue vient appuyer ce concept en exposant l'ensemble des connaissances sur le rôle favorisant de

nombreuses chemokines (telles CCR 2, CCR4, CCR5, CCR7, CCRR4, CD62L) sur la migration des LTR vers les tissus cibles (Wei S et al, 2006).

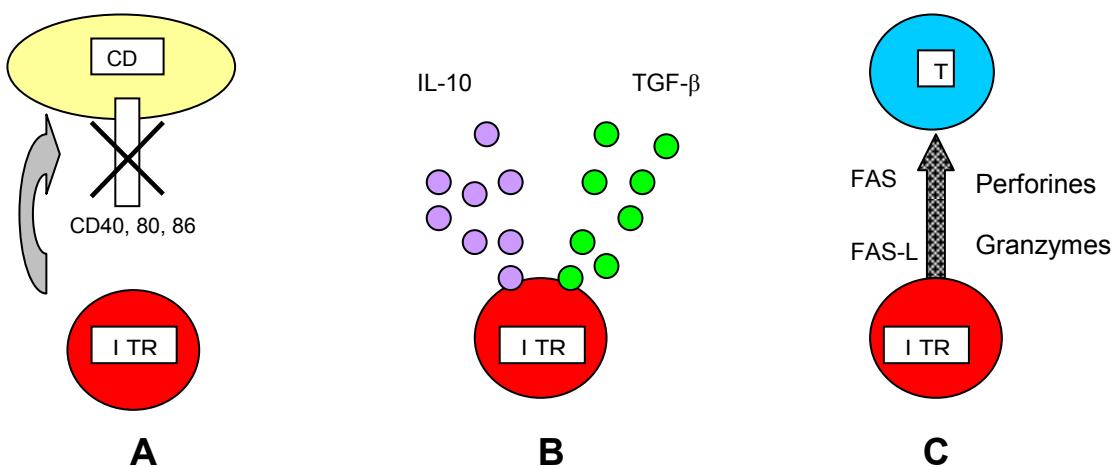
La troisième étape repose sur la reconnaissance spécifique des cellules cibles (CPA ou lymphocyte T effecteur) portant l'antigène présenté lors de la phase d'induction. Les bases cellulaires de ce phénomène restent controversées et pourraient dépendre des contextes expérimentaux dans lesquels elles ont été décrites. Un mécanisme dépend de la reconnaissance allospécifique de molécules du CMH de classe I sur les cellules dendritiques ciblées par les LTR. Ce mécanisme a été démontré dans le mode d'action des LTR CD8+CD28- (Liu Z et al, 1999). Un second mécanisme a été démontré dans un modèle où des souris étaient transfusées avec des lymphocytes T allogéniques avant de recevoir un greffon cutané de l'animal donneur. Dans ce modèle, les LTR prévenaient le rejet du greffon en reconnaissant et en inhibant spécifiquement les lymphocytes T CD8 effecteurs responsables du rejet (Zhang ZX et al, 2000). Les investigations *in vitro* de cette reconnaissance spécifique ont montré que les LTR acquéraient des molécules du CMH-I des CPA voisines et les exprimaient à leur surface. Ce transfert moléculaire permettait secondairement une reconnaissance spécifique et un ciblage des lymphocytes T CD8+ effecteurs autologues portant un récepteur TCR spécifique de la molécule CMH-I transférée.

Nous venons de présenter les bases moléculaires et cellulaires jusqu'à présent connues qui sous-tendent la spécificité antigénique des LTR induits. Les mécanismes d'action des LTR sont un autre domaine de recherche très actif. Les

mécanismes restant à découvrir sont sans doute encore nombreux. Cependant, certains d'entre eux ont déjà été bien décrits. Nous allons maintenant les présenter.

## H / Mécanismes d'action des Lymphocytes T Régulateurs induits

Trois mécanismes d'action des LTR induits ont jusqu'à présent été décrits. Ils sont schématisés sur la figure suivante. Nous allons maintenant détailler chacun d'entre eux.



**Figure 3: Lymphocytes T régulateurs induits: 3 mécanismes de suppression.**

**A /** Après reconnaissance antigénique spécifique de la cellule dendritique cible (CD), le lymphocyte T régulateur (LTR) inhibe l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 sur la CD.

**B /** Après reconnaissance de son antigène spécifique, le LTR sécrète de l'interleukine 10 (IL-10) et/ou du TGF- $\beta$ .

**C /** Les LTR activent la voie cytolytique FAS/FAS-ligand ou la voie des Perforines pour entraîner l'apoptose des lymphocytes T effecteurs (T) après leur reconnaissance spécifique.

Le premier mécanisme d'action est la diminution d'expression des molécules de costimulation CD40, CD80, CD86 sur les cellules dendritiques (Liu Z et al, 1999 ; Suciu-Foca N et al, 2003). Il fut décrit dans un modèle expérimental d'induction de LTR allospécifiques CD8+CD28-. Les auteurs ont démontré que l'inhibition des molécules de costimulation jouait un rôle majeur dans l'action suppressive des LTR (Cortesini R et al, 2001). Dans une étude plus récente, il a été précisé que les LTR CD8+CD28- induisaient une surexpression des transcripts 3 et 4 d'immunoglobuline (Ig)-like sur les CPA et que cette surexpression entraînait secondairement la diminution d'expression de CD80 (Chang CC et al, 2002). Prises dans leur ensemble, ces données expérimentales fournissent finalement un mécanisme d'action relativement bien décrit pour les LTR CD8+CD28-.

Le second mécanisme d'action repose sur la sécrétion d'IL-10 et/ou de TGF- $\beta$  par les LTR activés après rencontre avec leur antigène spécifique (Groux H et al, 1997 ; Weiner HL, 2001 ; Gilliet M et Liu YJ, 2002 ; Barrat FJ et al, 2002 ; Chen ML et al, 2005). Les effets de l'IL-10 sur les cellules dendritiques sont médiés par le système JAK/STAT avec un rôle précoce crucial de la kinase JAK1 qui phosphoryle des résidus tyrosines et active le facteur transcriptionnel STAT3 (Moore KW et al, 2001). Ceci a pour conséquence l'inhibition de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 et TNF- $\alpha$  par les monocytes, macrophages et cellules dendritiques immatures ainsi que la diminution d'expression des molécules CMH-II, CD80 et CD86 sur ces mêmes cellules. L'IL-10 affecte également le fonctionnement des lymphocytes T CD4 en inhibant l'activation de NFkB et ainsi la production d'IL-2 (Moore KW et al, 2001). Les effets du TGF- $\beta$  sont quant à eux médiés par la phosphorylation/activation intra-cytoplasmique du complexe SMAD.

Après son transport vers le noyau, la molécule s'associe avec des modulateurs transcriptionnels et inhibe la prolifération lymphocytaire T. De plus, TGF- $\beta$  inhibe la différenciation des lymphocytes T naïfs et la maturation des cellules dendritiques (Gorelik L et Flavell RA, 2002).

Le troisième mécanisme d'action fut initialement décrit dans un modèle murin de greffe cutanée allogénique (Zhang ZX et al, 2000). Dans ce modèle, les LTR CD4-CD8- induisent l'apoptose spécifique des lymphocytes T CD8+ effecteurs responsables du rejet. L'apoptose résulte d'une activation de la voie FAS-FAS-Ligand. L'importance de cette voie lytique a également été démontrée dans d'autres modèles expérimentaux (Priatel JJ et al, 2001 ; Watanabe T et al, 2002). Un second mécanisme de suppression reposant également sur l'apoptose des cellules cibles a été plus récemment décrit. Il s'agit du système perforines/granzymes qui joue un rôle principal dans l'action de certains types de LTR (Grossman WJ et al, 2004 ; Qin HY et al, 2006).

Finalement, il est important de souligner que ces mécanismes d'action ne s'excluent pas mutuellement et qu'en dehors des modèles expérimentaux forcément réducteurs, ils peuvent agir simultanément dans des situations physiologiques par nature plus complexes. De plus, certains mécanismes ont été décrits seulement *in vitro* et leur pertinence physiologique *in vivo* reste à démontrer.

## **II / La voie Notch**

### **A / Description de la voie Notch**

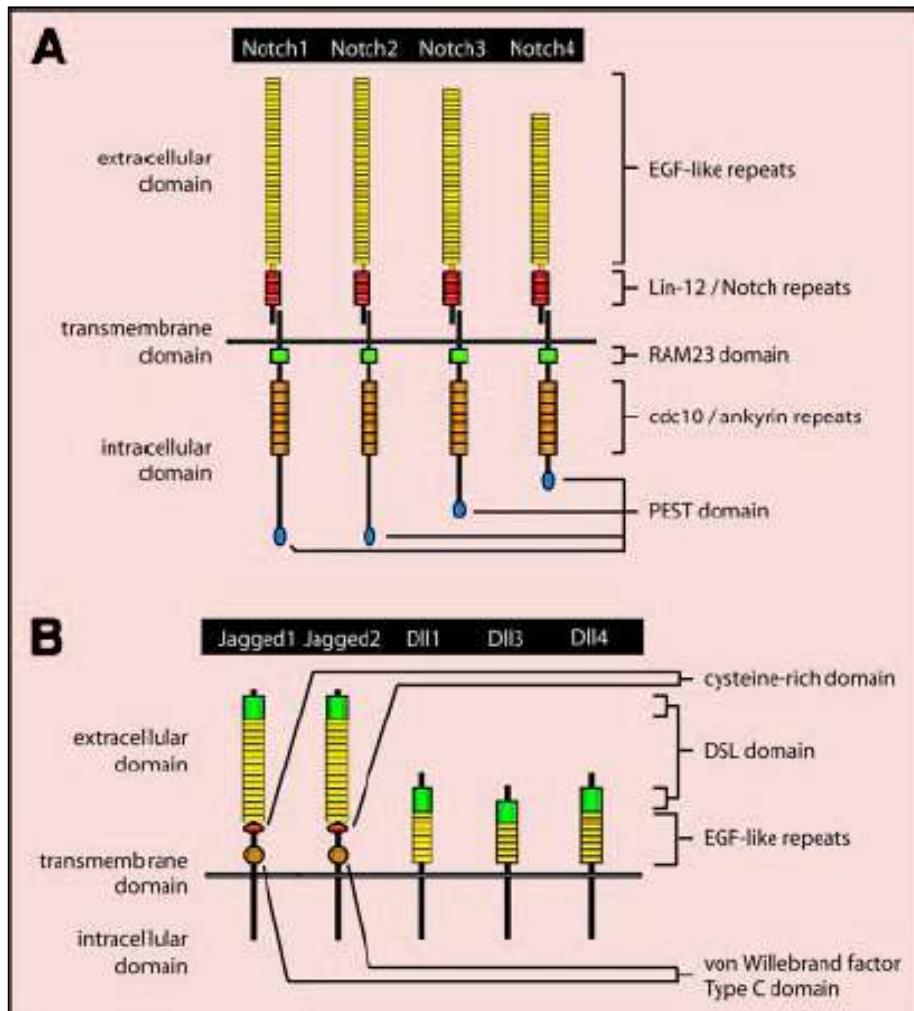
Notch est une famille de récepteurs transmembranaires exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques et du système nerveux central. Les récepteurs Notch constituent un système très conservé au cours de l'évolution puisqu'ils sont présents aussi bien chez la drosophile que chez *caenorhabditis elegans*, la souris ou l'homme (Artavanis-Tsakonas S et al, 1995).

Le Tableau 1 de la page 43 et la Figure 4 de la page 44 résument les connaissances actuelles sur le nombre de récepteurs et de leurs ligands chez les drosophiles et les mammifères. Chez les mammifères, 4 récepteurs (Notch 1-4) peuvent interagir avec 5 ligands (Jagged 1, 2 ; Delta-like 1, 3, 4) sans qu'il n'ait été jusqu'à présent démontré de spécificité d'un récepteur pour un ligand particulier. Cette absence de spécificité connue est également valable pour le récepteur Notch et ses ligands Serrate et Delta chez la drosophile.

Tableau 1 : Les récepteurs Notch et leurs ligands chez les drosophiles et les mammifères.

	<u>Récepteurs</u>	<u>Ligands</u>
<b>Drosophiles</b>	Notch	Serrate Delta
<b>Mammifères</b>	Notch 1 Notch 2 Notch 3 Notch 4	Jagged 1 Jagged 2 Delta-like 1 Delta-like 3 Delta-like 4

**Figure 4:** Les récepteurs Notch et leurs ligands chez les mammifères.

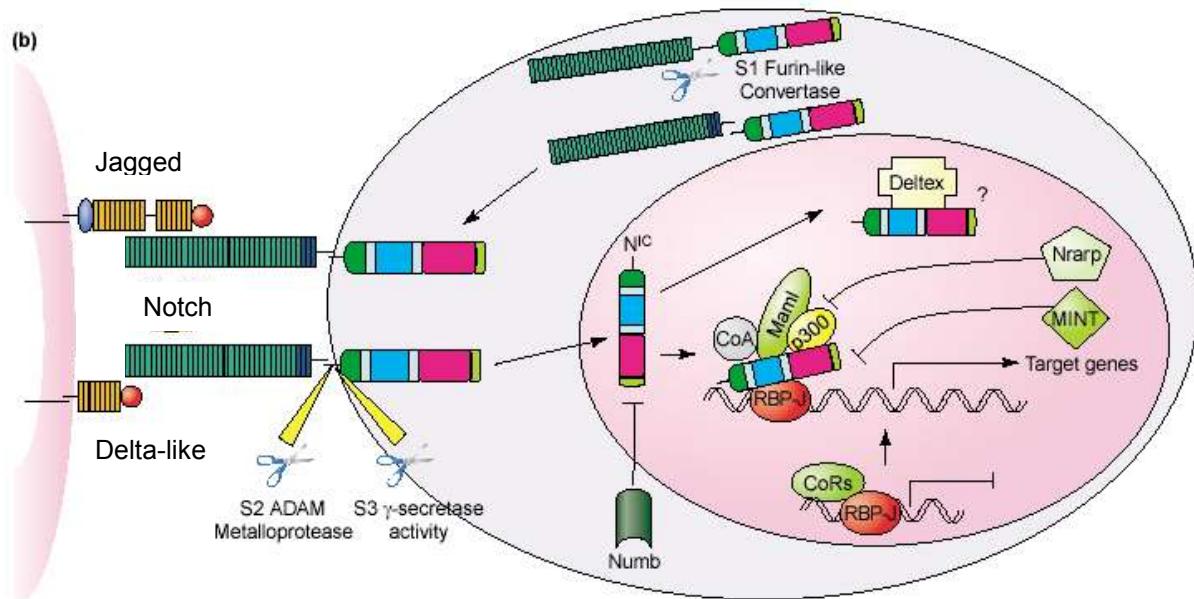


D'après Leong KG et Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. Blood. 2006 Mar 15;107(6):2223-33.

A / Les récepteurs Notch : La partie extra-cellulaire comporte une répétition de motifs EGF(Epidermal Growth Factor)-like. Ces motifs sont requis pour une liaison optimale entre récepteur et ligand. La partie intra-cellulaire comporte un domaine RAM et une répétition du motif Ankyrine nécessaires à la transduction du signal d'activation.

B / Les ligands de Notch : la partie extra-cellulaire comporte une répétition des motifs EGF-like et un domaine DSL (Delta, Serrate et LAG-2) qui sont essentiels pour la liaison à Notch.

**Figure 5:** Mécanismes moléculaires intra-cellulaires de la voie de signalisation Notch.



D'après Dallman MJ, Smith E, Benson RA, et al: Notch: control of lymphocyte differentiation in the periphery. Curr Opin Immunol. 2005 Jun;17(3):259-66.

La liaison de Notch à l'un de ses ligands (Jagged ou Delta-like) entraîne le clivage de Notch à sa partie extra-cellulaire (par une metalloprotéase) et à sa partie transmembranaire (par une gamma-sécrétase). Ce double clivage aboutit au relargage de la partie intra-cellulaire de Notch (Notch-IC) qui représente la forme activée du récepteur. Notch-IC pénètre ensuite dans le noyau cellulaire où il va interagir avec de nombreux régulateurs transcriptionnels (RBP-J, P300, Maml, Deltex, HES-1...). Les mécanismes de régulation précis du signal Notch à ce niveau sont incomplètement compris.

Nous souhaitons insister sur 2 régulateurs transcriptionnels (HES-1 et Deltex) qui sont surexprimés lors de l'activation de Notch (Yamamoto N. et al, 2001 ; Jarriault S. et al, 1998). En effet, afin de démontrer l'activation de la voie Notch dans notre travail, nous avons évalué l'expression de HES-1 et Deltex. Nous y reviendrons dans la présentation des résultats.

Nous allons maintenant exposer les propriétés physiologiques et pathologiques de Notch.

## B / Propriétés de la voie Notch

### B-1 / Propriétés physiologiques

#### B-1-1 / Embryogénèse du système nerveux

Une revue récente (Louvi A et Artavanis-Tsakonas S, 2006) expose les connaissances actuelles sur le rôle essentiel de Notch dans le développement du système nerveux chez les vertébrés. Ces connaissances dépassent le cadre du travail de cette thèse. Signalons simplement que Notch est impliqué dans la survie des cellules souches neuronales et favorise la différenciation des cellules gliales au dépend de celle des neurones. Notch joue également un rôle dans la morphogenèse du cerveau en influant sur les migrations cellulaires au sein du système nerveux central.

#### B-1-2 / Hématopoïèse

Toutes les cellules hématopoïétiques circulantes expriment à leur surface un ou plusieurs récepteurs Notch tandis que les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules épithéliales thymiques portent à leur surface les ligands de Notch (Jagged ou Delta-like). Ces observations suggèrent évidemment un rôle possible de Notch dans la différenciation des cellules hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse et du thymus. Des travaux ont effectivement démontré que Notch jouait un rôle important dans le maintien d'un pool constant de cellules souches

hématopoïétiques totipotentes dans la moelle osseuse (Ohishi K et al, 2003). En plus de cette propriété, Notch intervient dans la lymphopoïèse en favorisant la différenciation lymphoïde au dépend de la différenciation myéloïde et en favorisant la différenciation de la lymphopoïèse T au dépend de la lymphopoïèse B (Deftos ML et Bevan MJ, 2000). D'autres observations suggèrent que Notch favorise la différenciation des lymphocytes T $\alpha\beta$  au dépend des lymphocytes T $\gamma\delta$  ainsi que la différenciation des lymphocytes T CD4+ au dépend des lymphocytes T CD8+ mais ces résultats sont encore controversés (Deftos ML et Bevan MJ, 2000).

### B-1-3 / Système immunitaire

Outre le rôle essentiel joué par Notch dans l'hématopoïèse, certaines données expérimentales démontrent que Notch intervient également dans la physiologie des lymphocytes T matures qui expriment à leur surface un TCR fonctionnel. Ces propriétés concernent donc le système immunitaire périphérique et non plus la lymphopoïèse. Elles ont été démontrées pour la première fois dans un modèle murin de stimulation antigénique (Hoyne GF et al, 2000). Les auteurs y ont observé que la surexpression de Serrate (un des ligands de Notch) sur des cellules dendritiques murines présentant un antigène entraînait la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs ainsi stimulés en LTR capables de transférer une tolérance spécifique de l'antigène à des animaux naïfs. La conclusion de ce travail tout à fait original était donc la possibilité d'induire chez la souris des LTR spécifiques d'antigène par activation de la voie Notch au moment de la présentation antigénique. Il semble ainsi

que de manière un peu comparable à ce que l'on observe dans l'hématopoïèse ou Notch favorise le développement de la lymphopoïèse T au dépend de la lymphopoïèse B, Notch puisse favoriser au sein du système immunitaire périphérique la différenciation des lymphocytes T naïfs en LTR au dépend des lymphocytes T effecteurs (Dallmann MJ et al, 2005). Dans les 2 cas (hématopoïèse et immunité périphérique), Notch joue un rôle principal dans l'orientation des destins cellulaires.

## B-2 / Propriétés pathologiques

Nous venons de décrire certaines propriétés essentielles de Notch dans le maintien d'un nombre constant de cellules souches hématopoïétiques ainsi que dans la lymphopoïèse T. Cette régulation des destins cellulaires au sein de l'hématopoïèse est fragile car il existe des risques de stimulation excessive avec prolifération incontrôlée des cellules. Il a en effet été démontré qu'une surexpression de Notch favorisait le développement d'hémopathies malignes impliquant plus particulièrement la lymphopoïèse T. Plus précisément, une expression aberrante de Notch1 chez l'homme peut favoriser l'apparition d'une leucémie aigue lymphoblastique T qui correspond à une prolifération excessive et incontrôlée des cellules souches lymphoïdes T (Leong KG et Karsan A, 2006).

Certaines observations expérimentales confirment le rôle possible de Notch dans la leucémogénèse T. En effet, l'analyse de certaines cellules leucémiques T a permis de mettre en évidence une translocation entre les chromosomes 7 et 9, juxtaposant le gène TCR $\beta$  et une partie du gène Notch1 correspondant à la partie intracellulaire de la molécule. La conséquence de cette translocation est une production excessive de la partie intracellulaire de Notch1 correspondant à la forme activée de la molécule. Il en résulte une stimulation excessive de la lymphopoïèse T à l'origine de la prolifération et donc de la leucémisation (Ellisen LW et al, 1991). Une autre preuve du potentiel leucémique de Notch provient d'expériences montrant que des souris irradiées recevant une greffe de moelle osseuse contenant des cellules exprimant la partie intracellulaire de Notch 1 développent constamment une leucémie aigue lymphoblastique T (Aster JC et al, 2000).

En résumé, il apparaît que Notch joue un rôle très important dans le système hématopoïétique que ce soit au sein de la lymphopoïèse ou du système immunitaire périphérique avec l'induction possible de LTR murins.

### **III / Hypothèse de travail**

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente concernant les propriétés de Notch au sein du système immunitaire, Hoyne et al ont démontré en 2000 que des lymphocytes T CD4+ naïfs murins peuvent se différencier en LTR spécifiques d'un antigène. Ceci nécessite que les lymphocytes T CD4+ naïfs reçoivent les 2 signaux simultanés que sont la présentation de l'antigène à tolérer et l'activation « forcée » de Notch.

Puisque Notch joue un rôle essentiel dans l'induction de LTR chez la souris, nous nous sommes proposé d'explorer si l'activation de Notch pouvait jouer un rôle comparable chez l'homme. Afin d'explorer cette possibilité, nous avons choisi de travailler à partir de deux modèles *in vitro* de stimulation antigéniques: un modèle de stimulation virale (EBV, virus d'Epstein Barr) et un modèle de stimulation allogénique. Ce choix de 2 modèles repose sur une préoccupation de reproductibilité des résultats au delà d'un modèle unique.

Dans nos 2 modèles, les CPA étaient des lymphocytes B transformés par l'EBV (LCL-EBV, lymphoblastoid cell line-EBV) car ces cellules sont d'excellentes présentatrices d'antigènes caractérisées par une forte expression des molécules de costimulation et du CMH. De plus, le laboratoire possède une grande expérience dans l'utilisation des LCL-EBV en tant que CPA pour la production de lymphocytes T cytotoxiques anti-EBV (CTL anti-EBV ; Rooney CM et al, 1995 ; Rooney CM et al, 1998). Il s'agit là d'un système induisant la prolifération de CTL anti-EBV spécifiques lorsque les LCL-EBV sont cultivés avec des lymphocytes T mémoires anti-EBV

autologues provenant de donneurs sérologiquement positifs pour l'EBV. Ce système bien défini, bien maîtrisé, et donnant des résultats très reproductibles nous a permis d'étudier les conséquences d'une expression forcée de Jagged1 par les LCL-EBV sur la réponse cytotoxique T anti-EBV autologue (premier modèle) ou sur la réponse T allogénique (deuxième modèle).

## **IV / Inscription de ce travail au sein l'activité générale du laboratoire**

Le laboratoire dans lequel notre travail a été effectué (laboratoire du Dr Malcolm Brenner, Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Houston, USA) n'est pas un laboratoire d'immunologie fondamentale. Il s'agit d'un laboratoire structuré autour de la recherche translationnelle dans le domaine de la cancérologie et de l'hématologie avec comme thématique principale l'utilisation des CTL anti-EBV dans le traitement des lymphoproliférations B EBV-induites post-transplantation (Rooney CM et al, 1995 ; Rooney CM et al, 1998), de la maladie de Hodgkin (Bollard CM et al, 2004) ou du carcinome naso-pharyngien (Straatoff KC et al, 2005). Afin d'étendre les indications des CTL anti-EBV à d'autres pathologies malignes EBV-négative, Rossig et al en 2002 ont travaillé avec succès sur des CTL anti-EBV modifiés génétiquement afin d'exprimer des récepteurs TCR chimériques spécifiques d'antigènes tumoraux. Les CTL anti-EBV avec récepteurs chimériques sont actuellement un sujet de recherche important au sein du laboratoire.

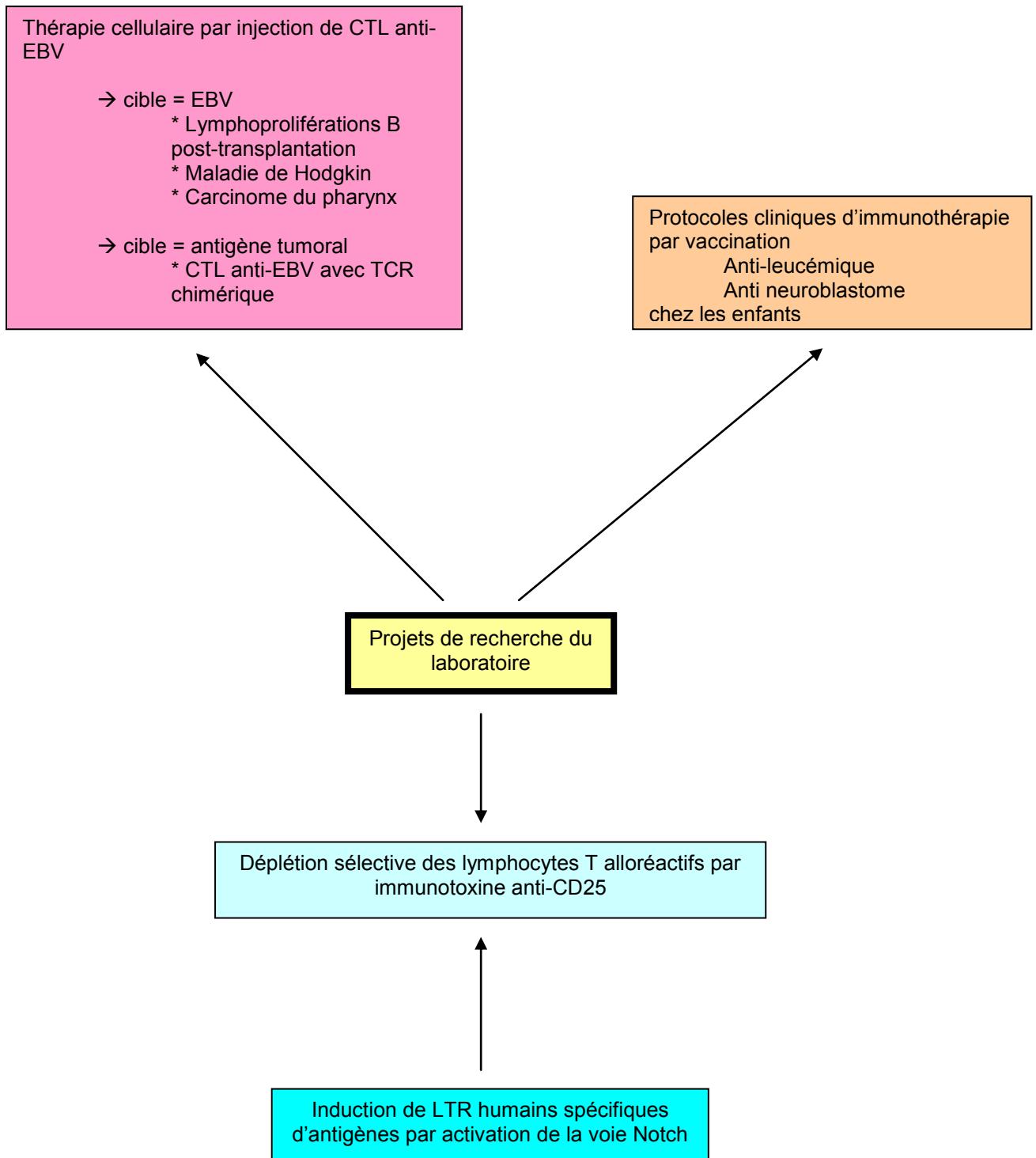
Une autre thématique forte repose sur l'évaluation de protocoles cliniques de vaccinations anti-leucémique (Rousseau RF et al, 2006) et anti-neuroblastome (Rousseau RF et al, 2003) dans le domaine pédiatrique.

Enfin, un autre travail en cours dans le laboratoire au moment où nous avons débuté notre projet concernait la prévention de la réaction du greffon contre l'hôte (graft-versus-host disease ou GvHD), complication fréquente et potentiellement mortelle de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Ce projet proposait

une déplétion sélective *in vitro* des lymphocytes T alloréactifs du donneur avant l'injection du greffon. La molécule CD25 étant exprimée sur les lymphocytes T alloréactifs activés, l'allodéplétion était assurée par un anticorps anti-CD25 couplé à une immunotoxine après stimulation des lymphocytes T du donneur par des LCL-EBV du receveur. A l'issue de ce protocole, la réponse allogénique était effectivement partiellement inhibée alors que les réponses anti-Cytomégalovirus, anti-Adénovirus ainsi que l'effet du greffon contre la leucémie étaient conservés dans une certaine mesure (Amrolia P et al, 2003). Un inconvénient de cette approche était la déplétion non désirée des LTR CD4+CD25+ dont certains travaux récents soulignent le rôle possible dans le contrôle de la GvHD (Hoffmann P et Edinger M, 2006). Devant ce problème inhérent au ciblage du CD25 par l'immunotoxine, nous avons évalué la possibilité d'induire *in vitro* des LTR humains allospécifiques afin de remplacer les fonctions des LTR CD4+CD25+ involontairement déplétés. C'est au départ dans ce cadre que s'inscrit notre projet d'induction de LTR humains par activation forcée de la voie Notch. Il convient de souligner que cette thématique des LTR n'avait jamais été antérieurement développée dans notre laboratoire qui ne posséde donc pas d'expertise particulière dans ce domaine de l'immunologie.

La Figure 6 page 57 représente un organigramme résumant les différents projets de recherche menés au laboratoire.

Figure 6: Organigramme présentant les différents projets de recherche du laboratoire.



## **V / Résultats**

Nous présentons les résultats de notre travail sous la forme de 3 articles :

- Un premier article original, présentant les résultats obtenus dans le modèle de stimulation virale.
- Un deuxième article original, présentant les résultats obtenus dans le modèle de stimulation allogénique.
- Un troisième article, qui est une revue générale sur les lymphocytes T régulateurs induits.

## A / Résultats communs aux 2 articles originaux (1 et 2)

La première étape préalable, commune aux 2 travaux fut de trouver un moyen de surexprimer Jagged1 sur les LCL-EBV. Pour cela nous avons choisi une transduction par un adenovirus hybride 5/F35 (Adénovirus sérotype 5 portant des fibres de surface de l'adénovirus sérotype 35) dont l'efficacité pour transduire des LCL-EBV a été préalablement démontrée (Shayakhmetov DM et Lieber A 2000 ; Yotnda P et al, 2001).

Afin d'évaluer l'efficacité de transduction des LCL-EBV, nous avons quantifié l'expression de l'ARNm et de la protéine Jagged1. Sachant qu'il n'existe pas d'anticorps anti-Jagged1 suffisamment fiable pour une analyse en cytométrie de flux de l'expression de surface, nous avons choisi d'évaluer l'efficacité de transduction en 3 étapes. La première fut de quantifier l'ARNm Jagged1 dans les LCL-EBV transdus par une technique de RT-PCR en temps réel. La deuxième fut d'étudier par Western Blot la présence de la protéine. Enfin, afin de nous assurer de l'expression membranaire et du caractère fonctionnel de la protéine, nous avons choisi d'évaluer l'expression de HES-1 et Deltex (2 régulateurs transcriptionnels surexprimés lorsque Notch est activé) dans des lymphocytes T exposés à des LCL-EBV transdus. Cette évaluation a été faite par des techniques de RT-PCR en temps réel et de Western Blot.

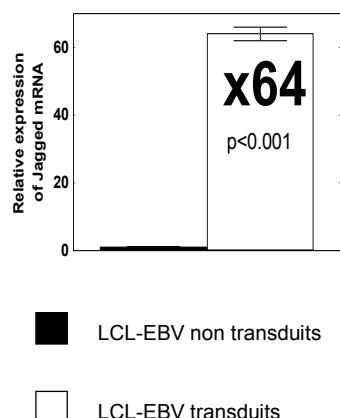
Les résultats obtenus après transduction utilisant une MOI (Multiplicity of Infection) de 100 pfu/cellule sont les suivants :

**Figure 7: Transduction de LCL-EBV par l'Ad5/F35 Jagged-1 avec activation secondaire de la voie de signalisation Notch dans les lymphocytes T**

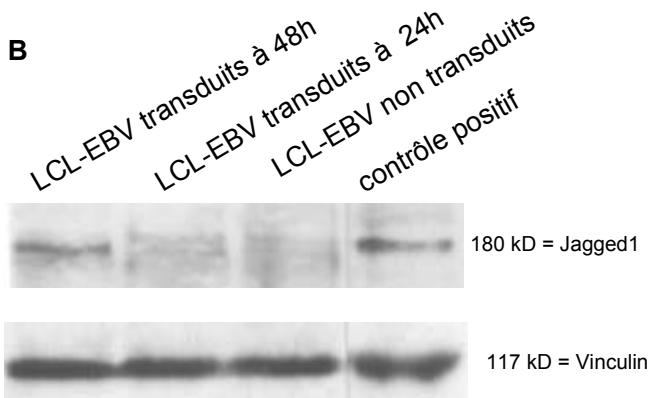
A. RT-PCR montrant la surexpression de l'ARNm de Jagged-1 (x 64) dans les LCL-EBV transdus à 48h (MOI=100 pfu/cell) en comparaison des LCL-EBV non transdus

B. Western Blot montrant la protéine Jagged1 d'une taille de 180kDa 48h après la transduction. Des cellules stromales médullaires ont été utilisées comme contrôle positif.

**A**

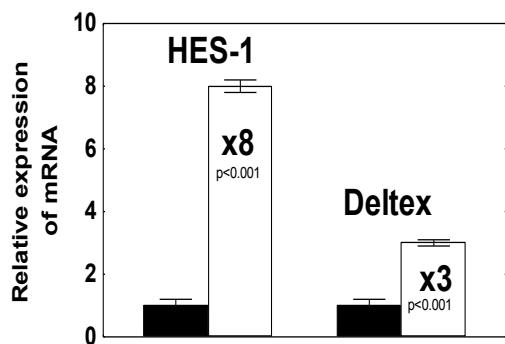


**B**

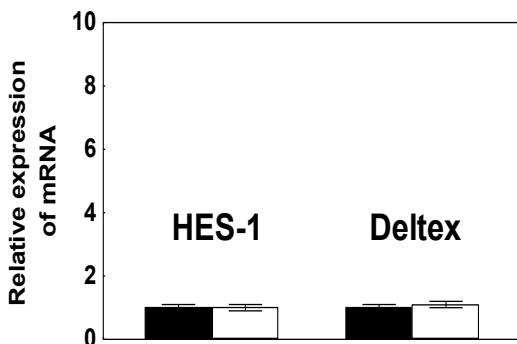


C. RT-PCR montrant le niveau d'expression en ARNm de HES-1 et Deltex dans les lymphocytes T stimulés par des LCL-EBV autologues non transdus (■) en comparaison de LCL-EBV autologues Jagged1(□). La surexpression après stimulation par les LCL-EBV Jagged1 a été observée à 12h mais pas à 24 ni 48h. Les résultats présentés sont la moyenne 3 expériences.

**At 12 hours**



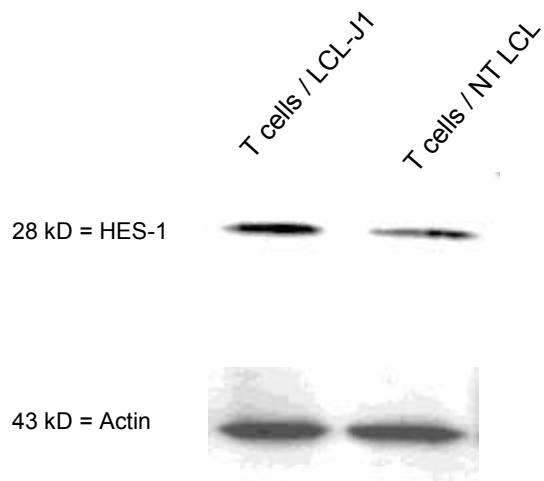
**At 24 and 48 hours**



**D.** Western Blot montrant une surexpression de la protéine HES-1 (28 kDa) dans des lymphocytes T 24h après stimulation par des LCL-EBV Jagged1.

T cells / LCL-J1 = lymphocytes T stimulés par des LCL-EBV autologues transduits par l'Ad 5/F35 Jagged1.

T cells / NT LCL = lymphocytes Tstimulés par des LCL-EBV autologues non transduits



Nous avons également vérifié que la transduction des LCL-EBV n'avait aucune conséquence sur le niveau d'expression des molécules HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQ, HLA-DR, CD40, CD80, et CD86.

## B / Article 1

Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes

Vigouroux Stephane, Yvon Eric, Wagner Hans Joachim, Biagi Ettore, Dotti Gianpietro, Sili Uluhan, Lira Cecilia, Rooney Cliona M. and Brenner Malcolm K.

Journal of Virology. 2003;77:10872-10880

## Induction of Antigen-Specific Regulatory T Cells following Overexpression of a Notch Ligand by Human B Lymphocytes

Stéphane Vigouroux, Eric Yvon, Hans-Joachim Wagner, Ettore Biagi,  
Gianpietro Dotti, Uluhan Sili, Cecilia Lira, Cliona M. Rooney,  
and Malcolm K. Brenner\*

Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

Received 5 March 2003/Accepted 22 July 2003

In mice, activation of the Notch pathway in T cells by antigen-presenting cells overexpressing Notch ligands favors differentiation of regulatory T lymphocytes responsible for antigen-specific tolerance. To determine whether this mechanism operates in human T cells, we used Epstein-Barr virus-positive lymphoblastoid cell lines (EBV-LCL) as our (viral) antigen-presenting cells and overexpressed the Notch ligand Jagged-1 (EBV-LCL J1) by adenoviral transduction. The EBV-LCL J1s were cocultured with autologous T cells, and the proliferative and cytotoxic responses to EBV antigens were measured. Transduction had no effect on EBV-LCL expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens or of costimulatory molecules CD80, CD86, and CD40. However, we observed a 35% inhibition of proliferation and a >65% reduction in cytotoxic-T-cell activity, and interleukin 10 production was increased ninefold. These EBV-LCL J1-stimulated T lymphocytes act as antigen-specific regulatory cells, since their addition to fresh autologous T cells cultured with autologous nontransduced EBV-LCL cells significantly inhibited both proliferation and cytotoxic effector function. Within the inhibitory population, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells had the greatest activity. This inhibition appears to be antigen-specific, since responses to *Candida* and cytomegalovirus antigens were unaffected. Hence, transgenic expression of Jagged-1 by antigen-presenting cells can induce antigen-specific regulatory T cells in humans and modify immune responses to viral antigens.

Immunoregulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells play an important role in peripheral self-tolerance in rodents (6, 18, 39, 40) and humans (5, 15, 26, 37). These well-characterized “naturally occurring” regulatory T cells (Tr) are able to transfer tolerance in vivo, which differentiates them from other mechanisms of peripheral tolerance, including T-cell anergy (35), T-cell depletion (24), and immunological ignorance (47). Their characteristics in vitro include a low proliferative capacity after allogeneic or polyclonal stimulation, a high level of CTLA4 and CD45RO expression, and an inhibition of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cell proliferation in a cell-cell contact- and dose-dependent manner (5, 15, 26, 37).

Antigen-inducible Tr also play a significant role in the development of unresponsiveness. These cells have a more heterogeneous phenotype. While they may share the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> phenotype of naturally occurring Tr (43), they may also be CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (23, 46) or CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+-</sup> (4, 7, 8). The molecular signals involved in the induction of these regulatory cells are incompletely identified. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) can induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr (43), as well as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (46) and CD8<sup>+</sup> Tr (8), while the 4C8 antigen can induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tr (23). Similarly, exposure to immature dendritic cells induces CD8<sup>+</sup> (4) and CD4<sup>+</sup> (14) Tr, while CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells may induce CD8<sup>+</sup> Tr (7).

The Notch pathway is another candidate molecule involved in the development of inducible Tr. In mice, antigen presented by dendritic cells overexpressing a Notch ligand leads to the differentiation of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells into regulatory cells which can transfer tolerance to naïve animals (11). Members of the Notch family are transmembrane receptors that play a role in cell fate decisions during the development of organisms from *Drosophila* spp. to humans (1). The Notch gene family encodes large transmembrane proteins (9), and four Notch isoforms (Notch 1 to 4) have been isolated from mammals (29). The Notch receptor has a series of ligands, which are classified into two groups based on the prototype Serrate and Delta ligands first identified in *Drosophila* spp. In mammals, two Delta-like molecules (Delta 1 and Delta 3) and two Serrate-like molecules (Jagged-1 and Jagged-2) have been identified. Little is currently known about the specificity of the various Notch receptors for each ligand (1, 9). Signals generated through Notch-Jagged interactions result in proteolytic processing of Notch and translocation of the Notch intracellular domain to the nucleus, where it interacts with transcriptional regulators. Activation of the intracellular domain inhibits differentiation along a particular pathway but leaves cells competent to adopt different fates (1).

In the hemopoietic system, Notch is expressed by stem cells while Notch ligands are found in bone marrow stroma, which provides the microenvironment necessary for stem cell survival and differentiation. The Notch signal modulates responses to cell type specification cues mediated by the multiplicity of growth and differentiation factors present in this environment and renders the most primitive progenitor cells more resistant

\* Corresponding author. Mailing address: Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, 6621 Fannin St., Houston, TX 77030. Phone: (832) 824-4663. Fax: (832) 825-4668. E-mail: mkbrenne@txccc.org.

to differentiation (13, 42). The importance of these receptors in hemopoietic and lymphoid development has become increasingly evident (3, 25, 30).

Because Notch and its ligands play an important role in T-cell development and in the recruitment of inducible Tr in mice, we investigated whether or not the Notch pathway may play a similar role in humans. We looked at the effects on T-cell function of the coexpression of high levels of the Notch ligand Jagged-1 by autologous B cells infected with Epstein-Barr virus (EBV). This is a well-defined antigen-specific system in which EBV-lymphoblastoid cell line cells (EBV-LCL) function as antigen-presenting cells (33) which readily induce proliferative and cytotoxic effector functions that are viral-antigen specific when the cells are cocultured with T lymphocytes from EBV-immune donors (32).

We found that EBV-LCL overexpressing the Notch ligand Jagged-1 induce Tr (in both the CD4 and CD8 subpopulations) that specifically inhibit the proliferative and cytotoxic memory responses to EBV proteins. These Tr produce interleukin-10 (IL-10) and are also able to inhibit the proliferative and cytotoxic anti-EBV T-cell responses of autologous T lymphocytes that have not been exposed to Notch ligand.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells and cell lines.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy EBV-seropositive adults. EBV-LCL were obtained by EBV (B95-8) immortalization of mature B cells from the same donors. A bone marrow stromal cell line was used as the positive control for Jagged-1 protein expression in Western blotting (41).

All cells were cultured in complete medium prepared with RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Walkersville, Md.) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (HyClone), antibiotics, and L-glutamine and maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. For TGF-β cytokine assessment, cells were cultured in X-VIVO-15 serum-free medium (BioWhittaker).

**Adenoviral vector.** EBV-LCL were transduced by using the chimeric adenovirus Ad5/F35. This vector, as previously described by Shayakhmetov and Lieber (36), is an adenovirus serotype 5 (Ad5) virus in which parts of the fiber gene have been replaced by the fiber from an adenovirus serotype 35 virus. This chimeric vector is coxsackie adenovirus receptor independent and has improved transduction efficiency for coxsackie adenovirus receptor-negative lymphoid cells compared with Ad5 vectors (45). The cDNA for the full-length Jagged-1 or enhanced green fluorescent protein (EGFP; Clontech, Palo Alto, Calif.) was cloned into the shuttle plasmid pShuttle-X (Clontech). The entire region containing the cytomegalovirus (CMV) promoter, Jagged-1, or EGFP, followed by a simian virus 40 polyadenylation site, was excised by I-CeuI and pL-SceI digestion and then transferred to pAd5/F35 cleaved by using the same restriction enzymes to form pAd5/F35-Jagged-1 or pAd5/F35-EGFP. Both Ad5/F35 vectors were produced by Lipofectamine (Life Technologies, Gaithersburg, Md.) transfection of the human embryonic kidney (HEK) 293 cell line. Large-scale amplification of a single plaque generated in transfected HEK293 cells was followed by three consecutive freeze-thaw cycles for viral extraction. Both viruses were purified with a double series of cesium-chloride gradient ultracentrifugations and desalted on a dialysis cassette (Pierce, Rockford, Ill.), and titers were established by plaque assay using HEK293 cells. Viral titers were also quantitated by measurement of optical density at 260 nm, and the particle-to-PFU ratios were 160 and 200 for Ad5/F35 Jagged-1 and Ad5/F35 EGFP, respectively. These ratios are higher than those obtained in Ad5-based systems but are typical for the Ad5/F35 hybrid (45).

**Western blotting.** To detect Jagged-1 protein expressed in transduced EBV-LCL and bone marrow stromal cell lines, cell extracts were prepared from pelleted cells by lysing in Laemmli's sample buffer, boiled for 5 min, and spun to remove insoluble material. Under reducing conditions, the cell lysates containing equal amounts of proteins were run in sodium dodecyl sulfate–6% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, Calif.). The membranes were probed with antibodies to Jagged-1 (H-114; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.) for 1 h at room temperature and then visualized with horseradish peroxidase-coupled anti-immunoglobu-

ulin (705-0350147; Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, Pa.) for 30 min at room temperature. Detection was achieved using the ECL system (Amersham). After stripping, the membrane was reprobed with anti-vinculin or anti-actin antibodies (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo.). The same method was used to detect HES-1, but using sodium dodecyl sulfate–15% polyacrylamide gel electrophoresis. The anti-HES-1 antibody (clone 35) was purchased from BD Pharmingen (San Diego, Calif.).

**RNA extraction and cDNA synthesis.** Total RNA was extracted by using an RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, Calif.). RNA was eluted in 40 ml of RNase-free water and stored at –80°C until use. Contaminating DNA was removed by DNase I digestion (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.). RNA was then reversed transcribed to cDNA (DNA) by using random hexamers and SuperScript II reverse transcriptase (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR; Gibco).

**Real-time quantitative-PCR assay.** For detection and quantification of Jagged-1, HES-1, and Deltex transcripts, a real-time PCR assay was developed using TaqMan technology (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) (20). Primers and a probe spanning the junction between exon 22 and exon 23 of the Jagged-1 gene (GenBank database sequence accession number U73936) were designed by using Primer Express software (PE Applied Biosystems). The sequences for the designed primers and probe are as follows: forward primer (exon 22), 5'-ACC TGC CAG TGC CTG AAT G-3'; reverse primer (exon 23), 5'-AGG CAA GGT CGA GGG CC-3'; probe (junction between exons 22 and 23), 5'-FAM-ACG GAT CGC CTG CTC AAA GGT CTG-TAMRA-3', with FAM and TAMRA representing the reporter and quencher dye, respectively, as a positive control and calibrator for relative quantification (PE Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. The sequences for the HES-1 primers and probe are as follows: forward primer (exon 6), 5'-TGG GTG CCA AGC ACT GC-3'; reverse primer (exon 7), 5'-TCG-TGA-CCA-CCT-TGT-TT T-TCT-G-3'; probe (junction between exons 6 and 7), 5'-FAM-AAG-GAA-GT G-GTC-GAA-GCT-CAC-GTG-GA-TAMRA-3'. The sequences for the Deltex primers and probe are as follows: forward primer (exon 5), 5'-TGG-TTC-GA A-GAT-ACA-TGC-AGA-AG-3'; reverse primer (exon 6), 5'-ACC-AGT-CGC-TCC-ATG-CAG-AT-3'; probe (junction between exons 5 and 6), 5'-FAM-TG A-AAA-ACC-CAC-CTG-ATG-AGG-ACT-GCA-C-TAMRA-3'. RNA without reverse transcription was run in parallel for each sample. PCR amplification was performed with 2× TaqMan Universal Master Mix (PE Applied Biosystems) with 300 nM concentrations of primers and 200 nM concentrations of probe, 10 µl of cDNA, and nuclease-free water (Promega, Madison, Wis.). All samples were analyzed in duplicate. Amplification was performed by using the ABI PRISM 7700 sequence detection system (PE Applied Biosystems) and consisted of 2 min at 50°C, (inactivation of possible carryover contamination by uracil N'-glycosylase [UNG]) and 40 two-step cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. Threshold ( $C_T$ ) cycles of amplifications, where the fluorescence plots crossed a defined baseline, were determined for each sample. For relative quantification, the expression in samples was normalized by comparison with the rRNA amount by using the  $\Delta\Delta C_T$  method as described in detail elsewhere (21).

**Cell cultures.** Primary cocultures were performed with  $5 \times 10^4$  gamma-irradiated (at 4,000 cGy) stimulator EBV-LCL transduced by Ad5/F35 Jagged-1 and  $2 \times 10^6$  responder autologous PBMC or enriched T lymphocytes (see below) at a final ratio of 1:40 in a 24-well plate (Nunc, Oslo, Norway) in 2 ml of complete medium. Other ratios of responder cells to EBV-LCL were also tested as described in Results. Viable cells were harvested after Ficoll density gradient centrifugation on day 10, washed, and used in secondary cocultures. Control cocultures were stimulated with gamma-irradiated EBV-LCL either nontransduced or transduced with Ad5/F35 EGFP at identical ratios. For cytokine measurements, 400 µl of culture supernatants were harvested on days 3 and 8 and stored at –20°C for future assays. Secondary cocultures were performed with PBMC and nontransduced gamma-irradiated autologous EBV-LCL at a ratio of 10:1 with or without Tr. Tr were used unseparated or as individual CD<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>−</sup>, CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, or CD8<sup>+</sup>CD25<sup>−</sup> populations purified by positive or negative selection. CD4, CD8, and CD25 MACS microbeads and Multisort kits were used for positive selection. CD4, CD8, CD56, CD19, and CD14 MACS microbeads were used for negative selection (Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.). The purity of the populations, evaluated by fluorescence-activated cell sorter analysis (FACScalibur; Becton Dickinson, San Jose, Calif.), was always >95%. Donor T lymphocytes were purified from PBMC by positive selection, and the purity was routinely >98%. To demonstrate the functional purity of the T cells, an adenovirus (Ad5/F35 EGFP; multiplicity of infection [MOI] = 2 PFU/cell) was used as an antigen to measure the proliferative response. T cells alone ( $2 \times 10^5$ ) had no measurable specific [<sup>3</sup>H]thymidine ([<sup>3</sup>H]thy) incorporation ([<sup>3</sup>H]thy with antigen minus [<sup>3</sup>H]thy without antigen), while in the presence of adherent

cells from peripheral blood, specific [<sup>3</sup>H]thy incorporation rose to 26,000 ± 3,500 cpm after 5 days of culture.

The T cells used to detect Deltex mRNA, HES-1 mRNA, and protein were prepared by stimulating 2 × 10<sup>6</sup> PBMC with 5 × 10<sup>4</sup> gamma-irradiated (at 4,000 cGy) autologous EBV-LCL transduced by Ad5/F35 Jagged-1. T cells were harvested at 12, 24, and 48 h by using a pan-T-cell isolation kit (Miltenyi Biotec). The purity was constantly >99%, and no residual EBV-LCL (CD19 staining) were detectable.

To assess antigen specificity, soluble *Candida* antigens were added to 2 × 10<sup>5</sup> PBMC at a concentration of 250 µg/ml in U-bottom 96-well plates (Nunc) in 200 µl of complete medium with 2 × 10<sup>5</sup> autologous Tr. For responses to CMV, we substituted soluble CMV antigens at a concentration of 1 µg/ml to 2 × 10<sup>5</sup> PBMC.

**Transwell experiments.** To assess the contribution of soluble factors to cellular inhibition, experiments were performed in 24-well plates. 10<sup>6</sup> PBMC were stimulated with 10<sup>5</sup> autologous nontransduced EBV-LCL with or without 10<sup>6</sup> Tr either added directly to the culture or placed in Transwell chambers (0.4-µm pore size; Costar). After 7 days of culture, cells were transferred to 96-well plates and proliferation was measured using liquid scintillation counting.

**Monitoring of proliferation.** PBMC and T cells were cultured in 200-µl U-bottom 96-well plates (Nunc) with gamma-irradiated (at 4,000 cGy) transduced or nontransduced EBV-LCL with or without Tr. Proliferation was analyzed by [<sup>3</sup>H]thy incorporation, and 1 µCi of [<sup>3</sup>H]thy was present for the last 18 h of culture. [<sup>3</sup>H]thy uptake was measured by a liquid scintillation counter (Matrix 96 Beta counter; Canberra Packard, Meriden, Conn.) and expressed as mean counts per minute (± standard deviations [SD]) of triplicate measurements. A trypan blue exclusion before each assay constantly showed >95% viability in all conditions.

**Assessment of cytokine production.** Day 3 and 8 supernatants, previously frozen at -20°C, were analyzed for their IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, gamma interferon, and tumor necrosis factor alpha contents by using a cytometric bead array kit (Pharmingen/BD Biosciences). X-VIVO-15 culture supernatants were assessed for TGF-β content by enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine ELISA kit; R&D Systems, Minneapolis, Minn.) according to the manufacturer's instructions.

**Flow cytometry analysis.** Cultured cells were washed, stained for 20 min at 4°C with optimal dilution for each antibody, and analyzed by flow cytometry (FACScalibur and CELLQuest software; Becton Dickinson). A total of 10<sup>4</sup> events were analyzed for each determination. Cells were stained with fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, or peridinin chlorophyll protein (PerCP) monoclonal antibodies (MAb) to CD4 (clone L200), CD8 (RPA-T8), CD25 (M-A251), CD40 (5C3), CD80 (L307.4), CD86 (FUN-1), HLA-A, -B, and -C (G46-2.6), and HLA-DR (L243) (BD-Biosciences).

**Cytotoxicity by chromium-51 release assay.** Cytotoxic activity was assessed by 4-h chromium-51 (<sup>51</sup>Cr) release from labeled autologous EBV-LCL and K562 cell lines. The assays were performed after two stimulations by EBV-LCL (non-transduced or transduced) in primary and secondary cocultures. Briefly, 1.5 × 10<sup>6</sup> target cells were labeled with 3.7 mBq (100 mCi) of <sup>51</sup>Cr (Amersham) and used at 5,000 cells per well. Multiple effector-to-target cell (E:T) ratios were tested in triplicate, and cytotoxic activity was expressed as a percentage of specific lysis. The percentage of specific <sup>51</sup>Cr release was calculated as follows: percent lysis = [(experimental released cpm - spontaneous cpm)/(total lysis cpm - spontaneous cpm)] × 100. Viable effector and target cells were systematically selected by Ficoll density gradient centrifugation before each assay. The viability (>95%) was confirmed by trypan blue exclusion. The anti-class I (HLA-A, -B, and -C antigen; clone W6/32) and anti-class II (HLA DP, -DQ, and -DR antigen; clone CR3/43) antibodies used for blocking experiments were purchased from Dako (Denmark) and used at concentrations previously found to be optimal for specific blocking of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) activity in the EBV system (32, 33, 38).

**Statistical analysis.** All data are presented as means ± 1 SD. The Student *t* test (Statistica Software, Tulsa, Okla.) was used to compare results between different conditions of culture. The significance level was set at a *P* value of <0.05. The numbers of experiments analyzed are given in each figure legend.

## RESULTS

**Transduction of EBV-LCL by Ad5/F35 Jagged-1 results in expression of transcripts and functional protein.** Transduction of EBV-LCL by Ad5/F35 Jagged-1 was assessed by quantitative real-time PCR and Western blotting. Forty-eight hours

after transduction at an MOI of 100 PFU/cell, real-time PCR amplification showed a >60-fold increase in the Jagged-1 mRNA copy number in transduced cells (Fig. 1A). Western blotting confirmed the presence of a 180-kDa band representing the Jagged-1 protein (Fig. 1B).

To demonstrate the functionality of the transgenic Jagged-1 protein and the ability of T cells to respond to this stimulus, we used real-time PCR to quantitate expression of the HES-1 (12) and Deltex (44) genes, since both of these encode transcriptional regulators activated by the Notch signal. As shown in Fig. 1C, both genes were overexpressed at 12 h after exposure to EBV-LCL Jagged-1 (8.5 times for HES-1 [*P* < 0.001] and three times for Deltex [*P* < 0.001]) and levels normalized by 24 and 48 h. Western blotting showed overexpression of the HES-1 protein at 24 h, confirming activation of the Notch pathway (Fig. 1D).

The viability of EBV-LCL measured by trypan blue exclusion was >90% at 48 h after transduction. Transduction and expression of Jagged-1 had no effect on EBV-LCL expression of MHC molecules (HLA-A, -B, -C, -DQ, and -DR) or that of the costimulator molecules CD40, CD80, and CD86 (data not shown).

By comparison, 70 to 80% of EBV-LCL transduced with an Ad5/F35 EGFP at an MOI of 100 PFU/cell expressed GFP 48 h after transduction (data not shown).

**Activated Notch inhibits proliferative and cytotoxic immune responses.** To assess the effect of activated Notch on T-cell memory immune responses to autologous EBV-LCL, PBMC from healthy EBV seropositive donors were cocultured with autologous EBV-LCL Jagged-1. In the absence of Jagged-1, this well-characterized system induces expansion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> EBV-specific memory T cells, manifested by a readily detectable proliferative and cytotoxic response directed toward the stimulating EBV-positive target cells (19). In five experiments, proliferation was inhibited by a mean of 35% on day 5 when the ratio of PBMC to EBV-LCL was 40:1 (*P* = 0.001) compared with cultures containing control vector-transduced EBV-LCL (Fig. 2A). Figure 2B shows that cytotoxic effector function against EBV-LCL was also significantly reduced (by ca. 65%) compared to controls (*P* < 0.02). As a confirmation that the cytotoxic activity we observed was attributable to conventional CTL, we added MAb directed against class I and class II MHC antigens. Figure 2C shows that these produced 45% (*P* = 0.009) and 17% (*P* = 0.1) blocking, respectively, of the cytotoxic response in the nontransduced cocultures. Inhibition in cocultures with EBV-LCL Jagged-1 was the same, with residual killing blocked by 48% (class I MAb, *P* = 0.01) and 0% (class II MAb, *P* = 0.2) (Fig. 2C).

To discover whether inhibition could be obtained by direct activation of T cells by EBV-LCL Jagged-1 or whether more complex multilineage interactions were involved, we repeated these experiments using purified T lymphocytes instead of PBMC. In five separate experiments, identical inhibitory effects on both proliferation and cytotoxicity were obtained, indicating that direct stimulation of T cells by EBV-LCL Jagged-1 can induce inhibitory effectors (Fig. 2D and E).

**Inhibition of immune response is transferable.** We next determined whether the EBV-LCL Jagged-1-stimulated T cells (i.e., Tr) functioned as regulators of the immune response by measuring their effects on proliferation and cytotoxicity of

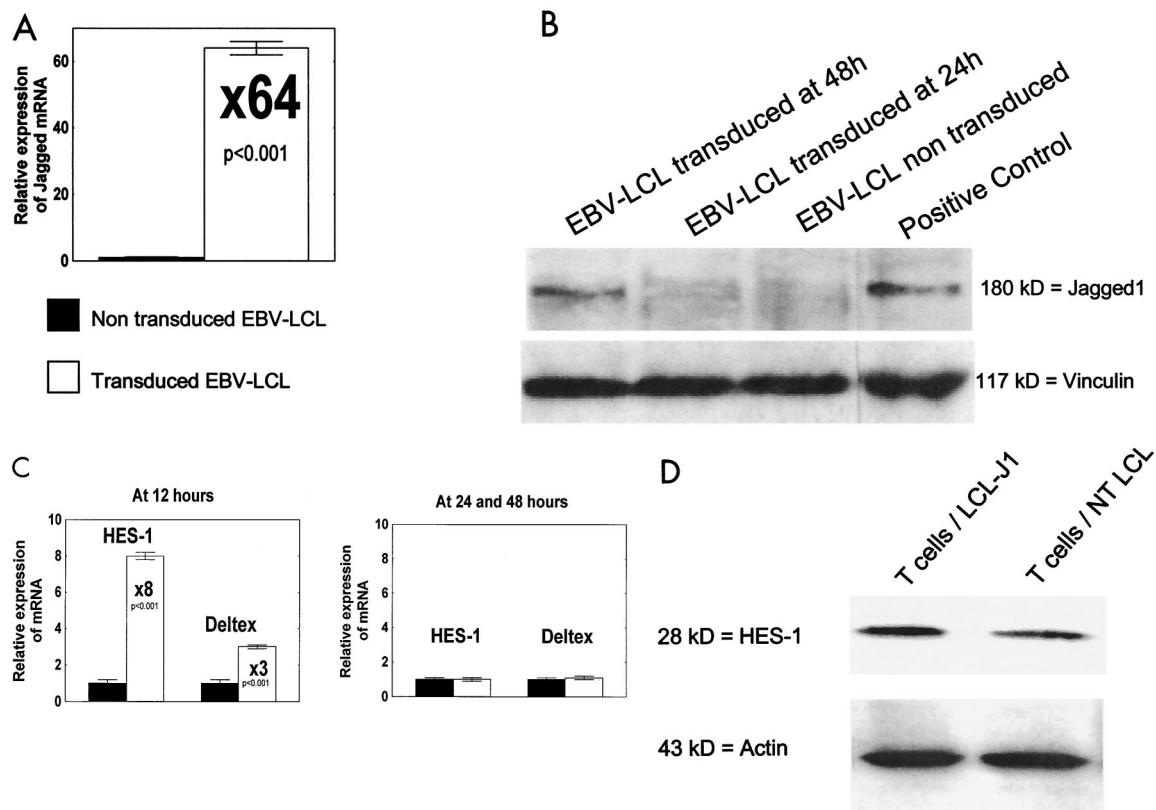


FIG. 1. Transduction of EBV-LCL by Ad5/F35 Jagged-1 with subsequent activation of Notch downstream signal in T cells. (A) Results of real-time PCR showing overexpression of Jagged-1 mRNA ( $\times 64$ ) in transduced EBV-LCL at 48 h (MOI = 100 PFU/cell) compared with that in nontransduced EBV-LCL. Data are means  $\pm$  SD from three experiments. (B) Results of Western blotting showing the Jagged-1 protein of approximately 180 kDa 48 h after transduction. Human bone marrow stromal cells were used as the positive control. Shown are the results of one experiment that is representative of three. (C) Results of real-time PCR showing HES-1 and Deltex mRNA expression levels in T cells stimulated by nontransduced autologous EBV-LCL (filled columns) compared with those for autologous EBV-LCL Jagged-1 (open columns). Overexpression after stimulation with EBV-LCL Jagged-1 was observed at 12 h but not at 24 or 48 h. Data are means  $\pm$  SD from three experiments. (D) Results of Western blotting showing an overexpression of the HES-1 protein (28 kDa) in T cells 24 h after stimulation with EBV-LCL Jagged-1. Shown are the results of one experiment that is representative of three. T cells/LCL-J1, T cells stimulated by autologous EBV-LCL transduced with Ad5/F35 Jagged-1; T cells/NT LCL, T cells stimulated by nontransduced autologous EBV-LCL.

fresh T lymphocytes cultured with nontransduced autologous EBV-LCL. Tr alone had no measurable proliferation and minimal proliferation when cultured with fresh T cells or with nontransduced EBV-LCL (Fig. 3A). Addition of Tr to fresh autologous T cells and autologous EBV-LCL, however, inhibited proliferation proportional to the ratio of Tr to T-responder cells, and at a ratio of 1:1, the response was reduced by 65% ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3B). Moreover, addition of Tr to fresh cocultures of responder T cells and autologous EBV-LCL also significantly inhibited the generation of a cytotoxic response (Fig. 3C).

**Phenotype of Tr induced following Jagged-1 exposure.** Tr populations in mice and humans may produce IL-10 (10, 22, 27, 31). Measurement of IL-10 in supernatants of primary cocultures (induction phase) showed a greater-than-ninefold increase in the level of this cytokine in the presence of Jagged-1-expressing EBV-LCL versus control EBV-LCL ( $P = 0.002$ ) (Fig. 4). Productions of IL-2, IL-4, IL-5, gamma interferon, and tumor necrosis factor alpha were unchanged. Interestingly, there was no increase in the level of TGF- $\beta$ , a cytokine that has been associated with some Tr subpopulations (10, 22, 31). We

next compared the activities of CD4-, CD8-, and CD25-defined subsets on the proliferative response of fresh T cells to autologous EBV-LCL. As shown in Fig. 5, all populations tested had a suppressive activity, with the greatest inhibition produced by CD8 $^{+}$ CD25 $^{-}$  cells (88%) and the least produced by CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$  cells (50%). Figure 6 shows the failure of fresh supernatants from Tr to inhibit proliferation and the abolition of suppression when Tr are separated from responder cells by a semipermeable membrane, implying that inhibition requires cell-cell contact and is independent of soluble factors.

**Tr are EBV specific.** To determine the specificity of the inhibitory response, we measured the capacity of fresh T cells to respond to *Candida* and CMV antigens after the addition of EBV-LCL Jagged-1-generated Tr. Figure 7A shows that even when the response to autologous EBV-LCL is significantly inhibited ( $P < 0.001$ ), the proliferative response of fresh T cells to *Candida* and CMV is fully intact. Tr alone, Tr plus *Candida*, Tr plus CMV, and Tr plus PBMC had no measurable proliferation (Fig. 7B). Hence, activation of Notch by Jagged-1-expressing EBV-LCL inhibits the anti-EBV response while sparing responses to viral and fungal antigens.

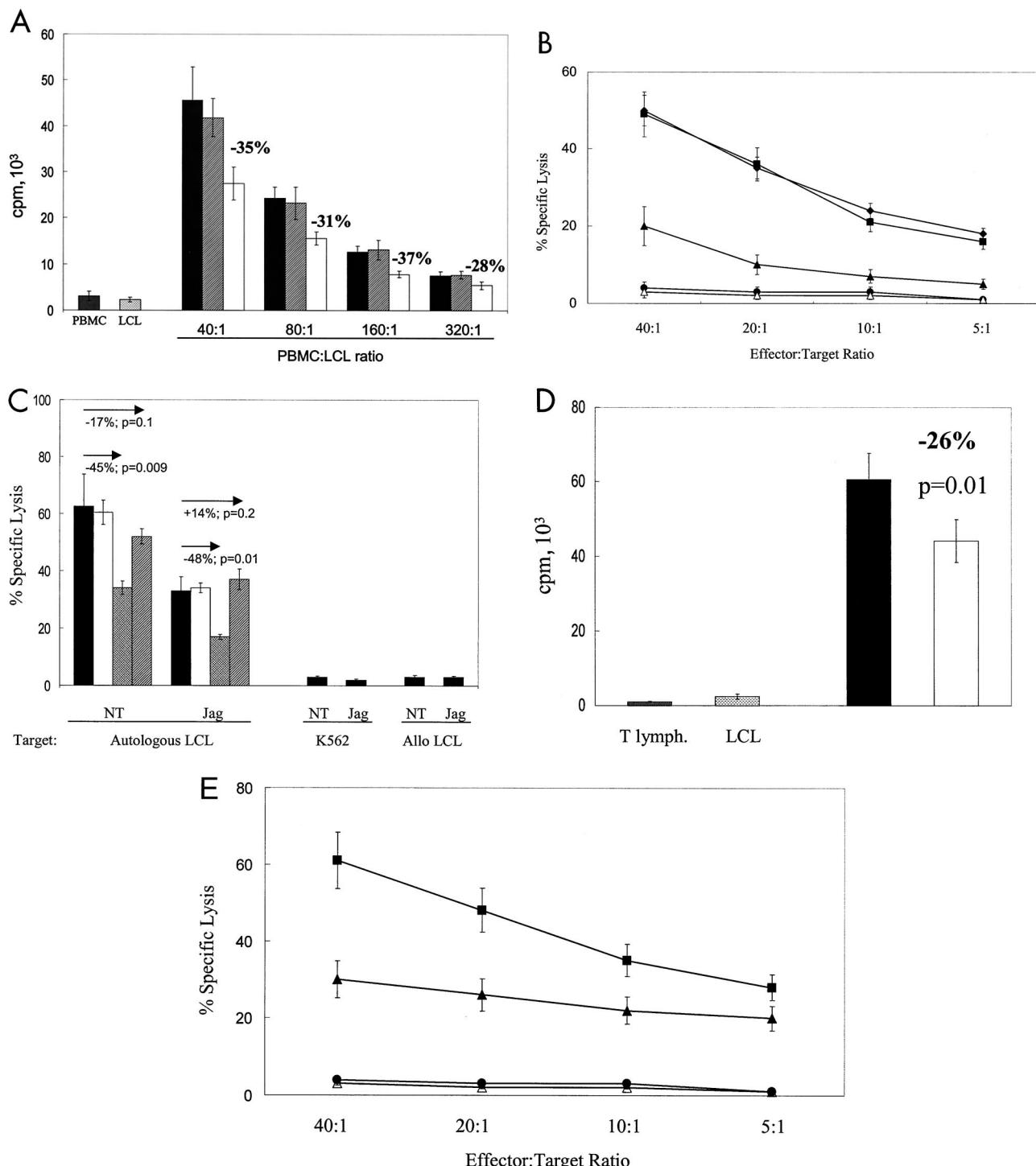
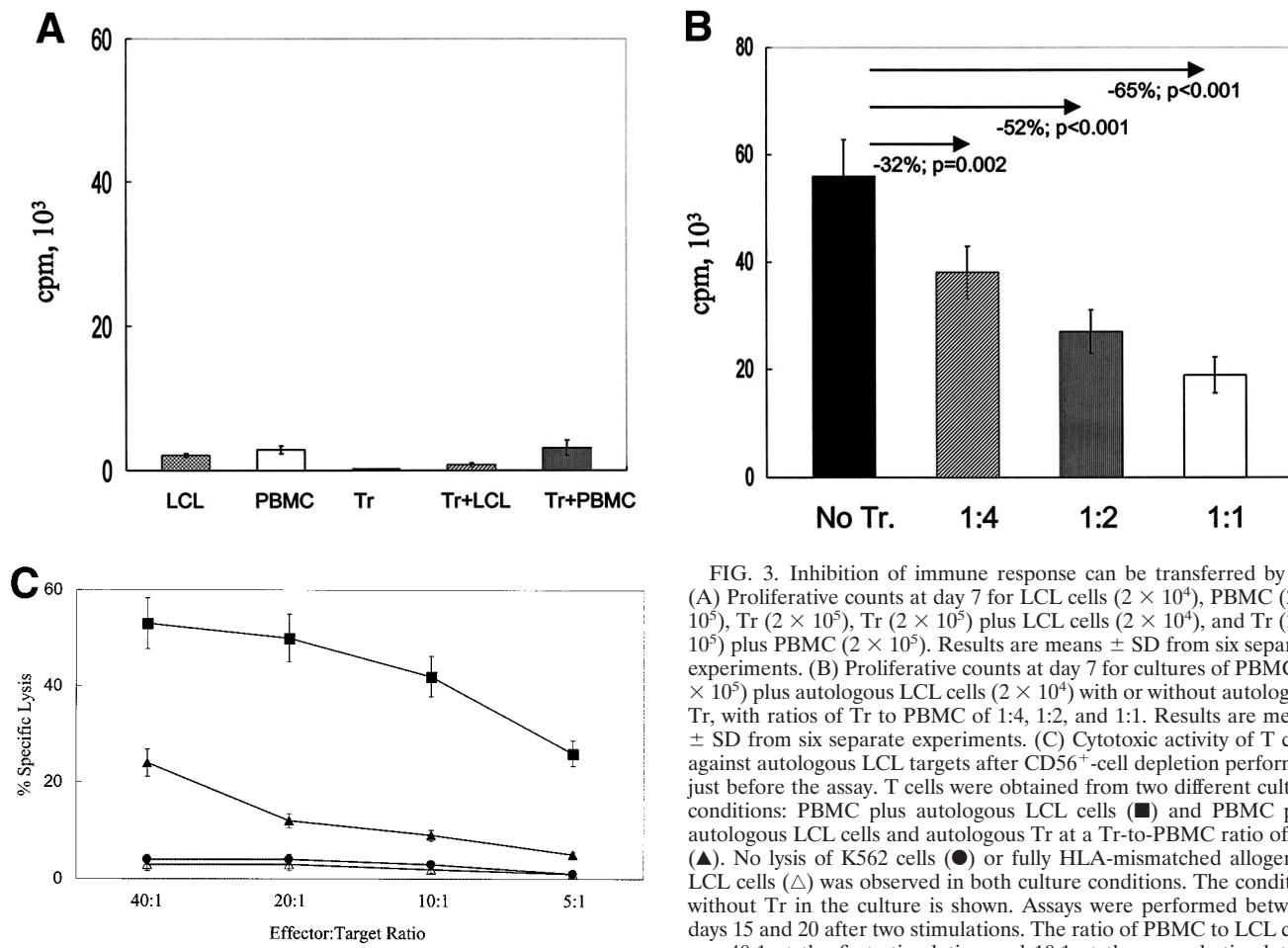


FIG. 2. Activated Notch inhibits proliferative and cytotoxic immune responses. (A)  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation at day 5 in three different culture conditions: PBMC plus autologous LCL cells (filled columns), PBMC plus autologous LCL cells transduced by Ad5/F35 EGFP (hatched columns), and PBMC plus autologous LCL cells transduced by Ad5/F35 Jagged-1 (open columns). Four ratios of PBMC to LCL cells were tested as indicated. For each ratio, the inhibition related to Jagged-1 expression was significant ( $P < 0.01$ ). Counts of PBMC alone and LCL cells alone are shown. Data shown are means  $\pm$  SD from five experiments. (B) Cytotoxic activity of T cells against autologous LCL targets after CD56<sup>+</sup> cell depletion performed just before the assay. T cells were obtained from three different culture conditions: PBMC plus autologous LCL cells (■), PBMC plus autologous LCL cells transduced by Ad5/F35 EGFP (▲), and PBMC plus autologous LCL cells transduced by Ad5/F35 Jagged-1 (▲). No lysis of K562 cells (●) or fully HLA-mismatched allogeneic LCL cells (△) was observed in all three culture conditions. The nontransduced condition is shown. Assays were performed between days 15 and 20 after two stimulations. The ratio of PBMC to LCL cells was 40:1 at the first stimulation and 10:1 at the second stimulation. Data shown are means  $\pm$  SD from three experiments. The inhibition related to Jagged expression is significant for each E:T ratio ( $P < 0.02$ ). (C) Cytotoxic activity of T lymphocytes stimulated by nontransduced LCL cells (NT) or LCL Jagged-1 (Jag). Shown are results for T lymphocytes plus autologous LCL cells (filled columns), T lymphocytes plus autologous LCL lines and isotype control (open columns). Data shown are means  $\pm$  SD from three experiments. (D) Proliferative response of T lymphocytes and LCL cells to Ad5/F35 EGFP (black bar) and Ad5/F35 Jagged-1 (white bar) infected LCL cells. Data shown are means  $\pm$  SD from three experiments. The inhibition related to Jagged expression is significant ( $p = 0.01$ ). (E) Cytotoxic activity of T lymphocytes against autologous LCL targets. Data shown are means  $\pm$  SD from three experiments. The inhibition related to Jagged expression is significant ( $p = 0.01$ ).



**FIG. 3.** Inhibition of immune response can be transferred by Tr. (A) Proliferative counts at day 7 for LCL cells ( $2 \times 10^4$ ), PBMC ( $2 \times 10^5$ ), Tr ( $2 \times 10^5$ ), Tr ( $2 \times 10^5$ ) plus LCL cells ( $2 \times 10^4$ ), and Tr ( $2 \times 10^5$ ) plus PBMC ( $2 \times 10^5$ ). Results are means  $\pm$  SD from six separate experiments. (B) Proliferative counts at day 7 for cultures of PBMC ( $2 \times 10^5$ ) plus autologous LCL cells ( $2 \times 10^4$ ) with or without autologous Tr, with ratios of Tr to PBMC of 1:4, 1:2, and 1:1. Results are means  $\pm$  SD from six separate experiments. (C) Cytotoxic activity of T cells against autologous LCL targets after CD56<sup>+</sup>-cell depletion performed just before the assay. T cells were obtained from two different culture conditions: PBMC plus autologous LCL cells (■) and PBMC plus autologous LCL cells and autologous Tr at a Tr-to-PBMC ratio of 1:1 (▲). No lysis of K562 cells (●) or fully HLA-mismatched allogeneic LCL cells (△) was observed in both culture conditions. The condition without Tr in the culture is shown. Assays were performed between days 15 and 20 after two stimulations. The ratio of PBMC to LCL cells was 40:1 at the first stimulation and 10:1 at the second stimulation. Data shown are means  $\pm$  SD from three experiments. The inhibition is significant for each E:T ratio ( $P < 0.01$ ).

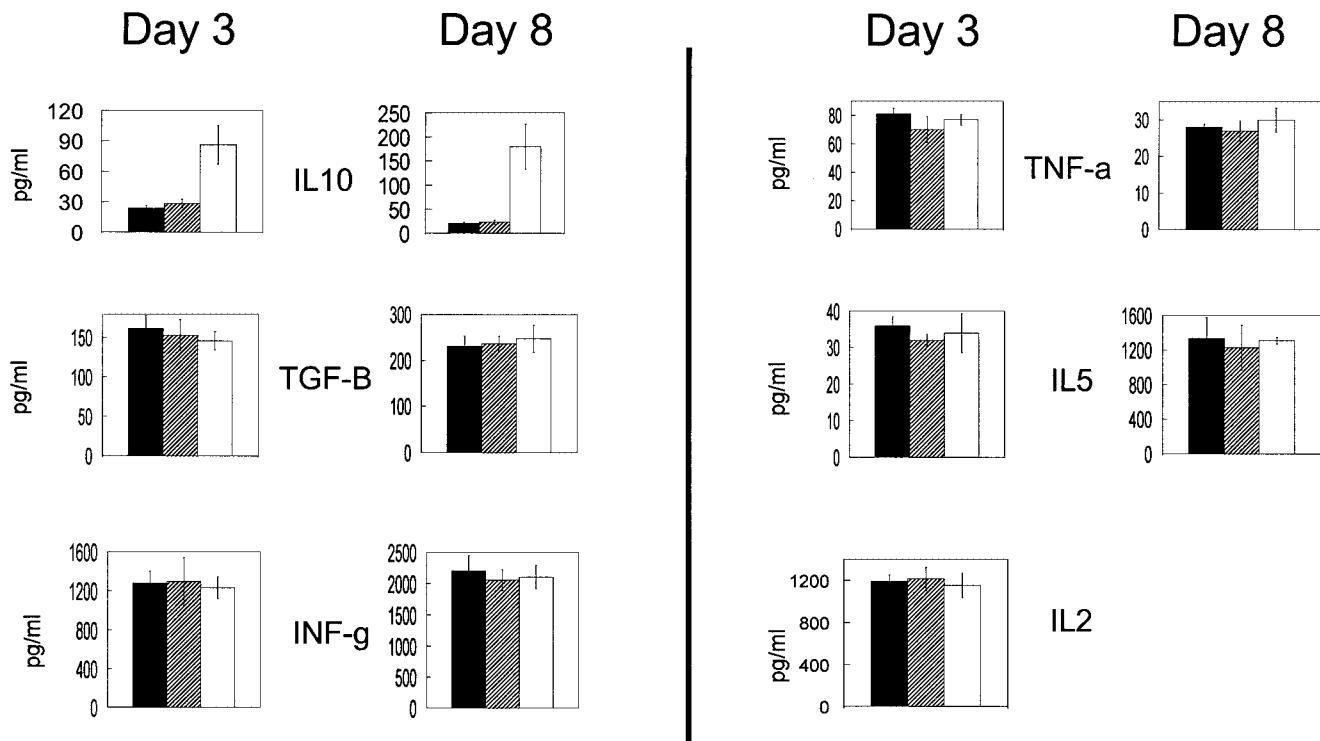
## DISCUSSION

Our results indicate that Notch activation by overexpression of the Jagged-1 ligand on EBV-LCL can drive EBV-specific human T cells towards tolerance, affecting both proliferative and cytotoxic responses. Tolerized T cells are transferable, inhibiting the induction of an immune memory response to EBV. Inhibition is antigen specific and mediated by Tr which

are in both the CD4 and CD8 subsets and have increased production of IL-10. Inhibition is also dose dependent and requires cell-cell contact.

Notch was originally known for its role in lateral inhibition, in which a group of cells with equivalent developmental potentials initially express both Notch and Notch ligand. Notch-mediated signaling between these cells regulates their differentiation. Feedback loops linking Notch signaling with Notch

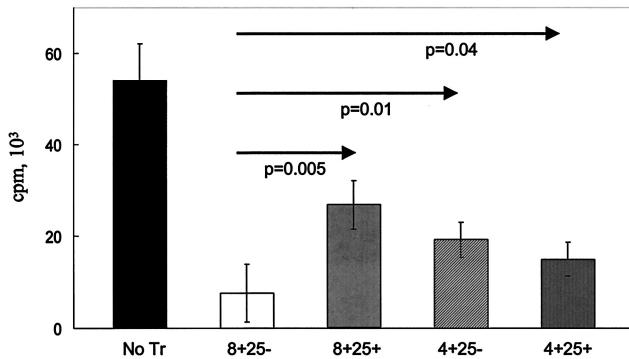
columns), T lymphocytes plus autologous LCL cells plus anti-MHC class I MAb (cross-hatched columns), and T lymphocytes plus autologous LCL cells and anti-MHC class II MAb (hatched columns).  $2 \times 10^6$  T lymphocytes and  $5 \times 10^4$  LCL cells were used in each condition. Assays were performed between days 15 and 20 after two stimulations. The ratio of T cells to LCL cells was 40:1 at the first stimulation and 10:1 at the second stimulation. A CD56<sup>+</sup>-cell depletion was performed just before the assay. Targets were autologous LCL cells, K562 cells, or fully HLA-mismatched allogeneic LCL cells in both conditions (NT and Jag). The effector-to-target cell target ratio was 20:1. (D) [<sup>3</sup>H]thymidine uptake of T cells at day 5 in two different culture conditions: T lymphocytes ( $10^5$ ) plus autologous LCL cells ( $2,500$ ) (filled column) and T lymphocytes ( $10^5$ ) plus autologous LCL cells transduced by Ad5/F35 Jagged-1 ( $2,500$ ) (open column). Counts of T lymphocytes alone and LCL cells alone are shown. Data shown are means  $\pm$  SD from five experiments. (E) Cytotoxic activity of T cells against autologous LCL targets after CD56<sup>+</sup>-cell depletion performed just before the assay. T cells were obtained from two different culture conditions: T lymphocytes plus autologous LCL cells (■) and T lymphocytes plus autologous LCL cells transduced by Ad5/F35 Jagged-1 (▲). No lysis of K562 cells (●) or fully HLA-mismatched allogeneic LCL cells (△) was observed in both culture conditions. The nontransduced condition is shown. Assays were performed between days 15 and 20 after two stimulations. The ratio of T lymphocytes to LCL cells was 40:1 at the first stimulation and 10:1 at the second stimulation. Data shown are means  $\pm$  SD from three experiments. The inhibition related to Jagged expression is significant for each E:T ratio ( $P < 0.05$ ).



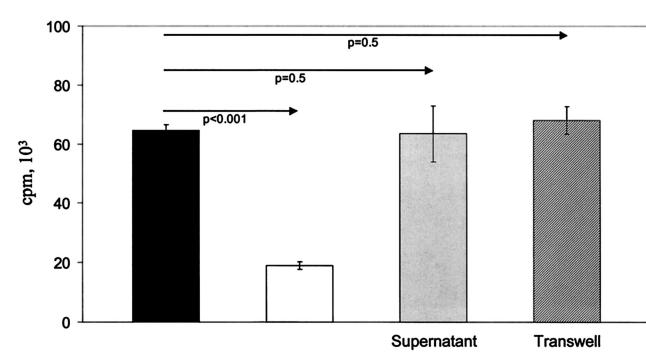
**FIG. 4.** Lymphocytes induced by EBV-LCL overexpressing Jagged-1 produce IL-10. Data indicate cytokine concentrations in culture supernatants at days 3 and 8 in three different culture conditions: PBMC plus autologous LCL cells (filled columns), PBMC plus autologous LCL cells transduced by Ad5/F35 EGFP (open columns), and PBMC plus autologous LCL cells transduced by Ad5/F35 Jagged-1 (hatched columns).  $2 \times 10^6$  PBMC and  $5 \times 10^4$  LCL cells were used in each condition. Data shown are means  $\pm$  SD from four experiments. In all three conditions, no significant amount of IL-4 was detectable at either day 3 or day 8 and no significant amount of IL-2 was detectable at day 8. The increase of IL-10 was significant at days 3 and 8 ( $P = 0.002$ ). No significant difference was observed for the other cytokines.

ligand expression amplify small differences in the level of Notch signaling between neighboring cells. This positive feedback eventually results in a limited number of cells becoming “signaling cells,” which express Notch ligand and differentiate

along a single pathway, whereas neighboring cells become “receiving cells,” which express Notch and adopt a different fate (17). Notch can also regulate cell fate decisions by inductive signaling, the type of interaction that occurs within the hemopoietic system. In this case, Notch and its ligand are expressed



**FIG. 5.** Tr do not have a characteristic phenotype definable by CD4, CD8, or CD25 antigens. Proliferative counts at day 7 in five conditions of coculture: PBMC plus autologous LCL cells at a ratio of 10:1 (No Tr), PBMC plus autologous LCL cells at a ratio 10:1 plus CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tr (8+25-), PBMC plus autologous LCL cells at a ratio of 10:1 plus CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr (8+25+), PBMC plus autologous LCL cells at a ratio of 10:1 plus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tr (4+25-), and PBMC plus autologous LCL cells at a ratio of 10:1 plus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (4+25+). The ratio of Tr to PBMC was 1:1. The inhibition was significant ( $P < 0.01$ ) for each Tr subpopulation when compared to the proliferation without Tr. Data shown are means  $\pm$  SD from four experiments.



**FIG. 6.** The mechanism of inhibition is not mediated by soluble factors and requires cell-to-cell contact. Proliferative counts at day 7 for cultures of PBMC plus autologous LCL cells (filled column); PBMC plus autologous LCL cells and Tr, with Tr added directly to the culture (open column); PBMC plus autologous LCL cells in fresh supernatant of T lymphocytes stimulated with LCL Jagged-1 (harvested at day 8) (Supernatant); and PBMC plus autologous LCL cells and Tr placed in Transwell chambers (Transwell). The ratios of PBMC to LCL cells and of PBMC to Tr were 10:1 and 1:1, respectively. Data shown are means  $\pm$  SD from four experiments.

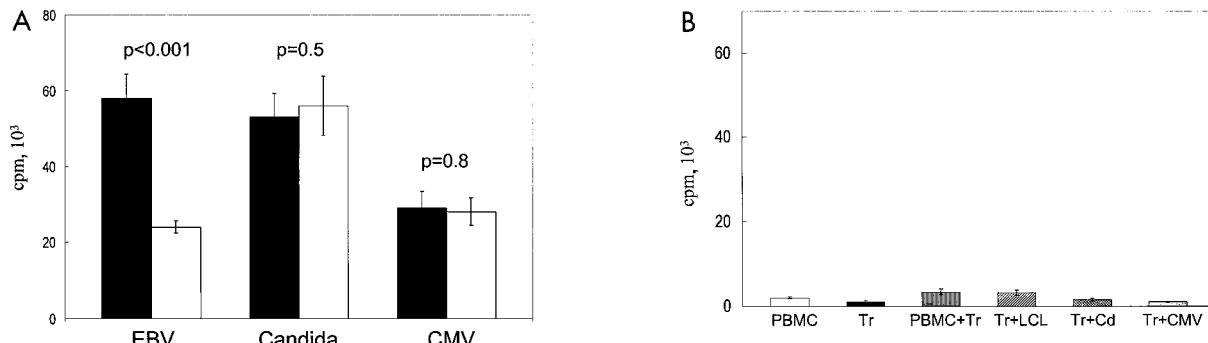


FIG. 7. Tr are EBV specific. (A) Proliferative counts at day 7 of  $2 \times 10^5$  PBMC stimulated with either autologous LCL cells ( $2 \times 10^4$ ) or soluble *Candida* antigen (250 µg/ml) or soluble CMV antigen (1 µg/ml) with (filled columns) or without (open columns) addition of  $2 \times 10^5$  Tr at the beginning of the cultures. Data shown are means ± SD from six experiments. (B) [ $^3$ H]thy uptake at day 7 in the following conditions of culture: PBMC ( $2 \times 10^5$ ), Tr ( $2 \times 10^5$ ), PBMC ( $2 \times 10^5$ ) plus Tr ( $2 \times 10^5$ ), Tr ( $2 \times 10^5$ ) plus LCL cells ( $2 \times 10^4$ ), Tr ( $2 \times 10^5$ ) plus *Candida* antigen (250 µg/ml) (Cd), and Tr ( $2 \times 10^5$ ) plus CMV antigen (1 µg/ml). Data shown are means ± SD from six experiments.

separately on distinct cell types. Signals delivered to the receiving cells during cell-cell interactions induce the expression of genes that favor differentiation toward an alternative fate. Other intrinsic and extrinsic factors can influence both the activity of the Notch signaling pathway and the response of cells to Notch signals (17).

We examined the contribution of Notch activation to antigen-mediated induction of Tr in humans because there is accumulating evidence to suggest that activation of Notch receptors on T cells at the time of antigen exposure can contribute to the induction of functionally inhibitory cells in mice (5). We found that Notch activation of human T cells during antigen exposure induces both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+-</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+-</sup> Tr. This absence of a single phenotype defined on the basis of CD4/CD8/CD25 expression is consistent with the results of previous studies on induced Tr, which have also described populations of Tr that may be CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+-</sup> or CD8<sup>+</sup> (4, 7, 8, 14, 23, 43, 46). The concept that Notch activation plays an important role in the induction of tolerance is also indirectly supported by observations that mesenchymal stem cells, which express high levels of Notch ligands (16, 41), are potent inducers of Tr in both murine and human systems and may suppress graft-versus-host disease in preclinical and clinical allogeneic stem cell transplantation models (2). We do not know what contribution Notch ligand activation makes to the induction or maintenance of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr. However, it is notable that human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr have high levels of Deltex and HES-1, which are transcriptional regulators of the Notch pathway, as well as increased levels of Notch 4 and Delta 1 (26).

In this study, we used EBV antigens presented on autologous B cells (EBV-LCL) to demonstrate the negative regulatory effects of overexpression of the Notch ligand Jagged-1 on the development of human antigen-specific CTL lines. We chose this system because EBV-LCL are excellent antigen-presenting cells. They express high levels of class I and class II MHC molecules as well as the costimulatory molecules CD80, CD86, and CD40. More than 90% of the adult population is EBV-seropositive, and most of these individuals have high levels of circulating memory T cells specific for EBV antigens (28). Hence, in an in vitro culture of EBV-LCL with autolo-

gous T cells from an EBV-seropositive donor, it is routinely possible to generate, reactivate, and expand EBV reactive memory CD4 and CD8 T cells (19). This system enabled us to study the consequences of forced expression of a Notch ligand by these EBV-LCL on the subsequent response to EBV. Based on our present data, our working model is that exposure of human T lymphocytes to target cells expressing antigen and appropriate costimulator signals induces reactivation of antigen-specific T cells. Exposure in the presence of Notch ligand, however, also drives the activation of antigen-specific Tr and the production of IL-10. This cytokine has a central role in the development and activity of murine Tr1 cells. Activation of murine CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of IL-10 produces T cells that are themselves capable of producing IL-10 and of suppressing the proliferation of fresh CD4<sup>+</sup> T cells in an antigen-specific manner. But although IL-10 likely plays a critical role in the induction of Tr and is produced by the regulatory cells themselves, the cytokine is not by itself responsible for the subsequent inhibition of immunity, which generally requires cell-to-cell contact and is antigen specific (27). We found that fresh supernatants of Tr are not inhibitory and that separation of regulatory cells from responder cells by a semipermeable membrane abolishes the suppression, excluding a mechanism of inhibition relying on soluble factors like IL-10. These results are consistent with previous studies showing that while IL-10 may have inhibitory effects on macrophage and dendritic cell maturation and function, it has no negative effects on the ability of EBV-LCL to reactivate T-cell memory nor on the cytotoxic activity of CTL (38). In fact, perforin is upregulated on EBV-CTL by IL-10 (34).

The Tr produced following exposure to EBV-LCL Jagged-1 inhibit the response of secondary cultures of memory T cells in an antigen-specific manner even in the absence of continued activation by Notch ligand. While CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells have high regulatory activity in this system, inhibitory effects are also seen from the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> populations. We do not yet know whether the effects of Notch activation are to "switch" a cell from a responder to a regulatory phenotype or simply to enhance the proliferation of preexisting regulatory cells. This important issue will likely best be addressed by an extensive clonal analysis of individual responding cells. None-

theless, our data identify a molecular pathway for induction of human Tr, showing that Jagged-1 stimulation of human T cells can induce an antigen-specific population of cells capable of inhibiting both proliferative and cytotoxic effector functions. Activation of this pathway may contribute to regulation of responses to viral antigens.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer, France, to S.V., a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to H.-J.W., and a grant from Comitato Maria Letizia Verga per lo studio e la cura della leucemia del bambino (Monza, Italy) and Fondazione Cassa di Risparmio di Genova ed Imperia-Associazione Cristina Bassi contro le leucemie acute dell'adulto (Genova, Italy) to E.B.

#### REFERENCES

- Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, and M. E. Fortini. 1995. Notch signaling. *Science* **268**:225–232.
- Bartholomew, A., C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker, R. Deans, A. Moseley, and R. Hoffman. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* **30**:42–48.
- Deftou, M. L., and M. J. Bevan. 2000. Notch signaling in T cell development. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:166–172.
- Dhopakar, M. V., and R. M. Steinman. 2002. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* **100**:174–177.
- Dieckmann, D., H. Plötner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* **193**:1303–1310.
- Gavin, M. A., S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, and A. Rudensky. 2002. Homeostasis and anergy of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **3**:33–41.
- Gilliet, M., and Y. J. Liu. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**:695–704.
- Gray, J. D., M. Hirokawa, K. Ohtsuka, and D. A. Horwitz. 1998. Generation of an inhibitory circuit involving CD8<sup>+</sup> T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF-β: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3. *J. Immunol.* **160**:2248–2254.
- Greenwald, I., and G. M. Rubin. 1992. Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell* **68**:271–281.
- Groux, H. 2001. An overview of regulatory T cells. *Microbes Infect.* **3**:883–889.
- Hoyme, G. F., I. Le Roux, M. Corsin-Jimenez, K. Tan, J. Dunne, L. M. Forsyth, M. J. Dallman, M. J. Owen, D. Ish-Horowicz, and J. R. Lamb. 2000. Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4<sup>+</sup> T cells. *Int. Immunol.* **12**:177–185.
- Jarriault, S., O. Le Bail, E. Hirsinger, O. Pourquier, F. Logeat, C. F. Strong, C. Brou, N. G. Seidah, and A. Israël. 1998. Delta-1 activation of Notch-1 signaling results in *HES-1* transactivation. *Mol. Cell. Biol.* **18**:7423–7431.
- Jones, P., G. May, L. Healy, J. Brown, G. Hoyne, S. Delassus, and T. Enver. 1998. Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells. *Blood* **92**:1505–1511.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4<sup>+</sup> T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**:1213–1222.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **193**:1285–1294.
- Karanu, F. N., B. Murdoch, L. Gallacher, D. M. Wu, M. Koremoto, S. Sakano, and M. Bhatia. 2000. The Notch ligand Jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **192**:1365–1372.
- Kimble, J., and P. Simpson. 1997. The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:333–361.
- Kohm, A. P., P. A. Carpenter, H. A. Anger, and S. D. Miller. 2002. Cutting edge: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **169**:4712–4716.
- Lakhdar, M., A. Senik, and W. H. Friedman. 1984. Human cytotoxic T lymphocytes (CTL) against Epstein-Barr virus (EBV) infected cells: EBV specificity and involvement of major histocompatibility complex determinants in the lysis exerted by anti-EBV CTL toward HLA-compatible and allogeneic target cells. *Cell Immunol.* **83**:414–421.
- Lie, Y. S., and C. J. Petropoulos. 1998. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**:43–48.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔ(CT)</sup> method. *Methods* **25**:402–408.
- Maloy, K. J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* **2**:816–822.
- Masuyama, J., S. Kaga, S. Kano, and S. Minota. 2002. A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* **169**:3710–3716.
- Miller, J. F., and A. Basten. 1996. Mechanisms of tolerance to self. *Curr. Opin. Immunol.* **8**:815–821.
- Milner, L. A., and A. Bigas. 1999. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* **93**:2431–2448.
- Ng, W. F., P. J. Duggan, F. Ponchel, G. Matarese, G. Lombardi, A. D. Edwards, J. D. Isaacs, and R. I. Lechner. 2001. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* **98**:2736–2744.
- Read, S., and F. Powrie. 2001. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:644–649.
- Rickinson, A. B., S. P. Lee, and N. M. Steven. 1996. Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr. Opin. Immunol.* **8**:492–497.
- Robey, E. 1997. Notch in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:551–557.
- Robey, E. 1999. Regulation of T cell fate by Notch. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:283–295.
- Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* **182**:68–79.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. Loftin, C. Li, R. A. Krance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop. 1995. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* **345**:9–13.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. K. Loftin, J. W. Sixbey, Y. Gan, D. K. Srivastava, L. C. Bowman, R. A. Krance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop. 1998. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* **92**:1549–1555.
- Santin, A. D., P. L. Hermonat, A. Ravaggi, S. Bellone, S. Pecorelli, J. J. Roman, G. P. Parham, and M. J. Cannon. 2000. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **74**:4729–4737.
- Schwartz, R. H. 1996. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* **184**:1–8.
- Shayakhmetov, D. M., and A. Lieber. 2000. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J. Virol.* **74**:10274–10286.
- Stephens, L. A., C. Motte, D. Mason, and F. Powrie. 2001. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur. J. Immunol.* **31**:1247–1254.
- Stewart, J. P., and C. M. Rooney. 1992. The interleukin-10 homolog encoded by Epstein-Barr virus enhances the reactivation of virus-specific cytotoxic T cell and HLA-unrestricted killer cell responses. *Virology* **191**:773–782.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**:303–310.
- Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**:287–296.
- Varnum-Finney, B., L. E. Purton, M. Yu, C. Brashe Stein, D. Flowers, S. Staats, K. A. Moore, R. Le, I. R. Mann, G. Gray, S. Artavanis-Tsakonas, and I. D. Bernstein. 1998. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* **91**:4084–4091.
- Varnum-Finney, B., L. Xu, C. Brashe Stein, C. Nourigat, D. Flowers, S. Bakkar, W. S. Pear, and I. D. Bernstein. 2000. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat. Med.* **6**:1278–1281.
- Yamagawa, S., J. D. Gray, S. Hashimoto, and D. A. Horwitz. 2001. A role for TGF-β in the gene ration and expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human peripheral blood. *J. Immunol.* **166**:7282–7289.
- Yamamoto, N., S. Yamamoto, F. Inagaki, M. Kawauchi, A. Fukamizu, N. Kishi, K. Matsuno, K. Nakamura, G. Weinmaster, H. Okano, and M. Nakafuku. 2001. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J. Biol. Chem.* **276**:45031–45040.
- Yotnda, P., H. Onishi, H. E. Heslop, D. Shayakhmetov, A. Lieber, M. Brenner, and A. Davis. 2001. Efficient infection of primitive hematopoietic stem cells by modified adenovirus. *Gene Ther.* **8**:930–937.
- Zheng, S. G., J. D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagawa, and D. A. Horwitz. 2002. Generation ex vivo of TGF-β-producing regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>. *J. Immunol.* **169**:4183–4189.
- Zinkernagel, R. M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Rev.* **156**:199–209.

## C / Discussion de l'article 1

Nous avons démontré dans ce travail que l'activation de la voie Notch au moment de la présentation de l'antigène EBV dans un système autologue permettait l'induction de LTR spécifiques de l'EBV. L'inhibition de la réponse immunitaire a été mise en évidence dans des expériences *in vitro* de transfert d'inhibition de prolifération et de cytotoxicité. Nous avons travaillé à partir d'un modèle de stimulation virale très immunogène puisque les LCL-EBV sont d'excellentes CPA et que ce système repose sur la stimulation d'une réponse immunitaire de type mémoire (donneurs EBV+). Il est donc intéressant d'observer que même dans ce contexte de forte immunogénicité les LTR induits inhibent partiellement la réponse antivirale. Les LTR produisent de grandes quantités d'IL-10. L'IL-10 ne joue pas de rôle direct dans l'immunosuppression car son blocage ne modifie pas les résultats. Il s'agit donc seulement d'une cytokine caractérisant les LTR induits comme cela a déjà été décrits pour les LTR induits de type Tr1 (Groux H et al, 1997). La fonction précise de l'IL-10 dans ce contexte reste à élucider. Il est possible que l'IL-10 participe à l'induction des LTR dans notre modèle puisqu'elle a la propriété d'induire elle-même des LTR dans certains modèles expérimentaux (Groux H et al, 1996 et 1997).

Les LTR induits n'exercent plus leur action suppressive lorsqu'ils sont séparés des cellules cibles par une membrane semi-perméable, indiquant un mécanisme d'action dépendant de contacts cellulaires étroits. Cette nécessité a déjà été observée dans des travaux précédents. Nous avons observé des propriétés régulatrices dans les populations lymphocytaires T CD4+CD25+, CD4+CD25-,

CD8+CD25+ et CD8+CD25-. Ce phénotype élargi est une différence importante par rapport aux LTR naturellement présents dans le sang périphérique qui sont restreints au phénotype T CD4+CD25+. Toutefois il faut noter que des phénotypes beaucoup plus divers ont déjà été rapportés dans de multiples modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* lorsque les LTR sont induits lors d'un présentation antigénique (Liu Z et al, 1998 ; Gilliet M et Liu YJ, 2002 ; Belghith M et al, 2003 ; Unger WW et al, 2003). Il est également intéressant de noter que dans les limites de notre modèle expérimental, l'activité des LTR induits est spécifique des protéines de l'EBV sans affecter la réponse immunitaire contre des antigènes du Candida ou du Cytomégalovirus.

Il s'agit donc au total de la description d'une nouvelle stratégie d'induction de LTR humains par activation de la voie Notch. Il n'existe pas dans la littérature de données précises sur la façon dont sont induits *in vivo* les LTR naturels CD4+CD25+. Il existe des données indiquant que l'origine de ces cellules est thymique mais les mécanismes moléculaires restent largement inconnus (Almeida AR et al, 2005 ; Sin Y et al, 2006). Il est donc possible de poser l'hypothèse d'un rôle de la voie Notch, d'autant plus qu'un travail publié en 2001 (Ng WF et al, 2001) sur les LTR CD4+CD25+ montre que Deltex est fortement surexprimé dans les LTR en comparaison des lymphocytes T CD4+CD25-. De plus, ce travail a montré que les LTR CD4+CD25+ activés surexpriment Notch 4, Delta 1 et HES-1. Il est donc possible que Notch joue également un rôle fonctionnel dans l'induction et la physiologie des LTR naturels CD4+CD25+.

## Limites et questions soulevées par ce travail

Il convient d'interpréter avec prudence la spécificité antigénique observée dans notre travail. En effet, il peut être discutable de parler de spécificité antigénique pour l'EBV lorsque l'absence d'inhibition de la réponse immunitaire a été vérifiée seulement pour 2 autres antigènes (Candida et CMV). Cette réserve étant faite, les résultats que nous observons sont compatibles avec l'observation communément faite que les LTR induits lors d'une présentation antigénique doivent secondairement rencontrer l'antigène présenté lors de leur induction pour devenir fonctionnels (Groux H et al, 1997 ; Steinbrink K et al, 2002 ; Barrat FJ et al, 2002, Wang HY et al, 2004). Cette nécessité d'une seconde rencontre avec l'antigène assure sans doute une certaine spécificité de l'immunosuppression.

Nous n'avons pas exploré le ou les mécanismes d'action des LTR induits. L'analyse précise de ces mécanismes au niveau moléculaire nécessiterait sans doute un travail beaucoup plus long car les données de la littérature démontrent très souvent une complexité et une diversité remarquables des mécanismes d'action qui dépendent en fait souvent du modèle expérimental étudié. De plus, la réponse à cette question déborderait largement la réponse à la question posée, à savoir la possibilité d'induire des LTR par activation de la voie Notch. Il aurait toutefois peut-être été possible et intéressant non pas de disséquer précisément le mécanisme de suppression mais de déterminer si la cible des LTR était la CPA (LCL-EBV) et/ou les lymphocytes T anti-EBV.

La question de l'origine cellulaire des LTR dans notre modèle expérimental est non résolue. En effet, il est possible que l'activation de Notch sur les lymphocytes T anti-EBV mémoires produise un « switch » fonctionnel de ces lymphocytes leur conférant des propriétés immunosuppressives. Une autre hypothèse est la stimulation et l'expansion d'une faible population de lymphocyte T régulateurs pré-existent. Une autre possibilité sur l'origine des LTR induits, exclue dans notre travail puisque les donneurs étaient EBV+, serait la différenciation de lymphocytes T naïfs en LTR. Il s'agit là de questions immunologiques fondamentales qui trouveront sans doute toutes ou parties de leurs réponses dans les travaux de recherche actuellement en cours sur l'origine des LTR induits.

Enfin, on peut s'interroger sur la pertinence physiologique de nos résultats d'inhibition de prolifération et de cytotoxicité. En effet, les inhibitions de prolifération de 65% et de cytotoxicité de l'ordre de 50% à 80% ont été obtenus avec des ratio PBMC/LTR de 1/1, ratio qu'il est difficile d'imaginer obtenir *in vivo*. Quoi qu'il en soit, malgré ces limites, nous avons démontré que la voie Notch activée au moment d'une présentation antigénique permettait l'induction de LTR humains *in vitro*.

## D / Article 2

Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells

Yvon Eric, Vigouroux Stephane, Rousseau Raphael, Biagi Ettore, Amrolia Persis,  
Dotti Gianpietro, Wagner Hans-Joachim, Brenner Malcolm K

Blood. 2003 Nov 15;102(10):3815-21

## Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells

Eric S. Yvon, Stephane Vigouroux, Raphael F. Rousseau, Ettore Biagi, Persis Amrolia, Gianpietro Dotti, Hans-Joachim Wagner, and Malcolm K. Brenner

**Graft-versus-host disease (GVHD)** represents one of the major complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Techniques to prevent GVHD have included ex vivo T-cell depletion of the graft or prolonged in vivo immunosuppression. Both reduce the frequency and severity of GVHD but also reduce T-cell-mediated graft-versus-malignancy effect, and increase the risk of infection. A major goal in transplantation is to prevent allo-reactivity while preserving activity against tumors and infectious agents. We have used activation of the Notch pathway to try to generate T cells able to specifically

regulate alloantigen responses. We used allogeneic Epstein-Barr virus lymphoblastoid B cells (EBV-LCLs) as stimulator cells. Such LCLs are excellent (allo) antigen-presenting cells and can be obtained in large numbers even from donors who have received extensive chemo/radiotherapy. We overexpressed a Notch ligand, Jagged-1, in these cells by adenoviral vector transduction. Stimulation of CD45RA<sup>+</sup> naive T cells by Jagged-1 EBV-LCL reduces production of interferon-γ, interleukin-2, and interleukin-5, but up-regulates transforming growth factor-β1 synthesis, consistent with induction of a

regulatory T-cell phenotype. Transfer of these T cells to fresh lymphocyte cultures inhibits proliferative and cytotoxic immune responses to the priming alloantigens while sparing responses to third-party stimulator cells. Notch activation in the presence of alloantigen-presenting cells may therefore be a means of inducing specific regulatory T cells while preserving other T-cell functionality. (Blood. 2003;102:3815-3821)

© 2003 by The American Society of Hematology

### Introduction

Graft-versus-host disease (GVHD) remains a major concern after allogeneic stem cell transplantation and is a particular problem where donor and recipient are HLA mismatched.<sup>1</sup> The use of donor T-cell depletion undoubtedly reduces the incidence and severity of the complication, but at the cost of increasing the risks of relapse (where transplantation is used to treat malignant disease), viral/fungal infection, and rejection.<sup>2</sup> While posttransplantation donor leukocyte infusion can help address some of these concerns, such cells are themselves capable of inducing the GVHD that the T-cell depletion was intended to avoid. Consequently there has been considerable interest in developing selective T-cell depletion and inactivation techniques that specifically target only alloreactive T cells and spare those lymphocytes with antitumor or antiviral activity.

Reports have been published in which there is selective removal of T cells expressing activation-dependent markers during a donor-recipient mixed lymphocyte reaction (MLR),<sup>3,4</sup> or in which an inhibitory “second signal” is delivered to donor T cells reactive against the host.<sup>5</sup> We have explored whether it is also possible to generate regulatory T cells capable of actively inhibiting the alloantigen response by stimulation of the Notch pathway in T cells. Members of the Notch family are an important decision point factor in the development of many cell types. The Notch receptors (Notch 1-4) have a series of ligands classified into 2 groups based on the prototypes Serrate and Delta ligands first identified in *Drosophila*. In mammals, 2 Delta-like molecules (Delta-1, -3) and 2 Serrate-like molecules (Jagged-1, -2) have been identified, but

little is known about the specificity of these various Notch ligands for each receptor.<sup>6,7</sup> A cell in which Notch has been activated by one or more of its several ligands will have a different fate to a daughter cell in which Notch activation was absent. The choices between T- and B-cell development,<sup>8</sup> between production of CD4 and CD8 T cells,<sup>9</sup> and between αβ or γδ receptor expression<sup>10</sup> are all determined by whether Notch has been activated at the time the decision point is reached. More recently, Hoyne et al have observed that overexpression of Serrate-1 (the mouse homologue of the human Notch ligand, Jagged-1) by murine dendritic cells (DCs) induces antigen-specific regulatory T cells that could transfer tolerance to naïve recipient mice.<sup>11</sup>

Since induction and maintenance of allospecific T-cell tolerance is a major challenge in transplantation to prevent GVHD and for long-term graft survival,<sup>12</sup> we looked at whether activation of the Notch pathway was able to induce CD45RA<sup>+</sup> naive T cells to become regulatory T cells able to inhibit the allogeneic MLR. Even though the response to alloantigens *in vitro* does not predict with absolute reliability the development of GVHD, several clinical trials are using crude peripheral blood mononuclear cell (PBMC) populations to achieve a selective depletion of alloreactive T cells, using an anti-CD25 immunotoxin, with reasonable success.<sup>4</sup> As (allo) antigen-presenting cells (APCs) we used Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells because they are excellent antigen-presenting cells, expressing high levels of class I and II HLA and a range of costimulator molecules, and are readily obtained and

From the Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Houston, TX.

Submitted December 18, 2002; accepted June 12, 2003. Prepublished online as *Blood First Edition Paper*, July 3, 2003; DOI 10.1182/blood-2002-12-3826.

**Reprints:** Malcolm K. Brenner, Center for Cell and Gene Therapy, Baylor

College of Medicine, 6621 Fannin St, MC3-3320, Houston, TX 77030; e-mail: mbrenner@bcm.tmc.edu.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2003 by The American Society of Hematology

expanded even from cancer patients who have received extensive prior chemo/radiotherapy.<sup>13,14</sup> Moreover, EBV–lymphoblastoid B cells (LCLs), should be free of contaminating tumor cells, and unlike professional APCs, should not express any tumor-specific antigens<sup>15,16</sup> although they may express B-lineage–restricted tumor-associated antigens. This is an important requirement if regulatory T cells that inhibit responses to such tumor antigens are not to be induced at the same time as regulators of the alloresponse. To activate the Notch pathway, we overexpressed the ligand Jagged-1 in the alloantigen-presenting LCL (LCL-J1). We find that LCL-J1 effectively induces regulatory T cells from the CD45RA<sup>+</sup> population that inhibits alloantigen-induced proliferative and cytotoxic responses. The regulatory T cells appear specific for the inducing antigens and block the responses of fresh T cells that have themselves never been exposed to the Notch ligand.

## Materials and methods

### Cell and cell lines

Buffy-coats from healthy adults were obtained from blood products destined for transfusion and the mononuclear cells (MNCs) isolated by Ficoll density gradient centrifugation. For isolation of CD45RA<sup>+</sup> T-cell subsets, PBMCs were first depleted by incubation with a cocktail of microbead-coupled antibodies (anti-CD14, anti-CD19, anti-CD56, and anti-CD45RO) using the gradient MidiMacs magnetic separation column (Multisort kit; Miltenyi Biotec, Auburn, CA) according to the manufacturer's instructions. CD4/CD8 T-cell subsets were then separated from the CD45RA<sup>+</sup> naïve T-cell population using the same magnetic procedure. The purity of each population evaluated by fluorescent-activated cell sorter (FACS) analysis (FACScalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA) was always higher than 98% and the viability more than 95%.

EBV-LCL were obtained by Epstein-Barr virus (B95-8) immortalization of mature B cells of healthy donors. Bone marrow (BM) stromal cells that express high levels of Jagged-1 were used as a control for Jagged-1 protein expression.<sup>17</sup> To establish the BM stromal cell lines, a suspension of whole BM was obtained using institutional review board (IRB)–approved protocols, and  $5 \times 10^7$  cells seeded in a T75 culture flask (Nunc, Oslo, Norway) and cultured in complete medium (below). After a week, nonadherent cells were removed by washing and fresh medium was added. When the BM stromal cell line was established, a portion of the culture was harvested and lysates were prepared for Western blotting.

All cultures used complete medium prepared with RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone), antibiotics, and L-glutamine and maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

### Adenoviral vector

EBV-LCL lines were infected using a chimeric adenovirus Ad5/F35. As previously described by Shayakhmetov et al, this is an adenovirus serotype 5 vector in which the fiber gene has been substituted by the fiber of an adenovirus serotype 35.<sup>18</sup> The complementary DNA (cDNA) for the full-length Jagged-1 (kindly provided by Prof Margaret Dallman, Imperial College, London, United Kingdom) or enhanced green fluorescent protein (EGFP; Clontech, Palo Alto, CA) was cloned into the shuttle plasmid pShuttle-X (Clontech). The entire region containing the cytomegalovirus (CMV) promoter, Jagged-1, or EGFP, followed by an SV40 polyadenylation site was excised by I-CeuI and pI-SceI digest and then transferred to pAd5/F35, cleaved using the same restriction enzymes to form pAd5/F35–Jagged-1 or pAd5/F35–EGFP. Both Ad5/F35 vectors were produced by Lipofectamine (Life Technologies, Gaithersburg, MD) transfection of a human embryonic kidney (HEK293) cell line. A single purified plaque was amplified in HEK293 cells, and virus was extracted by 3 consecutive freeze/thaw cycles. The vectors were concentrated and purified by double cesium-chloride gradient ultracentrifugation and desalted on a dialysis cassette (Pierce, Rockford, IL). The vector titers were established by plaque assay using HEK293 (for infectious units [IU]) and by measuring optical

density at 260 nm (for viral particles, vp). The vp/IU ratios were 160 and 200 for Ad5/F35–Jagged-1 and Ad5/F35–EGFP, respectively. This is a higher ratio than usually found with Ad5, but is typical for vectors based on this chimeric virus.<sup>19</sup>

EBV-LCL cell lines were transduced with either Ad5/F35–Jagged-1 or Ad5/F35–EGFP (controls) at 37°C with 200 IU per cell for both viruses in RPMI 1640, with 2% FCS. After 12 hours, transduced cells were washed twice in phosphate-buffered saline, resuspended in fresh complete medium for 2 days, and then processed for Western blotting and real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR), or used for the generation of Notch-activated T cells as described in “Cell cultures.”

### Western blotting

To detect Jagged-1 protein expressed in EBV-LCLs and in the stromal cell line, cell extracts were prepared from pelleted cells by lysing them in Laemmli sample buffer, and boiling them for 10 minutes, followed by centrifugation to remove insoluble material. Under reducing conditions, the protein components of cell lysates were separated using a 6% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-P; Amersham, Uppsala, Sweden). The membranes were probed with antibodies to Jagged-1 (H-114; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 hour at room temperature and then visualized with horseradish peroxidase–coupled anti-immunoglobulin (705-0350147; Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) for 30 minutes at room temperature. We used the enhanced chemiluminescence system for detection (Amersham). To compare loading between samples, the membrane was reprobed with antivinculin antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

### RNA extraction and complementary DNA synthesis

Total RNA was extracted from transduced, nontransduced, and control cell lines with the Rneasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). RNA was eluted in 40 μL RNase-free water and stored at –80°C until use. Contaminating DNA was removed by DNase I digestion (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA was then reverse transcribed to cDNA using random hexamers and the SuperScript II reverse-transcriptase system (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR; Gibco Invitrogen).

### Real-time quantitative PCR (TaqMan) assay

A real-time PCR assay was developed, using TaqMan technology (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), for detection and quantification of Jagged-1, Deltex, and HES-1 transcripts. Primers and probe spanning the junction between exon 22 and exon 23 of the Jagged-1 gene (GenBank sequence database accession number U73936) were designed by means of the Primer Express software (PE Applied Biosystems). Sequences for the primers and probe were as follows: forward primer (exon 22), 5'-ACC TGC CAG TGC CTG AAT G-3'; reverse primer (exon 23), 5'-AGG CAA GGT CGA GGG CC-3'; probe (junction between exon 22 and 23), 5'-FAM-ACG GAT CGC CTG CTC AAA GGT CTG-TAMRA-3', Deltex primers and probe, forward primer (exon 5), 5'-TGG TTC GAA GAT ACA TGC AGA AG-3'; reverse primer (exon 6), 5'-ACC AGT CGC TCC ATG CAG AT-3'; probe (junction between exon 5 and 6), 5'-FAM-TGA AAA ACC CAC CTG ATG AGG ACT GCA C-TAMRA-3', and HES-1 primers and probe, forward primer (exon 6), 5'-TGG GTG CCA AGC ACT GC-3'; reverse primer (exon 7), 5'-TCG TGA CCA CCT TGT TIT TCT G-3'; probe (junction between exon 6 and 7), 5'-FAM-AAG GAA GTG GTC GAA GCT CAC GTG GA-TAMRA-3', with FAM and TAMRA representing the reporter and quencher dye, respectively. As a positive control and calibration for quantification, samples were analyzed with the TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents (PE Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommended protocol. Furthermore, RNA without reverse transcription was run in parallel for each sample. PCR amplification was performed with 2 × TaqMan Universal Master Mix (PE Applied Biosystems) with 300 nM primers and 200 nM probe, 10 mL DNA and nuclease-free water (Promega, Madison, WI).<sup>20</sup> Amplification was performed using the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS; PE Applied Biosystems) and consisted of 2 minutes at 50°C (inactivation of possible carry-over contamination by uracil N'-glycosylase [UNG]), and 40 2-step cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C.

Real-time fluorescence measurements were taken, and the threshold ( $C_T$ ) cycles of amplification, where the plots crossed a defined baseline, were determined for each sample. For relative quantification, the expression of Jagged-1 in samples was normalized by comparison with the ribosomal RNA (rRNA) amount using the  $\Delta\Delta C_T$  method.<sup>21</sup>

### Cell cultures

To generate Notch-activated T cells, a primary one-way mixed MLC was performed by coculturing  $1 \times 10^6$  purified CD45RA<sup>+</sup> T cells from the responder with  $2.5 \times 10^4$  5000 cGy  $\gamma$ -irradiated stimulator EBV-LCL cells transduced by Ad5/F35-Jagged-1 (Notch ligand) or Ad5/F35-EGFP control vector (40:1 final ratio) in a 48-well plate (Nunc) in 1 mL complete medium. For cytokine measurements, 400  $\mu$ L of day -2, -3 culture supernatants was harvested and then stored at -20°C for future assays. After 7 days, viable cells were recovered, washed, rested in fresh medium for 2 days, and then assessed phenotypically by fluorescence flow cytometry, and functionally by measuring cytotoxicity and proliferation in a secondary MLC.

The ability of Notch-activated T cells to regulate the alloantigenic-specific response of untreated T cells was examined in a secondary MLC. As stimulator cells we used the original EBV-LCLs or completely HLA-mismatched third-party EBV-LCLs. Responder cells ( $1 \times 10^6$ ) consisting of newly isolated T cells plus the indicated number of 3000 cGy  $\gamma$ -irradiated primed T cells<sup>22,23</sup> from the primary MLC and  $2.5 \times 10^4$  5000 cGy  $\gamma$ -irradiated nontransduced stimulator EBV-LCL cells were cultured for 7 days. The effects of the Notch-activated T cells, on proliferation and CTL activity, in these secondary cultures were assessed and compared with the activity of the cells newly stimulated by nontransduced LCLs.

### Measurement of proliferation

T cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were cultured in 200- $\mu$ L 96-U-bottomed-well plate (Nunc) with  $\gamma$ -irradiated (4000 cGy) Jagged-1 or control-transduced stimulator EBV-LCLs at a 40:1 ratio and the indicated number of primed T cells for 5 days. Proliferation was analyzed by  $^3$ H-thymidine ( $^3$ H-Thy) incorporation and 1  $\mu$ Ci (0.037 MBq)  $^3$ H-Thy was added 18 hours before terminating the cultures.  $^3$ H-Thy uptake was measured in a TriCarb liquid scintillation counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL) and expressed as mean counts per minute and SD of triplicate measurements.

### Flow cytometric analysis

Freshly purified and MLC-cultured cells were washed, stained for 20 minutes at 4°C with optimal dilution for each antibody or its isotype control, and analyzed by flow cytometry (FACScalibur and CellQuest software; Becton Dickinson). A total of 10 000 events were analyzed for each determination. Evidence of activation was assessed by forward scatter (FSC) profiles and via the coexpression on T-cell population of the activation marker interleukin-2 receptor (IL-2R)  $\alpha$ -chain (CD25). Cells were stained with fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, or peridinin chlorophyll alpha protein (PerCP) monoclonal antibodies (mAbs) to CD4 (Clone L200), CD8 (RPA-T8), CD25 (M-A251), CD40 (5C3), CD80 (L307.4), CD86 (FUN-1), CD45RA (5H9), CD45RO (9UCHL-1), HLA-A, B, C (G46-2.6), HLA-DR (L243), CD62L (Dreg 56), and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )/IL-4 FastImmune (BD-Biosciences, San Jose, CA). Annexin V

staining was used to detect apoptotic cells, following the manufacturer's instructions (BD Pharmingen, San Diego, CA).

For intracellular staining of IFN- $\gamma$  and IL-4, cells were first incubated for 2 hours with Brefeldin-A (Sigma-Aldrich) in the presence of LCLs used for the primary MLC. After 2 washes, the cells were stained with PerCP-conjugated anti-CD8 then fixed and permeabilized with FACSlysing and FACSPermeabilizing solutions, respectively (BD-Biosciences). After one wash, fluorescent-conjugated mAbs to IFN- $\gamma$  and IL-4 were added to the cells according to the manufacturer's instructions. Stained cells were gated on the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> populations, and IFN- $\gamma$ /IL-4 content was analyzed using CellQuest software.

### Cytotoxicity measured by chromium 51 release assay

The cytotoxic activity of primed T cells was determined in a 4-hour  $^{51}$ chromium ( $^{51}$ Cr) release assay using EBV-LCLs (B cells) and phytohemagglutinin (PHA) blasts (T cells) both derived from the donor of the MLC stimulator cells, as well as the K562 cell line, as the target cells. Target cells ( $1.5 \times 10^6$ ) were labeled with 100 mCi (3.7 mBq)  $^{51}$ Cr (Amersham) and used at 5000 cells per well. Multiple effector-target (E/T) ratios were tested in triplicate and cytotoxic activity measured as percent specific lysis calculated as follows: [(cpm released experimental - cpm spontaneous)/(cpm total lysis - cpm spontaneous)]  $\times$  100.

### Measurement of cytokine production

Supernatants, previously frozen at -20°C, were analyzed for their cytokine content using the CytoMetric Bead Array kit (CBA; Pharmingen/BD-Biosciences, San Diego, CA). Day-3 X-VIVO-15 culture supernatants were assessed for transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) content by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Quantikine ELISA kit; R&D Systems, Minneapolis, MN) following the manufacturer's instructions.

After 7 days of culture, intracellular IL-4 and IFN- $\gamma$  were also assayed by flow cytometry according to the manufacturer's protocol (BD-Biosciences).

### Statistical analysis

Means  $\pm$  SD of independent experiments were analyzed using the SigmaStat 2.03 software (SigmaStat, Chicago, IL). For intergroup comparison, paired *t* testing was used and *P* values less than .05 was considered statistically significant.

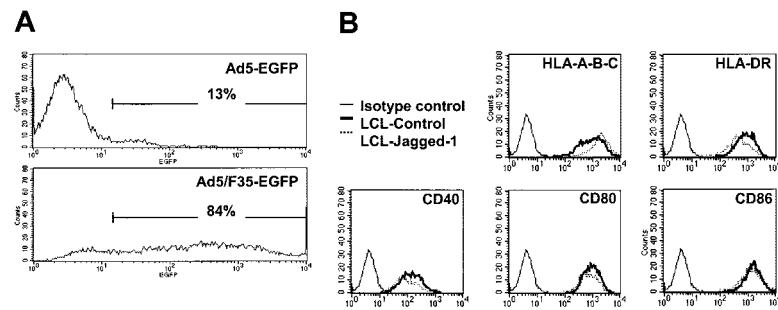
## Results

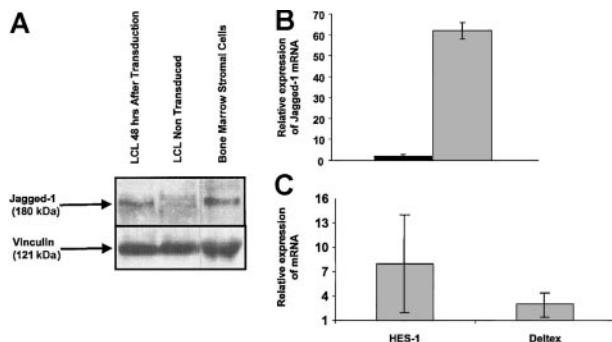
### Transduction of EBV-LCLs by Ad5/F35-Jagged-1

The Ad5/F35-EGFP vector we used efficiently transduces LCLs, so that at a multiplicity of infection (MOI) of 200 plaque-forming units (pfu) per cell, more than 80% of LCLs are strongly positive for the fluorescent marker, compared with less than 15% using conventional Ad5-EGFP at an MOI of 1500 pfu per cell (Figure 1A).

Surface immunofluorescence staining showed that neither transduction by control Ad vector nor overexpression of Jagged-1 had any effect on LCL expression of major histocompatibility complex

**Figure 1. Comparison of Ad5 and Ad5/F35 infectivity in EBV-LCL cells.** EBV-LCL cells were cocultured for 18 hours with 1500 pfu per cell of Ad5-EGFP or 200 pfu per cell of Ad5/F35-EGFP, and then washed. At 48 hours after infection, the cells were analyzed for EGFP or surface molecule expression by flow cytometry. (A) The results are expressed as the percentage of EGFP-expressing cells. (B) EBV-LCLs transduced by Ad5/F35-Jagged-1 showed the same profile of surface expression as control, MHC class I and II, and costimulatory ligands (ie, HLA-A, -B, -C; HLA-DR; CD40; CD80; and CD86). For each assay, 1 representative experiment of 4 is shown.



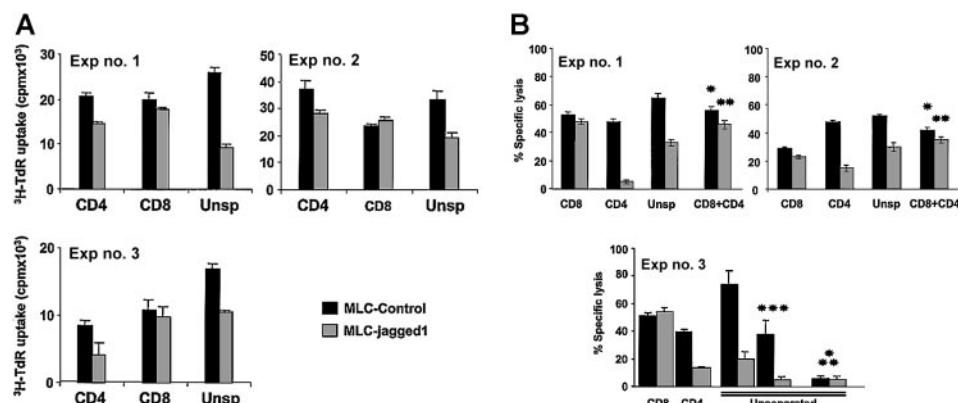


**Figure 2. Jagged-1 expression in Ad5/F35-Jagged-1-transduced EBV-LCL cells.** Transduction efficiency of EBV-LCLs using Ad5/F35-Jagged-1 vector was monitored after 48 hours by Western blotting and RQ-PCR. (A) Jagged-1 protein ( $\approx$ 180 kDa) was detected in EBV-LCLs 48 hours after transduction by Ad5/F35-Jagged-1 vector. Human bone marrow stromal cells were used as the positive control for Jagged-1 protein expression. (B) RQ-PCR assay showed a mean 62-fold higher quantity of Jagged-1 mRNA in EBV-LCLs after transduction by Ad5/F35-Jagged-1 vector (gray bar), compared with control-transduced EBV-LCLs (black bar) (mean  $\pm$  SD of 3 experiments). (C) To confirm the functionality of Jagged-1 expressed on transduced LCLs, T-cell populations were analyzed for HES-1 and Deltex mRNA content after 12 hours of activation in an MLC (mean  $\pm$  SD of 3 experiments).

(MHC) molecules (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ) or of the costimulator molecules CD40, CD80, and CD86 (Figure 1B).

To confirm that LCLs were efficiently transduced by the Ad5/F35-Jagged-1 vector, we measured expression of the transgene at the protein and transcript levels. At 48 hours after transduction, Western blotting detected the 180-kDa Jagged-1 protein in Ad5/F35-Jagged-1-transduced EBV-LCLs but not in control LCLs (Figure 2A).

At the same time point, real-time quantitative PCR (RQ-PCR) showed a mean 62-fold higher level of Jagged-1 mRNA in Ad5/F35-Jagged-1-transduced than in control-transduced cells (Figure 2B). Control-transduced and Jagged-1-transduced LCLs were analyzed for rRNA content as a positive control and to calibrate the quantification. As a measure of functionality, Jagged-1 LCL-stimulated T cells showed an 8-fold up-regulation of HES-1 and a 3-fold up-regulation of Deltex 12 hours after activation, in comparison with control LCL-stimulated T cells (Figure 2C). Since HES-1 and Deltex are downstream transcriptional regulators induced by Notch receptor activation, this confirms that the expressed Jagged-1 protein is biologically active.<sup>24,25</sup>



**Figure 3. Priming CD45RA<sup>+</sup> T-cell subset in the presence of Jagged-1 induces alloantigen hyporesponsiveness.** Primary MLR cultures consisted of CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and/or CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cell responders and control or Jagged-1-transduced EBV-LCL stimulator cells. (A) The proliferative responses were determined by  $^3\text{H}$  incorporation at day 5 of the cultures. Results show the means  $\pm$  SD of triplicates studied in each experiment for a  $P$  value for the effect of Jagged-1 of  $P < .001$  for CD4,  $P = .557$  for CD8, and  $P = .001$  for unseparated T cells. A further 9 experiments revealed an identical pattern of results for an overall  $P$  value of .00114 for unseparated cells. (B) Specific lysis of target cells after a day-7 MLC, against which the responder cells were generated, is shown. Moreover, when CD4<sup>+</sup> T cells either from the control culture (\*) or from the Jagged-1 culture (\*\*) were added to CD8<sup>+</sup> T cells primed with control LCLs at a 1:1 ratio, no cytotoxic effect was observed. These experiments used PHA- blasts (\*\*\*) from the same donor as additional target cells as well as EBV-LCLs from a fully mismatched third party (pyramid-stacked \*). These cells acted as specific killing controls.

### Stimulation by Jagged-1 modulates proliferative and cytotoxic primary immune responses

To measure the effects of Jagged-1 expression on responses to alloantigens, we cocultured CD45RA<sup>+</sup> naive T cells with control or Jagged-1-transduced allogeneic LCLs. In 12 experiments there was a consistent decrease of  $^3\text{H}$ -Thy uptake (mean 36%) compared with control LCL-stimulated cultures ( $P = .0011$ ). As illustrated in Figure 3A, separation of the responder T cells into CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subsets showed the primary effect to be on CD4<sup>+</sup> cells whose  $^3\text{H}$ -Thy uptake was reduced by a mean of 30% ( $P < .01$ ), while the  $^3\text{H}$ -Thy uptake of the CD8<sup>+</sup> population was unaffected ( $P = .557$ ).

These results imply that Jagged-1 stimulation modifies CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cell behavior, but that the ligand has no direct inhibitory effect on CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells. Similarly, there was no inhibition when allogeneic LCL-J1s were added to CD45RO<sup>+</sup> "memory" CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (not shown).

To determine whether CD4<sup>+</sup> T cells modified by Jagged-1 exposure can in turn affect the function of CD8<sup>+</sup> cells, we measured the cytotoxic activity of each population. Following mixed lymphocyte cultures of T cells with MHC-mismatched LCL stimulator cells, cytotoxic activity is normally generated against PHA blasts (T-cell derived) and LCLs (B-cell derived) prepared from the donor of the stimulator cells. This activity has been shown to be mediated by cytotoxic T cells and to be unaffected by depletion of CD56 cells.<sup>11,12</sup> As shown in Figure 3B (Exp no. 3), the development of cytotoxic effector cells directed against these T- and B-cell targets is markedly inhibited if the stimulator LCLs were expressing Jagged-1. Cytotoxic activity against stimulator-donor-derived PHA blasts was reduced by more than 90% ( $P < .01$ ), while killing of LCLs was reduced by 75% in the LCL-J1-compared with the LCL-stimulated cultures ( $P < .01$ ). Killing of third-party LCLs was low and was not affected whether stimulation had been by LCLs or LCL-J1s. As with the proliferative response, exposure to LCL-J1s had no direct effect on the cytotoxic activity of the CD8<sup>+</sup> T cells when these were cultured alone (Figure 3B). Instead CD4<sup>+</sup> cells were required in the primary cultures for LCL-J1-mediated inhibition of CD8 function to be observed. In addition, when Jagged-1 primed CD4<sup>+</sup> T cells were added to CD8 T cells primed with control LCLs (at a 1:1 ratio), before the cytotoxicity assays, we observed no inhibition (Figure 3B, Exp nos.

1 and 2). The above effects occurred in populations depleted of CD56 natural killer (NK) cells, providing additional evidence that the ultimate targets of LCL-J1 inhibition are cytotoxic T lymphocytes. Finally, addition of mAb to MHC class I molecules (W6/32) inhibited killing by a mean of 42%, consistent with cytotoxic effector function mediated by MHC class I antigen-restricted CD8<sup>+</sup> T cells.

#### Phenotypic analysis of Jagged-1-stimulated T cells

To analyze the effects of Jagged-1 stimulation on T-cell phenotype, we harvested the T cells from control LCL or LCL-J1 cultures after 7 days and analyzed them using flow cytometry. In the LCL-J1 cultures, allostimulated T cells displayed the features of an activated phenotype but with distinct forward scatter (FSC) characteristics compared with LCL-stimulated controls (Figure 4A).

Table 1 shows the significant decrease in mean value for expression of CD25 (interleukin-2 receptor alpha chain) ( $P = .001$ ) and the mean fluorescence intensity (MFI) ( $P = .035$ ) in 6 separate experiments.

These observations are consistent with Notch pathway activation delivering a signal that inhibits activation/differentiation of naive T cells.

Of note, the proliferative and cytotoxic hyporesponsiveness we observed following exposure to Jagged-1 cannot be attributed to increased induction of apoptosis since Annexin V staining showed less than 15% Annexin V-positive cells in the Jagged-1-stimulated T-cell population, a figure identical to that observed in the controls (Figure 4B).

#### Cytokine profile of Jagged-1-stimulated T cells

We next investigated changes in cytokine production relating to Jagged-1 stimulation. LCL-J1 stimulation produced a consistent shift in the pattern of cytokines produced compared with control LCL stimulation. IFN- $\gamma$  (80% reduction), IL-2 (55% reduction), and IL-5 (73% reduction) were all diminished, while TGF- $\beta$ 1 release was increased (Figure 5A).

No significant differences were noted in IL-10 production between the control and the Jagged-1-stimulated cultures. In addition, intracellular staining for IFN- $\gamma$  and IL-4 in T cells showed an 80% reduction of the number of cells producing these cytokines in Jagged-1 LCL-stimulated cultures compared with controls for both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell populations (Figure 5B). Overall, these results are consistent with induction of Th3-type regulatory T cells in the allogeneic cultures.

#### Regulatory T cells induced by activated Notch can specifically transfer inhibition of the immune response in a secondary MLC

Addition of LCL-J1-stimulated T cells (A-J1) from responder A to fresh naive T cells from the same donor in a new MLC incorporating the same LCL as stimulator (B), (A + A-J1 × B), produced consistent and significant ( $P < .01$ ) inhibition of responsiveness. Inhibition was seen at ratios of Jagged-1 activated T cells to fresh

**Table 1. Effects of Jagged-1 on alloactivated naive T cells**

Parameter	Control, %	Jagged-1, %	P
CD25	45 ± 15	35 ± 14	.001
MFI	438 ± 207	264 ± 146	.035

Percentage of CD25<sup>+</sup> cells and MFI in the Jagged-1 MLC compared with controls. Mean ± SD of 6 separate experiments.

responder T cells of 1:5, while at a 1:1 ratio, inhibition was more than 70%. The capacity to respond to third-party (C) alloreactive stimulator cells (A + A-J1 × C) was unimpaired by addition of a low ratio of regulatory cells, although at a ratio of 2 Jagged-1-stimulated T cells to 1 fresh T-responder cell, some nonspecific third-party inhibition was seen (Figure 6A).

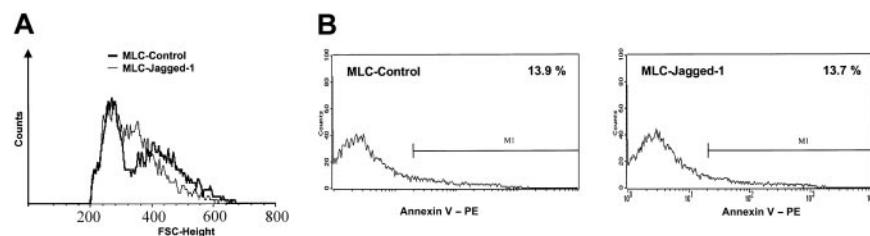
The ability of Jagged-1-stimulated T cells to inhibit fresh cocultures of responder cells also extended to activity on cytotoxic effector function. Figure 6B shows the effect of adding Jagged-1 (A-J1) or control LCL-stimulated T cells to fresh cultures of responder T cells that were stimulated either with the original stimulator LCLs (A + A-J1 × B) or third-party LCLs (A + A-J1 × C). The Jagged-1-stimulated T cells inhibited cytotoxicity against the original LCLs (A × B) by more than 40% at a 1:2 ratio between J1-stimulated T cells and fresh responder T cells, while having no discernible effect against the third-party LCLs (A × C). Notably, responsiveness to autologous LCLs was unimpaired—an important consideration if the approach is to be adopted for allogeneic stem cell transplantation in which EBV lymphoproliferative disease affecting donor B cells is a significant cause of morbidity and mortality. In all cultures the experiments were done after CD56<sup>+</sup> cell depletion so that NK activity, evaluated by K562 killing, was consistently less than 10%.

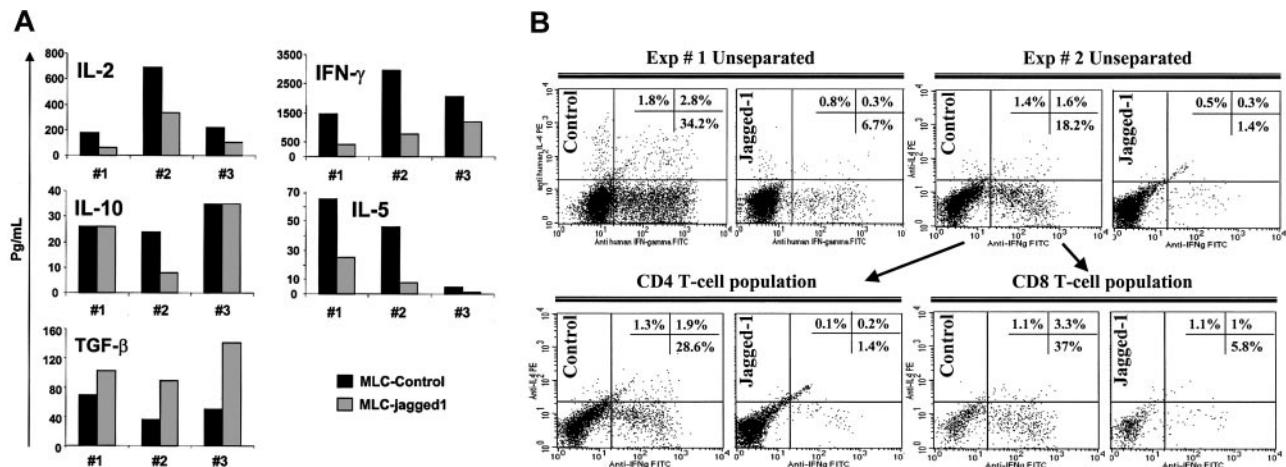
## Discussion

Our results indicate that overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, in alloantigen-presenting cells induces alloantigen-specific regulatory T cells to develop from a CD45RA<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) naive population. We demonstrated hyporesponsiveness, mostly driven by a Jagged-1-activated CD4 T-cell subset, in CD4 and CD8 proliferative and cytotoxic responses to alloantigens expressed on both T cells (PHA blasts) and B cells (LCLs). This hyporesponsiveness can be transferred to fresh lymphocyte cultures that have not been exposed to Jagged-1. Reactivity to third-party target cells is unimpaired.

The molecular pathways involved in the development of regulatory T (Treg) cells remain poorly understood. The Notch pathway, defined by the Notch family of receptors and its ligands, which belong to the Jagged and Delta molecular families in humans, may play a role in the differentiation of Treg cells responsible for tolerance. Hoyne et al have demonstrated in mice that antigen presented by dendritic cells overexpressing Notch-1 ligand results in the differentiation of antigen-specific CD4 T cells

**Figure 4. Phenotypic characteristics of tolerized T cells.** After a 7-day MLC in the absence or presence of Jagged-1, the responder cells were harvested, allowed to rest for 2 days, and analyzed by flow cytometry. (A) The blastlike (ie, large-sized) T cells emerged with distinct forward scatter (FSC) characteristics in the Jagged-1 MLC. (B) Annexin V staining showed a comparable level of apoptotic cells between control and Jagged-1 MLC (1 representative experiment of 3).



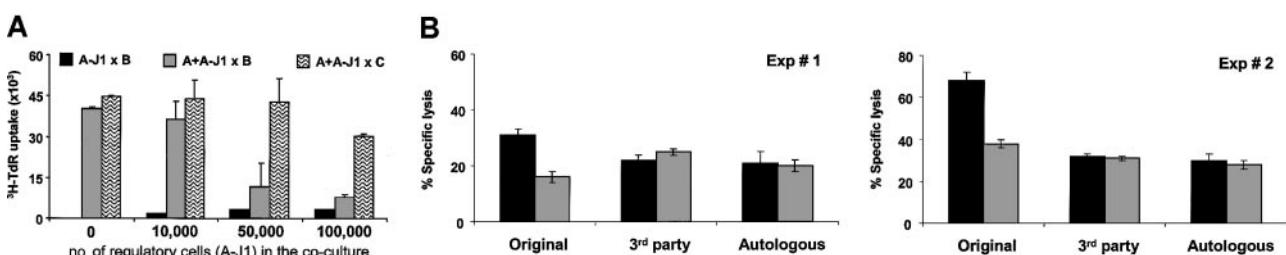


**Figure 5. Cytokine profile of Jagged-1 primed naive T cells.** (A) Cytokine profiles of unseparated (CD4 and CD8) naive T cells were analyzed in day-3 culture supernatants by CBA assay and ELISA for Th1/Th2 cytokines and TGF- $\beta$  content, respectively. Results from 3 experiments are shown with a  $P$  value for the effect of Jagged-1 of  $P = .0135$  for IL-2,  $P = .049$  for IFN- $\gamma$ ,  $P = .57$  for IL-10,  $P = .0144$  for IL-5, and  $P = .0071$  for TGF- $\beta$ . (B) Intracellular staining for IL-4 and IFN- $\gamma$  on day 7 of the unseparated cultures, and with gating on CD4 $^+$  or CD8 $^+$  T-cell populations.

into regulatory cells that can transfer tolerance to naive mice.<sup>11</sup> Other indirect arguments suggest a role for Notch and its ligands in the development or maintenance of Treg cells. One is the demonstration in human cells that Deltex, a positive regulator of the Notch pathway, is highly up-regulated in CD4 $^+$ CD25 $^+$  cells, which are naturally occurring T regulatory cells.<sup>26</sup> Following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28, the transcription of Notch-4 and Delta-1 dramatically increased only in these cells.<sup>26</sup> Using the same system, we demonstrated that Jagged-1 LCL-stimulated T cells showed up-regulation of both HES-1 and Deltex, compared with control LCL-stimulated T cells. Since HES-1 and Deltex are downstream transcriptional regulators induced by Notch receptor activation, this confirms the functionality of the expressed Jagged-1 protein.<sup>24,25</sup> Jagged-1 is not normally expressed on B-lineage cells including LCLs,<sup>27</sup> but has been well documented in human thymic epithelium,<sup>28,29</sup> which appears to play a key role in the generation of Treg cells.<sup>30,31</sup> Our results support the concept that the Notch pathway contributes to the differentiation of human T regulatory cells. In our experimental model, we suggest that overexpression of Jagged-1 in the context of alloantigen presentation represents the critical signal for induction of specific regulatory T cells. The first signal is given to the T cell by the allogeneic MHC molecules expressed by the lymphoblastoid cell lines, which ensure the specificity of the T-cell response. The subsequent signals are given by CD28-B7 and CD40-CD40 ligand interactions between the alloantigen B-cell and the antigen-stimulated T cell. Concomitant ligation of Jagged-1 by a Notch receptor modulates the conse-

quences of these signals so that progression to a Th1 or cytotoxic effector T cell is instead redirected to the formation of regulatory T cells. All the above effects could also be directly linked to Jagged-1 overexpression on LCLs if they were abrogated by blocking the Notch pathway, which can be achieved by using  $\gamma$ -secretase inhibitors. Unfortunately, we found that available  $\gamma$ -secretase inhibitors have a high level of nonspecific toxicity for primary T cells, making it impossible to discern their effects in assays requiring analysis of T-cell function, such as those required to show regulatory activity.

At present, human regulatory T cells are poorly characterized, and most work has focused on naturally occurring regulatory cells circulating in peripheral blood, which are CD4 $^+$ CD25 $^+$ .<sup>22</sup> Induced suppressor cells, by contrast, have a more diverse phenotype, and have been associated with multiple combinations of CD4, CD8, or CD25 antigen expression.<sup>26,32-34</sup> In rodents, 2 functional classes of suppressor cells are described, Tr1 and Th3, of which the Th3 class appears to most closely resemble the regulatory T cells generated in this human study. Th3 cells have been best characterized in murine autoimmune models in which oral administration of autoantigens has been shown to induce tolerance.<sup>35</sup> CD4 $^+$  T-cell clones isolated from mesenteric lymph nodes in orally tolerized animals produce TGF- $\beta$ 1 and down-regulate Th1-cell responses. In humans, Th3 cells have been described to down-regulate both Th1 and Th2 responses,<sup>35</sup> matching the pattern of regulatory activity we see here. The production of inhibitory cytokines such as TGF- $\beta$ 1 may



**Figure 6. Allospecific regulatory T cells suppress naive alloreactive T cells and do not confer bystander suppression.** Regulatory T cells were generated in a Jagged-1 MLC. (A) Irradiated regulatory T cells ( $1$  to  $10 \times 10^4$ ) were added to an MLC containing  $5 \times 10^4$  responder naive T cells and  $1.25 \times 10^3$  irradiated stimulator EBV-LCLs. The proliferative responses were determined from  $^3\text{H}$  incorporation at day 5 of culture. (B) Specific inhibition of target cell lysis was evaluated at day 7 of secondary MLC using a 2:1 ratio between naive and regulatory T cells (gray bar) and compared with control cultures (containing irradiated T cells cultured with nontransduced LCLs) (black bar). The stimulator cells were either the original stimulator EBV-LCLs (used in the primary MLC), third-party EBV-LCLs (completely HLA-mismatched with the original cell stimulator), or autologous EBV-LCLs. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate measurements.

not contribute substantially to the effects of Th3 regulatory T cells, since most studies suggest that regulation itself occurs independently of such cytokines and is instead critically dependent on cell-to-cell contact.<sup>36</sup>

A potential clinical application for regulatory cells induced by the Jagged-1 stimulation would be to induce and sustain tolerance after stem cell transplantation. To date, strategies to produce long-term graft survival in humans have used immunosuppressive drugs, T-cell depletion, or blockade of costimulatory signals.<sup>37,38</sup> One major disadvantage of these strategies is the lack of specificity for alloantigens. This lack of specificity increases the risk of infectious events and may lead to reduction of a graft-versus-tumor effect. Regulatory T cells induced by the Jagged-1/Notch pathway may be more effective since they appear to be specific for the tolerizing set of alloantigens presented in the culture. Not only is activity against third-party alloantigens retained, but so too is activity against autologous EBV-LCLs. This indicates that there is retention of activity against viral antigens presented by donor HLA

molecules even when the T cells have been exposed to the same viral antigens presented on allogeneic *recipient* EBV-LCLs. Such a result is of specific interest in stem cell transplantation since it suggests that responsiveness against donor EBV-LCLs will be retained in vivo, and will thereby reduce the risk of posttransplantation lymphoproliferative disease. More generally, the observation further supports the concept that the inhibitory effects resulting from Notch activation will spare responsiveness against other viral and malignancy associated antigens, not present at the tolerizing event.

In conclusion, we have shown that overexpression of Jagged-1 on EBV-LCLs may induce the differentiation of antigen-specific regulatory T cells from CD45RA<sup>+</sup> T lymphocytes and thereby reduce the alloreactivity of human T lymphocytes. These Jagged-1-stimulated cells can transfer tolerance in ex vivo cultures and may therefore be able to complement other approaches<sup>3,4,5,30</sup> aimed at reducing the alloreactivity of MHC-mismatched donor cells while sparing reactivity against clinically relevant antigens.

## References

- Heslop HE. Haemopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Br J Haematol*. 1999;105:2-6.
- Nakamura R, Bahcec E, Read EJ, et al. Transplant dose of CD34(+) and CD3(+) cells predicts outcome in patients with haematological malignancies undergoing T cell-depleted peripheral blood stem cell transplants with delayed donor lymphocyte add-back. *Br J Haematol*. 2001;115:95-104.
- Garderet L, Snell V, Przepiorka D, Schenk et al. Effective depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear cell preparations. *Transplantation*. 1999;67:124-130.
- Andre-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al. Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet*. 2002;360:130-137.
- Guinan EC, Boussiotis VA, Neuberg D, et al. Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N Engl J Med*. 1999;340:1704-1714.
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science*. 1995;268:225-232.
- Greenwald I, Rubin GM. Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell*. 1992;68:271-281.
- Pui JC, Allman D, Xu L, et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*. 1999;11:299-308.
- Robey E, Chang D, Itano A, et al. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell*. 1996;87:483-492.
- Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, et al. Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell*. 1997;88:833-843.
- Hoyle GF, Le Roux I, Corsin-Jimenez M, et al. Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *Int Immunol*. 2000;12:177-185.
- Yu X, Carpenter P, Anasetti C. Advances in transplantation tolerance. *Lancet*. 2001;357:1959-1963.
- Roskrow MA, Suzuki N, Gan Y, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease. *Blood*. 1998;91:2925-2934.
- Heslop HE, Ng CY, Li C, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med*. 1996;2:551-555.
- Heinzinger M, Waller CF, von den Berg A, Rosenstiel A, Lange W. Generation of dendritic cells from patients with chronic myelogenous leukemia. *Annu Hematol*. 1999;78:181-186.
- Eibl B, Ebner S, Duba C, et al. Dendritic cells generated from blood precursors of chronic myelogenous leukemia patients carry the Philadelphia translocation and can induce a CML-specific primary cytotoxic T-cell response. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;20:215-223.
- Varnum Finney B, Purton LE, Yu M, et al. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood*. 1998;91:4084-4091.
- Shayakhmetov DM, Lieber A. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol*. 2000;74:10274-10286.
- Yotnda P, Onishi H, Heslop HE, et al. Efficient infection of primitive hematopoietic stem cells by modified adenovirus. *Gene Ther*. 2001;8:930-937.
- Lie YS, Petropoulos CJ. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotech*. 1998;9:43-48.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- Koenen HJ, Joosten I. Fine tuning of antigen-presenting cell-directed monoclonal antibody strategies in the induction of human allo-specific T-cell tolerance in vitro. *Transplant Proc*. 1998;30:2447-2449.
- Comoli P, Montagna D, Moretta A, Zecca M, Locatelli F, Maccario R. Alloantigen-induced human lymphocytes rendered nonresponsive by a combination of anti-CD80 monoclonal antibodies and cyclosporin-A suppress mixed lymphocyte reaction in vitro. *J Immunol*. 1995;155:5506-5511.
- Jarriault S, Le Bail O, Hirsinger E, et al. Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol*. 1998;18:7423-7431.
- Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, et al. Role of Delta-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem*. 2001;276:45031-45040.
- Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, et al. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*. 2001;98:2736-2744.
- Bertrand FE, Eckfeldt CE, Lysholm AS, LeBien TW. Notch-1 and Notch-2 exhibit unique patterns of expression in human B-lineage cells. *Leukemia*. 2000;14:2095-2102.
- Felli MP, Maroder M, Mitsiadis TA, et al. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol*. 1999;11:1017-1025.
- Anderson G, Pongracz J, Parnell S, Jenkinson EJ. Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur J Immunol*. 2001;31:3349-3354.
- Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000;101:455-458.
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*. 1999;162:5317-5326.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193:1303-1310.
- Dhopakar MV, Steinman RM. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood*. 2002;100:174-177.
- Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol*. 2000;165:3105-3110.
- Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182:207-214.
- Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med*. 2002;196:237-246.
- Waldmann H. Transplantation tolerance—where do we stand? *Nat Med*. 1999;5:1245-1248.
- Salama AD, Remuzzi G, Harmon WE, Sayegh MH. Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J Clin Invest*. 2001;108:943-948.

## **E / Discussion de l'article 2**

Dans ce second travail, nous avons démontré que l'activation de Notch lors d'une stimulation allogénique *in vitro* induisait la différenciation de lymphocytes T CD4+CD45RA+ naïfs en LTR spécifiques des alloantigènes présentés lors de l'induction. Les lymphocytes T CD8+CD45RA+, CD4+CD45RO+ et CD8+CD45RO+ se comportent différemment car aucune de ces populations ne se différencie en LTR dans des conditions expérimentales identiques.

Il semble donc que les cellules T naïves aient une double potentialité de différenciation: soit vers des lymphocytes T effecteurs (cytotoxiques ou helper) soit vers des lymphocytes T régulateurs. L'activation de Notch lors d'une présentation allogénique optimale oriente visiblement vers un phénotype de LTR. Il est intéressant de souligner la « restriction » phénotypique aux lymphocytes T CD4+CD45RA+ dans ce modèle car le travail précédent utilisant un modèle de stimulation virale (EBV) autologue a montré un phénotype non restreint des LTR (qui étaient CD4+CD25+/- et CD8+CD25+/-). Cette différence montre une fois de plus que les caractéristiques phénotypiques des LTR induits dépendent étroitement des conditions expérimentales propres à chaque modèle. La grande variabilité phénotypique des LTR induits décrite abondamment dans la littérature (CD4+CD25+/-, CD8+CD25+/-, CD8+CD28-, CD4-CD8-) conforte nos résultats dans ce domaine.

La variabilité phénotypique des LTR entre nos deux modèles de stimulation antigéniques s'accompagne de manière non surprenante d'une variabilité dans la sécrétion de cytokines. En effet, dans le modèle de stimulation allogénique, les LTR

sécrètent du TGF- $\beta$  mais pas d'IL-10. Ce profil cytokinique est tout à fait comparable à celui des LTR de type TH3 décrits dans des modèles murins de tolérisation orale par Weiner et al. Dans le modèle de stimulation virale, le profil cytokinique est tout à fait différent avec une sécrétion d'IL-10 sans sécrétion de TGF- $\beta$ ; soit un profil comparable avec celui des LTR de type Tr1 (Groux et al, 1997).

Les LTR induits sont spécifiques des alloantigènes présentés au moment de l'induction puisque les expériences de transfert ont montré une réponse immunologique non affectée lorsqu'elle concernait les LCL-EBV d'un troisième partenaire complètement mismatch ou des LCL-EBV (antigène viral EBV) provenant du donneur à l'origine des LTR. Cette observation est intéressante car dans un contexte clinique de greffe de cellules souches hématopoïétiques, des LTR spécifiques des antigènes du receveur pourraient permettre de prévenir ou de contrôler une réaction du greffon contre l'hôte sans affecter l'effet du greffon contre la maladie ou les réponses immunitaires nécessaires à la lutte contre les nombreuses réactivations virales survenant dans ce contexte, qu'elles soient EBV ou autres (Copelan EA et al, 2006).

## Limites et questions soulevées par ce travail

Bien que l'objet de ce travail n'était pas de décrire précisément le mécanisme d'action des LTR allospécifiques, il aurait sans doute été intéressant de réaliser des expériences complémentaires en bloquant le TGF- $\beta$  afin de montrer un éventuel rôle dans les effets inhibiteurs observés. Des expériences d'inhibition de prolifération ou de cytotoxicité dans les cocultures secondaires en séparant les LTR des cellules cibles (LCL-EBV et/ou lymphocytes T) auraient également permis de préciser le mécanisme de suppression en déterminant s'il dépendait de facteurs solubles ou de contacts cellulaires.

L'application clinique potentielle la plus évidente découlant de ce travail est l'utilisation de LTR allospécifiques induits dans le traitement et/ou la prévention de la réaction du greffon contre l'hôte après greffe de cellules souches hématopoïétiques. On peut cependant s'interroger sur le bénéfice clinique potentiel de LTR ainsi induits sachant que dans des conditions expérimentales optimales *in vitro*, l'inhibition de la prolifération n'est que de 70% et celle de la cytotoxicité que de 40%. La réaction du greffon contre l'hôte *in vivo* résulte de conflits immunologiques très complexes et très intenses. De plus, sa physiopathologie fait certes intervenir la réponse allogénique mais également l'intensité de la toxicité du conditionnement à la greffe ainsi que les infections concomitantes notamment virales, ajoutant ainsi à la complexité du phénomène (Ferrara JL et al, 2006). On peut donc s'interroger sur le bénéfice clinique qu'apporteraient des LTR allospécifiques générés *in vitro* dans un tel contexte clinique. Peut-être y aurait-il alors plus de place pour une approche préventive plutôt que curative dans le traitement de la GvHD, ceci d'autant plus que

dans notre travail, les LTR étaient inefficaces lorsqu'ils étaient mis en culture avec des lymphocytes TCD8 déjà activés. Ceci indique la nécessité pour les LTR d'être présents au début de la réponse immunitaire pour que l'inhibition soit optimale. Nos résultats sont donc encourageants dans la perspective d'une éventuelle utilisation des LTR dans la prévention de la GvHD par exemple dans le cadre du protocole de déplétion alloréactive par immunotoxine anti-CD25 (Amrolia P et al, 2003). Cependant, une telle application nécessiterait sans doute l'évaluation d'un nouveau protocole d'induction des LTR, plus pertinent du point de vue clinique, plus simple et plus reproductible afin de se conformer aux exigences d'un protocole clinique.

Finalement, nos travaux démontrent dans 2 modèles de stimulation antigénique indépendants que l'activation du récepteur Notch sur des lymphocytes T humains au moment d'une présentation antigénique favorise l'induction de LTR spécifiques d'antigènes au dépend des lymphocytes cytotoxiques. Nous pensons que la complémentarité entre les deux modèles expérimentaux renforce la démonstration.

## F / Article 3

Antigen-induced regulatory T cells

Stephane Vigouroux, Eric Yvon, Ettore Biagi, and Malcolm K. Brenner

Blood. 2004 Jul 1;104(1):26-33

## Antigen-induced regulatory T cells

Stephane Vigouroux, Eric Yvon, Ettore Biagi, and Malcolm K. Brenner

Regulatory T cells participate in immunologic homeostasis by active suppression of inappropriate immune responses. Regulatory T lymphocytes expressing CD4 and CD25 antigens and naturally present in the peripheral blood were the first to be phenotypically characterized.

However, their small number and antigen nonspecific suppression has prompted efforts to identify and dissect antigen-specific regulatory T cells. In this review we discuss how antigen-specific regulatory T cells can be identified, the cellular and molecular mecha-

nisms underlying their induction and activity, and the challenges facing their potential clinical application. (Blood. 2004;104:26-33)

© 2004 by The American Society of Hematology

### Introduction

It is axiomatic that the immune system, with its remarkable ability to respond to antigenic stimuli, must possess equally potent mechanisms to regulate the form, extent, and duration of this reaction. The ability to exploit such regulatory mechanisms would afford novel therapeutic opportunities in autoimmune disorders, allergies, and transplantation. We are only now beginning to understand the complexity of the control methods available to the immune system, and it is the purpose of this review to discuss a method of increasing interest, namely antigen inducible (as opposed to naturally occurring) regulatory T lymphocytes.

Regulatory ("suppressor") T cells were first described in 1971 by Gershon and Kondo<sup>1</sup> who demonstrated their ability to transfer antigen-specific tolerance to naive animals. This concept rapidly lost credibility<sup>2</sup> because of 3 serious problems. First, it was impossible to identify specific surface markers associated with suppressor T cells. Second, when methods for studying T-cell receptor (TCR) genes became available, suppressor T cells did not appear to have functional gene rearrangements. Finally—and most damagingly—suppressor T cells were said to be governed in their activity by the murine *I-J* locus, which was hypothesized to code for soluble suppressor factors. Conventional mouse genetics mapped this *I-J* gene within the I complex of the major histocompatibility complex (MHC) region. Embarrassingly, when hybrid DNA technology was used to analyze this locus in the early 1980s, it showed that the putative *I-J* region simply did not exist. Although many investigators subsequently dismissed the entire concept of suppression as an artifact of the complex and poorly reproducible biologic assays used to demonstrate its presence, several experimental observations remained difficult to interpret without postulating some form of active down-regulation of the immune response.<sup>3</sup>

### Natural versus inducible regulatory T cells

In 1995, a phenotypic description of one class of regulatory T cells finally became available. Sakaguchi et al<sup>4</sup> showed that when CD4<sup>+</sup>

T cells from normal Balb/C mice were depleted of the fraction expressing the CD25<sup>+</sup> (interleukin-2 receptor [IL2R] α-chain) marker and injected into Balb/C athymic nude mice, all recipients developed multiple autoimmune diseases. In addition, the deleterious effects of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells could be prevented by the coadministration of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. Since then, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells, which occur naturally in peripheral blood and originate from the thymus,<sup>5</sup> have been the subject of intense scrutiny and have been shown to contribute to peripheral self-tolerance in rodents<sup>6-9</sup> and humans.<sup>10-13</sup> Their ability to actively transfer unresponsiveness in vitro and in vivo distinguishes them from other mechanisms of peripheral tolerance including T-cell anergy,<sup>14</sup> T-cell depletion,<sup>15</sup> and immunologic ignorance.<sup>16</sup> Their characteristics include a low proliferative capacity after allogeneic or polyclonal stimulation, an inhibition of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup><sup>10,11</sup> and CD8<sup>+</sup><sup>17</sup> immune responses in a cell-to-cell contact and dose-dependent manner. They also express higher levels of CD45RO and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) than do CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. In further characterization of the phenotype and function of these cells, Shimizu et al<sup>18</sup> and McHugh et al<sup>19</sup> demonstrated the surface expression of the glucocorticoid-induced tumor necrosis factor (TNF) receptor, which appears to be implicated in regulatory function. While these CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells evidently have the potential for therapeutic use, several limitations have precluded their successful exploitation. Only small numbers of cells can be obtained, and their proliferative potential appears limited. Moreover, only a minority of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes have suppressive activity<sup>20</sup> and this function is antigen nonspecific,<sup>21</sup> since these cells fail to interact with antigen-presenting cells (APCs) and hence cannot recognize MHC-bound peptides. Instead, they inhibit T-cell responses by T-cell-to-T-cell interaction.<sup>22</sup> This lack of specificity reduces their therapeutic potential in humans. These shortcomings have prompted an effort to discover mechanisms able to generate so-called inducible regulatory T cells (Trs). A description of these antigen-induced and antigen-specific Trs, the

From the Center for Cell and Gene Therapy and the Departments of Pediatrics and Medicine, Baylor College of Medicine, Texas Children's Hospital, and The Methodist Hospital, Houston, TX.

Submitted January 15, 2004; accepted March 2, 2004. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, March 16, 2004; DOI 10.1182/blood-2004-01-0182.

Supported by a grant from the "Association pour la Recherche sur le Cancer"

(ARC), France (S.V.), and grants from "Comitato Maria Letizia Verga per lo studio e la cura della leucemia del bambino," Monza, Italy, and "Fondazione Cassa di Risparmio di Genova ed Imperia-Associazione Cristina Bassi contro le leucemie acute dell'adulto," Genova, Italy (E.B.).

**Reprints:** Stephane Vigouroux, Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, 6621 Fannin St, Houston, TX 77030; e-mail: sxvigor@txccc.org.

© 2004 by The American Society of Hematology

processes involved in their induction, the evidence for their antigen specificity, and the mechanisms by which they induce suppression are the subjects of the remainder of this review.

## Some preliminary definitions

There is as yet no uniformly agreed upon definition or terminology for inducible regulatory T cells, which have been described as having either suppressor or regulatory functions. "Suppressor" is the historical term, first used in 1971 by Gershon and Kondo<sup>1</sup>, but the more-recent term "regulatory" is generally preferred because of the years of skepticism surrounding *I-J*-regulated suppressor T cells. The fundamental property defining a Tr is its ability to transfer immune unresponsiveness *in vivo* from one animal to another, or *in vitro* from one culture to another. The relationship of surrogate measures (such as phenotype and patterns of cytokine production) to the active transfer of suppression remains uncertain. The transfer of unresponsiveness is commonly assessed *in vitro* by the inhibition of proliferation or cytotoxicity. *In vivo*, the end points are inhibition of autoimmune phenomena, allergic reactions, or allograft rejection, characterized by dose dependence and antigen specificity. Some investigators further separate T regulatory cells into subsets according to the cytokines they produce. Tr1s secrete IL10 and only small amounts of IL2, IL4, and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), in contrast to T helper 3 (Th3) regulatory cells, which secrete high levels of TGF $\beta$  but only small amounts of IL10 and IL4. Whether these distinctions represent developmental or functional differences, or both, remains unclear. The antigen-specific responses of Trs have been termed cell-contact dependent, as they require physical contact between the Trs and APCs and the responding T cells. However, some systems have been reported to be cell-contact independent and appear to rely on soluble factors.

Unlike naturally occurring antigen nonspecific Trs, inducible and antigen-specific Trs have not yet been assigned a surface phenotype based solely on CD4/CD8 or CD25 and CD28 molecules. Instead, the regulatory activity may be distributed among multiple cell fractions including those defined as CD4 $^+$ CD25 $^+$ ,<sup>23,24</sup> CD4 $^+$ CD25 $^-$ ,<sup>25,26</sup> CD8 $^+$ ,<sup>27,28</sup> CD8 $^+$ CD28 $^-$ ,<sup>29</sup> or even CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD25 $^+$ CD28 $^-$ .<sup>30</sup> This heterogeneity likely reflects both multiple routes of induction and disparate physiologic functions.

## Mechanisms by which antigen-specific regulatory T cells are induced

### Mucosal (oral, tracheal, nasal) or cutaneous delivery of the antigen

Oral delivery of antigens is a well-established mechanism of tolerance induction, whose physiologic purpose likely relates to prevention of harmful immune responses to food proteins and bacterial antigens present in the mucosal flora.<sup>31-33</sup> Low doses of oral antigens induce Trs, whereas high doses result in clonal anergy or deletion.<sup>31,32</sup> In several murine models of autoimmune disease, administration of the self-antigen by the oral route induces antigen-specific Trs (of the Th3 subgroup) that are CD4 $^+$  or CD8 $^+$ .<sup>31,34,35</sup> While these Th3 cells secrete high levels of TGF $\beta$ , the contribution of this cytokine to the suppression observed is unclear. Administration of human insulin either orally<sup>36</sup> or by aerosol<sup>37</sup> to nonobese diabetic (NOD) mice induces CD4 $^+$  or CD8 $^+$  Trs, respectively, that render the animals hyporesponsive to this protein

when injected by an otherwise immunostimulatory route. Similarly, in a murine model of allergic encephalomyelitis, the epicutaneous administration of the allergen induces antigen-specific CD4 $^+$  Trs that suppress immunity in a cell-contact-dependent manner.<sup>38</sup>

Tolerance to alloantigens can also be induced by this approach. In rats, oral exposure to alloantigen generates CD8 $^+$  Trs within kidney grafts that will prolong graft survival when transferred to naive animals.<sup>39</sup> Similarly, intratracheal delivery of either allogeneic splenocytes<sup>40</sup> or allogeneic peptides<sup>41</sup> prolongs the survival of allogeneic cardiac grafts by inducing donor-specific Trs that secrete IL4 and IL10. The activity of the Trs induced by this approach may be further enhanced by using antibodies to block the CD40-CD40 ligand (L) pathway (see next section), under which conditions there may be indefinite survival of allogeneic cardiac grafts in mice.<sup>42</sup>

In summary, efforts to induce antigen-specific Trs by mucosal or cutaneous delivery of the antigen have made it clear that regulation can be achieved by several different cell populations functioning toward the same regulatory end, albeit through different means. Mucosal surfaces and skin provide a favorable environment for the induction of antigen-specific Trs, although the mechanism(s) by which exposure to unique subsets of APCs or to a particular cytokine/chemokine milieu promotes this outcome remains unknown.

### Suboptimal costimulatory signals during T-cell recognition of antigen

When T cells recognize their specific peptides through the antigen-specific TCR, several additional receptor-ligand interactions transduce additional signals and stabilize the binding process, permitting T-cell activation and clonal expansion. The CD3 T-cell surface molecule, composed of 3 proteins ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) noncovalently associated with the TCR $\alpha\beta$  heterodimer, allows the T cell to engage its specific antigen. The CD8 and CD4 proteins bind to nonpolymorphic regions of MHC class I and class II molecules, respectively, and together with CD3, transduce signals initiating T-cell activation during antigen recognition. CD4 and CD8 are 2 of a series of molecules that support the interaction between T cells and their antigen-presenting target cells. Important costimulatory signals include CD40 ligand (CD154), which is expressed on activated CD4 T cells after antigen recognition and binds to CD40 on APCs such as dendritic cells (DCs). After engagement of CD40, there is up-regulation of other costimulatory molecules, including CD80 and CD86, followed by the initiation of a cascade of signaling events that induce full T-cell activation and proliferation. The TCRs CD28 and CTLA-4 are members of the immunoglobulin supergene family. Both bind the same ligands, CD80 and CD86. CTLA-4 has a higher binding avidity and is expressed on activated and memory T cells, acting as a potent negative regulator of the T-cell response; whereas CD28 is expressed on naive and activated T cells and induces activation, IL2 secretion, and proliferation. Thus, CD28 mediates the differentiation of naive cells into effector cells, while CTLA-4 is thought to play a role in terminating T-cell response and in the induction of self-tolerance.

Blocking some of these critical ancillary signals at the time of TCR engagement by antigen may lead to the induction of Trs. This effect was first clearly shown by Waldmann's group with nonlytic monoclonal antibodies (mAbs)<sup>43,44</sup> to CD4 and CD8. In a series of mouse transplant models (skin, heart, bone marrow), such antibodies induced CD4 $^+$  Trs that transferred tolerance to naive recipients. The alloantigen-specific regulatory activity was found in both the CD25 $^+$  and CD25 $^-$  subpopulations.<sup>26,45</sup> Suppression was maintained only if Trs were continuously exposed to alloantigens in the

donor graft. Similarly, Belghith et al<sup>23</sup> showed that nondepleting, nonmitogenic CD3-specific antibody induced Trs that prevented the onset of diabetes in a NOD mouse model. These Trs were antigen-specific, predominantly CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, and mediated their suppressive activity by the secretion of TGF $\beta$ .

Interruption of the CD40-CD40L pathway may also lead to induction of antigen-specific Trs. Indeed, treatment with anti-CD40L mAb yielded donor-specific CD4<sup>+</sup> Trs that inhibited both naive and primed alloreactive T cells in vitro and in vivo.<sup>46,47</sup> Such regulatory activity requires cell-to-cell contact.<sup>46</sup> A CD40L blockade also prevented the development of diabetes in a murine model in which lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins were expressed in pancreatic islet cells; adoptive transfer of the Trs prevented the induction of diabetes in LCMV-transgenic recipients. These Trs were of an unusual phenotype, expressing both CD11c, a DC-associated marker, and NK1.1, a marker of natural killer cells; a further illustration of the wide variety of regulatory mechanisms utilized by the immune system.<sup>48</sup> It is likely that blockade of other costimulatory molecules on APCs will have a similar effect, and certainly interruption of both CD40 and CD86 binding can induce human alloantigen-specific Trs in vitro.<sup>49</sup> Of note, inactivation of the downstream signal transduction components of these costimulatory molecules can produce effects that are essentially identical to those achieved by obstructing the receptors themselves. For example, blockade of nuclear factor  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B) nuclear translocation will generate antigen-specific CD4 Trs,<sup>50</sup> raising the possibility of developing targeted small molecules for Tr induction.

The above findings indicate that Trs are induced by blocking the individual molecular components required for optimal T-cell activation. Thus, in the absence of all such costimulatory interactions, Tr development might be even more strongly favored. Immature dendritic cells (iDCs) are a class of APCs expressing low levels of MHC antigens and the costimulatory molecules CD40, CD80, and CD86. They also secrete low levels of immunostimulatory cytokines such as IL12.<sup>51</sup> Human iDCs can be generated in vitro by culturing monocytes for 5 to 6 days in the presence of IL4 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GMCSF). If allogeneic iDCs are added<sup>52</sup> to naive cord blood-derived CD4<sup>+</sup> T cells, Tr cells are generated that are hyporesponsive to repeat allostimulation—even with mature allogeneic DCs—and suppressive in adoptive transfer experiments. These CD4<sup>+</sup> Trs express CTLA-4 and secrete IL10. iDC-mediated inhibition requires cell-to-cell contact, but unlike “classically” induced Trs, it is not specific for the inducing alloantigens; however, such lack of specificity is not an invariable consequence of using iDCs to induce Trs, and more likely represents the consequence of using naive cord blood-derived CD4<sup>+</sup> T cells as Tr precursors. Hence, when iDCs were loaded with an influenza matrix peptide and injected subcutaneously into 2 healthy volunteers, it was possible to obtain CD8 Trs from the circulation that secreted IL10 and inhibited the proliferation of autologous T cells in a cell contact-dependent and antigen-specific manner.<sup>28,53</sup> Similarly, Jiang et al<sup>54</sup> have reported the in vitro induction of human allopeptide-specific CD4 Trs after peptide presentation by iDCs. These Trs suppressed T-cell responses in an antigen-specific, dose-dependent manner, and required cell contact for their activity. As a final example, when Steinbrink et al<sup>55</sup> treated iDCs with IL10 to further diminish expression of costimulatory molecules, they generated alloantigen- and peptide-specific human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Trs, both of which acted in a cell contact- and dose-dependent manner. Allogeneic irradiated CD2-depleted peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) can also function as immature APCs. These cells induce

alloantigen-specific Trs from the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cell population of the stimulated PBMCs, and again function in a cell contact- and dose-dependent manner.<sup>29</sup>

Similar observations have been made with immature murine DCs (imDCs), suggesting that this is a generalizable phenomenon. The DEC-205 receptor is involved in antigen endocytosis and is present almost exclusively on imDCs. Mahnke et al<sup>24</sup> coupled ovalbumin (OVA) to a DEC-205 mAb and injected it into Balb/C mice seeded with T cells expressing an OVA-specific transgenic TCR. This protocol induced antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Trs which appeared to originate from a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cell population and suppressed the T-cell response in a cell contact- and dose-dependent manner.

Although exposure to immature DCs generally favors induction of Trs, whereas exposure to mature DCs induces both helper and cytotoxic T cells, there is at least one exception. When stimulated by IL3 and CD40L, so-called plasmacytoid T cells in human tonsils mature into plasmacytoid dendritic cells<sup>56</sup> (PDCs, or DC2, to distinguish them from monocyte-derived DC1). These apparently mature PDCs express high levels of CD40, CD80, and CD86 while having limited phagocytic and endocytic ability.<sup>56</sup> They can produce alloantigen-specific CD8 Trs in vitro. Unlike most antigen-specific Trs however, these cells mediate their inhibitory function by producing IL10<sup>27</sup> and the effects can be blocked with IL10 mAb.

Hence, suboptimal costimulation during antigen presentation, however achieved, induces murine and human Trs both in vitro and in vivo. It has been suggested that interaction with iDCs represents an important physiologic mechanism for sustaining or re-establishing tolerance to self-antigens, for example, after bacterial or viral infections.<sup>57</sup>

#### Positive signaling by ligand-receptor interaction

Besides the lack of signals, discussed in the previous section, it is evident that Trs can be induced by certain positive signals to T cells. Engagement of CD2 by leukocyte function-associated antigen 3 (LFA-3, or CD58) expressed on DCs supports intercellular adhesion and transduces signals enhancing TCR-mediated activation. Wakkach et al<sup>58</sup> demonstrated that engagement of CD2 on human naive CD4 T cells leads to their differentiation into Tr1 and that HLA-DR1-specific Trs were generated from HLA-DR1-negative donors when LFA-3 was coexpressed with HLA-DR1 on APCs. Stimulation of the T-cell surface molecule ICOS (inducible costimulatory molecule)<sup>56,57</sup> and Notch during antigen presentation has also been shown to induce antigen-specific Trs.<sup>58-64</sup>

The ICOS molecule has been implicated in the regulation of the Th2 memory response. After activation by its ligand, ICOS binds phosphoinositide-dependent kinase 3 (PI3K) and activates phosphoinositide-dependent kinase 1 (PIK1) and protein kinase B (PKB). ICOS engagement enhances production of interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL4, and IL10.<sup>59</sup> The tolerogenic properties of the ICOS-ICOS-ligand pathway have been demonstrated both in vitro and in a murine model of asthma,<sup>60</sup> where intranasal exposure to allergen (ovalbumin) leads the DCs to induce antigen-specific CD4<sup>+</sup> Trs (as described in “Mucosal (oral, tracheal, nasal) or cutaneous delivery of the antigen”). Both the overexpression of ICOS-ligand on DCs and the secretion of IL10 were critical for the induction of Trs, since anti-IL10, anti-ICOS, and anti-ICOS-L mAbs all blocked the phenomenon.

It has also become evident, in mice and in humans, that the transmembrane receptor Notch and its ligands can contribute to the induction of Trs. Notch plays a critical role in cell fate decisions during embryogenesis and is widely expressed on hematopoietic

cells, including T cells, during postnatal life; its ligands are expressed on hematopoietic stromal cells. The Notch pathway contributes to the survival, proliferation, and fate choices of hematopoietic progenitor cells<sup>61</sup> and exerts a major role influence on the lineage commitment of lymphoid cells.<sup>62</sup> Binding of Notch ligands such as Jagged in humans and Serrate in mice induces proteolytic cleavage in the intracellular portion of the Notch receptor, releasing the intracellular domain of Notch (ICN), or “activated Notch,” which moves into the nucleus and binds to the transcription factor CBF1.<sup>63</sup> The importance of Notch and its ligands in the induction of Trs was first suggested by Hoyne et al,<sup>64,65</sup> who demonstrated that overexpression of the Notch-ligand Serrate on DCs during the phase of antigen recognition induced naive CD4 T cells to differentiate into Trs capable of transferring antigen-specific inhibition to naive recipient mice. More recently, we confirmed that such activity can be replicated with human cells in vitro.<sup>66,67</sup> Using Epstein Barr virus (EBV)-transformed B cells (lymphoblastoid cell lines) as APCs that overexpressed Jagged-1, a human counterpart of Serrate, we found that activation of the Notch pathway during antigen presentation induced CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Trs. In an alloantigen model based on CD45RA (naive) T cells, the Trs secreted high levels of TGFβ<sup>67</sup> while in a viral (EBV) model based on memory T cells, they secreted high levels of IL10.<sup>66</sup> The Trs were specific for the stimulating alloantigen and viral antigen in these models, and worked by direct cell contact in a dose-dependent manner. Hence, activation of Notch during antigen recognition can induce naive T cells to differentiate into antigen-specific Trs and may also recruit or reprogram EBV-specific memory T cells to acquire antigen-specific Tr activity.

### Positive signaling by cytokines

While cell-surface receptor-ligand systems evidently have a crucial role in the induction of Trs, increasing evidence suggests that soluble mediators such as IL10 and TGFβ also contribute to this phenomenon. Groux et al<sup>68,69</sup> generated antigen-specific CD4<sup>+</sup> Tr1s by simulating ovalbumin-specific naive CD4 T cells from DO11-10 transgenic mice, using a combination of IL10, splenic APCs, and OVA. These Tr1s inhibited colitis in a murine model, and the same approach successfully generated human alloantigen-specific Tr1s. Since these Trs were generated in an APC-dependent system, IL10 may have acted by modulating costimulatory molecules on APCs (see preceding section), or by acting directly on T cells. IL10 certainly down-regulates expression of the costimulatory molecules CD40, CD80, and CD86 on DCs,<sup>70-72</sup> possibly to levels that are suboptimal for the induction of helper (Th) or

cytotoxic (Tcyt) T lymphocytes, but are ideal for the induction of Trs. There is less evidence that Trs are induced by direct action of IL10 on CD4<sup>+</sup> T cells. Instead, most of the data suggest that after exposure to IL10 in an APC-free system, CD4<sup>+</sup> T cells become anergic but not suppressive.<sup>73-75</sup>

Although the mechanism of action of IL10 remains to be determined, this cytokine plays a major role in Tr induction in a large number of animal models, and it may afford a mechanism by which potentially immunogenic microorganisms establish persistent infection and evade Th or Tcyt responses. For example, *Bordetella pertussis* organisms interact with murine DCs to induce IL10 secretion and generate antigen-specific Tr1s from naive T cells.<sup>76</sup> These Tr1s, in turn, secrete IL10 to further enhance inhibition. In tumor immunology, IL10 has been identified as a candidate for inhibiting responses to tumor associated antigens.<sup>77</sup> The combination of IL10 and TGFβ may be either additive or synergistic for Tr induction. While such an effect has not been formally demonstrated, the combination was shown to induce alloantigen-specific murine CD4<sup>+</sup> Trs in vitro that were able to suppress a murine model of graft-versus-host disease.<sup>78</sup> The induced Trs secreted IL10, but the suppression was cell-contact dependent.

Although IL10 and TGFβ have drawn most of the attention to date, it is clear that other peptides and soluble proteins may also induce antigen-specific Trs. In a model of autoimmune uveoretinitis, Taylor and Namba<sup>79</sup> showed that antigen presentation with neuropeptide α-melanocyte-stimulating hormone induced antigen-specific CD4<sup>+</sup> Trs that in turn suppressed T-cell responses in a TGFβ-dependent manner. Other molecules not generally considered to be part of the immunologic repertoire may also contribute: for example, administration of high doses of antithrombin III (500 U/kg) led to indefinite survival of fully allogeneic murine cardiac grafts by inducing Trs.<sup>80</sup> It is possible that antithrombin III at these nonphysiologic doses has the properties of an as-yet-unidentified protease inhibitor that would normally perform this function.

In summary (Table 1; Figure 1), a range of soluble and cell-surface ligands can actively induce functionally distinct subpopulations of antigen-specific Trs.

### Cellular basis of antigen-specific regulation by Trs

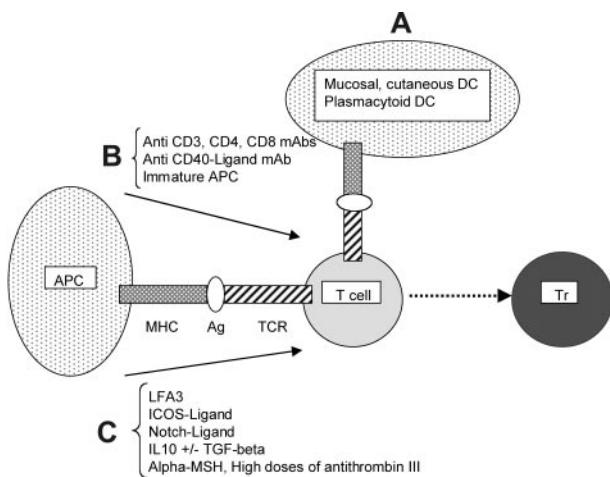
As illustrated in Figure 2A-B, the antigen-specific regulation of T-cell immunity encompasses 3 stages: antigen presentation, Tr activation, and recognition of target cells by Trs.

**Table 1. Characteristics of antigen-induced regulatory T cells**

	Trs	Means of regulatory T-cell induction							
		Mucosal M-DCs	Cutaneous M-DCs	PDCs	iDCs	Blocking antibodies*	LFA-3	Notch-L	IL10
Phenotype	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> or CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> or CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+/-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> or CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> (Tr1)
MHC restriction	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
Suppression mediator									
Cytokines	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
T cell-T cell interaction	No	?	Yes	No	Yes	?	Yes	Yes	Yes
T cell-APC interaction	Yes	?	Yes	No	Yes	?	?	Yes	?
Antigen specificity	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Reference number	29	31, 32, 34	38	27	52-55	23, 26, 43	58	65-67	68

Ts indicates regulatory T cells induced by stimulating peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with irradiated allogeneic PBMCs depleted of CD2<sup>+</sup> cells; M-DCs, mature myeloid dendritic cells; PDCs: plasmacytoid dendritic cells; iDCs, immature myeloid dendritic cells; LFA-3, leukocyte function-associated antigen 3; Notch-L, Notch ligand; IL10: interleukin 10; ?, unknown.

\*CD3, CD4, CD8, CD40 ligand mAbs.



**Figure 1.** The induction of antigen-specific regulatory T cells. The following 3 strategies can be distinguished. (A) Antigen presentation by dendritic cells (DCs) especially dedicated to the induction of regulatory T cells (Trs; mucosal or cutaneous DCs or plasmacytoid DCs). The molecular mechanisms underlying the tolerogenic properties of these DCs remain to be elucidated. (B) Antigen presentation by antigen-presenting cells (APCs) with suboptimal costimulation, achieved through use of CD3, CD4, CD8, or CD40-ligand monoclonal blocking antibodies or immature APCs. (C) Antigen presentation by mature APCs with an additional regulatory signal provided by either cell-surface molecules such as LFA-3, ICOS-ligand, Notch-ligand, or soluble factors, such as IL10 with or without TGF $\beta$ ,  $\alpha$ -MSH (melanocyte-stimulating hormone), or high doses of antithrombin III.

The first step requires the presentation of a peptide/antigen by an APC to a conventional T cell, accompanied by a “regulatory signal,” which may be the absence of an appropriate cosignal, the presence of immature or plasmacytoid DCs, or the presence of specific cell-surface or soluble molecules. The Trs generated by mucosal tolerance likely use one or more of these mechanisms, but since the “regulatory signal” has not yet been elucidated, it is possible that additional mechanisms exist. It is still unknown if during antigen recognition in a Tr-generating environment, T cells activate their Tr programs in response to specific signals or if T-cell subsets already expressing such a program simply respond to positive growth and differentiation signals.

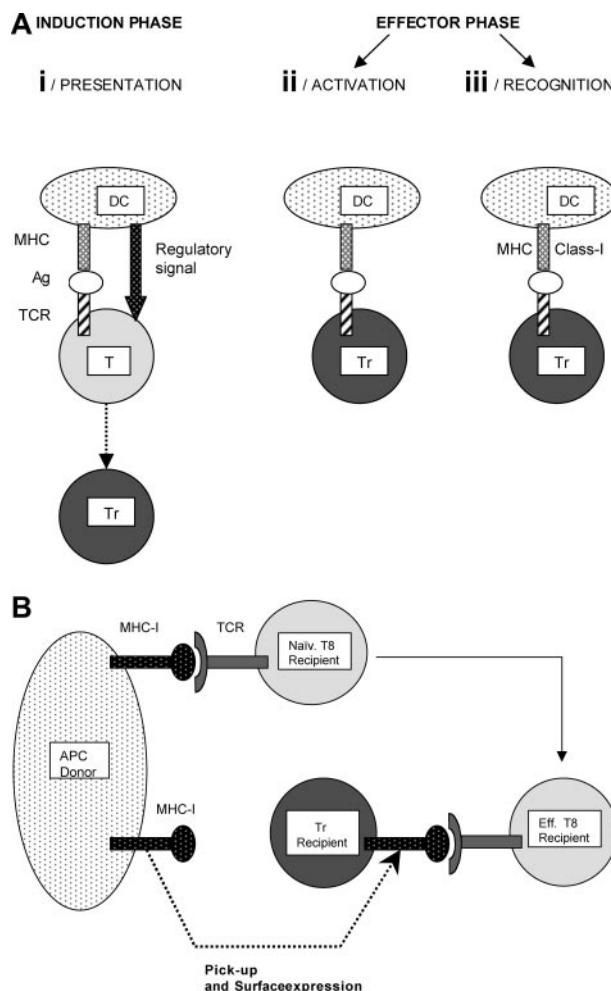
Once induced, Trs become functional when they encounter the same peptide/antigen. The requirement for this second encounter ensures that inhibitory activities are antigen-specific and limited to the desired area<sup>55,68,74,81</sup> by making activation of functional Trs a local phenomenon depending on antigen recognition. This concept of local secondary activation is supported by observations in transplant-tolerance models of Tr localization in the tolerated allograft.<sup>82,83</sup>

The third step requires antigen-specific recognition of the target cell by Trs. The cellular basis of this phenomenon remains controversial and may be context dependent. One mechanism depends on alloantigen-specific recognition of MHC class I molecules on target DCs by Trs.<sup>84</sup> Another mechanism was demonstrated in a model in which mice were transfused with allogeneic-donor specific T cells prior to receiving a skin graft from the same strain. In that system, the Tr activity prevented graft rejection<sup>30</sup> by specifically recognizing the effector CD8 T cells. In vitro investigation of this specific recognition (Figure 2B) showed that Trs acquire allogeneic MHC class I molecules from neighboring APCs and express them on their surface, thus allowing specific recognition and targeting of autologous CD8 effector T cells bearing the TCR specific for the transferred MHC molecule.

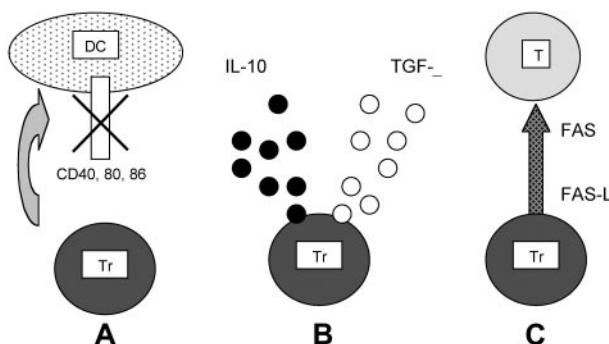
## Mechanisms of suppression

At least 3 distinct mechanisms of Tr-induced suppression have been identified (Figure 3; Table 1).

The first, down-regulation of CD40, CD80, and CD86 costimulatory molecules on DCs, has been characterized by Suciu-Foca et al<sup>22</sup> who showed that alloantigen-specific and MHC class I-restricted CD8 $^+$ CD28 $^-$  Trs inhibit CD40-mediated CD80 and CD86 up-regulation on APCs.<sup>84</sup> This defective costimulation was responsible for the lack of T-cell reactivity.<sup>22,85</sup> Recently, the same investigators demonstrated that CD8 $^+$ CD28 $^-$  T cells induce up-regulation of immunoglobulin (Ig)-like transcripts 3 and 4 on APCs, leading to decreasing expression of CD80. These data



**Figure 2.** Antigen-induced regulatory T cells: cellular basis of the antigen specificity. (A) Antigen specificity is ensured at 3 stages: presentation, activation, and recognition. (i) Presentation. A dendritic cell (DC) is presented to a conventional T cell (T) combined with a regulatory signal provided by, or accompanying the DC. The regulatory signal induces differentiation of the antigen-specific conventional T cell into an antigen-specific regulatory T cell (Tr). (ii) Activation. The Tr must encounter the same antigen again in order to become activated and fully competent to suppress the specific immune response. This antigen-driven activation ensures that suppression is limited to a particular target. (iii) Recognition. Two mechanisms support the antigen-specificity target cell (APC or T cell) recognition by Trs. First, some Trs specifically recognize MHC class I antigens on allogeneic APCs. The second mechanism is illustrated in Figure 2B. (B) Antigen-specific recognition of CD8 effector T cells by regulatory T cells. This mechanism has been described in a murine model of skin allotransplantation.<sup>30</sup> The Trs acquire allogeneic MHC class I molecules from APCs and express them on their surface. This transfer allows the Trs to recognize autologous cytotoxic CD8 effector T cells bearing a TCR specific for the transferred MHC class I molecule.



**Figure 3. Antigen-induced regulatory T cells: 3 mechanisms of suppression.** (A) After antigen-specific recognition of the target DCs, Trs inhibit CD40, CD80, and CD86 up-regulation. (B) After recognition of its specific antigen, Tr secretes IL-10 and/or TGF $\beta$ . (C) Tr activates the FAS–FAS ligand cytolytic pathway to kill the effector target T cell (T) after its specific recognition.

provide much-needed insight into the molecular mechanisms underlying the inhibitory effects of CD8 $+$ CD28 $-$  Trs.<sup>86</sup>

The second mechanism relies on IL10 and/or TGF $\beta$  secretion by antigen-activated Trs.<sup>27,31,68,74</sup> The effects of IL10 on most DCs are mediated by the Jak/Stat system with a crucial early role for the Jak1 kinase, which phosphorylates (on tyrosine) and activates the transcription factor Stat3.<sup>72</sup> This in turn inhibits secretion of the proinflammatory mediators IL1 $\beta$ , IL6, IL12, and TNF $\alpha$  by monocytes, macrophages, and immature DCs and down-regulates expression of MHC class II, CD80, and CD86 molecules on these cells. IL10 also affects the function of CD4 $+$  T cells by inhibiting NFkB activation and subsequently IL2 production.<sup>72</sup> The effects of TGF $\beta$  are mediated by the intracytoplasmic phosphorylation/activation of the Smad complex. After its transport to the nucleus, the molecule associates with transcriptional modulators and inhibits T-cell proliferation.<sup>87</sup> TGF $\beta$  also inhibits the differentiation of naive T cells and the maturation of DCs.<sup>87</sup>

In the third mechanism, initially recognized in a mouse model of skin allotransplantation, CD4 $-$ CD8 $-$  Trs specifically kill the effector CD8 $+$  T cells responsible for rejection, using the FAS–FAS ligand pathway.<sup>30</sup> This pathway was later found to be important in other Tr models.<sup>88,89</sup> So far, the FAS–FAS ligand pathway is the only cytolytic mechanism demonstrated to be active in cell contact-dependent suppression. Whether the perforin/granzyme system participates similarly in the cytolytic effects of Trs remains uncertain.

Finally, we would stress that none of the above mechanisms are mutually exclusive, and that in real life, as opposed to carefully designed reductionist models, all may operate simultaneously.

## Future challenges

The major issue facing investigators of antigen-induced Trs is whether or not our accumulated knowledge represents any advance over what was known in the 1970s and 1980s. From the “half-empty” perspective, we still lack a firm phenotypic means of identifying antigen-specific Trs. This is a crucial deficiency, as it means that we must still depend on complex and variable biologic assays to evaluate Tr induction and activity. It is also evident that multiple mechanisms may underlie the biologic end points of inhibition of proliferation and cytotoxicity ex vivo, or of graft tolerance or inhibition of autoimmune disease and allergy in vivo. This in turn greatly increases the complexity of our experimental strategies and limits how definitive our conclusions can be. Hence, the statement that “so far, no one has had a pure population of suppressor T cells in a test tube”<sup>2</sup> remains as true today as in 1988. From the “half-full” viewpoint, we now possess many powerful tools that can be used to analyze the molecular and cellular basis of the regulatory T-lymphocyte phenomenon and results to date have identified several potentially ‘drugable’ pathways that are clearly capable of inducing at least some of the activities attributed to Trs. Substantial issues remain before Trs can be introduced clinically. If, for example, investigators wished to use Trs to prevent graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic stem cell transplantation, they would first have to devise a robust and optimized protocol and validatable assays to show their functionality and specificity prior to infusion or induction in vivo. Since assays of antigen-specific regulatory T cells are currently long and complex, this is a challenging demand, and one that will likely require introduction of reliable surrogate assays. These may have to incorporate proteomic analyses rather than the cell-surface phenotyping now current. Moreover, regulatory T cells will mostly be used in environments, for example, after stem cell transplantation, in which the patient is already on immunosuppressive therapy for the underlying disease. We do not know how such immunosuppression will affect the in vivo persistence or function of antigen-specific Trs. These challenges notwithstanding, there is little doubt that the enormous potential value of antigen-specific Trs in the treatment of human disease mandates their continued investigation.

## References

- Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology*. 1971;21:903-914.
- Moller G. Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol*. 1988;27:247-250.
- Janeway CA Jr. Do suppressor T cells exist? A reply. *Scand J Immunol*. 1988;27:621-623.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155:1151-1164.
- Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al. Thymic selection of CD4 $+$ CD25 $+$  regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001;2:301-306.
- Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4 $+$ CD25 $+$  suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2002;3:33-41.
- Kohm AP, Carpenter PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4 $+$ CD25 $+$  regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002;169:4712-4716.
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25 $+$ CD4 $+$  regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192:303-310.
- Thornton AM, Shevach EM. CD4 $+$ CD25 $+$  immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188:287-296.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4 $+$ CD25 $+$  T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193:1303-1310.
- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, et al. Identification and functional characterization of human CD4 $+$ CD25 $+$  T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 2001;193:1285-1294.
- Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, et al. Human CD4 $+$ CD25 $+$  cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*. 2001;98:2736-2744.
- Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4 $+$ CD25 $+$  thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol*. 2001;31:1247-1254.
- Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med*. 1996;184:1-8.
- Miller JF, Basten A. Mechanisms of tolerance to self. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:815-821.
- Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, et al. Antigen localisation regulates immune responses in a

- dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev.* 1997;156:199-209.
17. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J Immunol.* 2001;167:1137-1140.
  18. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002;3:135-142.
  19. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002;16:311-323.
  20. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4<sup>+</sup>CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167:1245-1253.
  21. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* 2000;164:183-190.
  22. Suciu-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol.* 2003;11:235-244.
  23. Belghith M, Bluestone JA, Barriot S, et al. TGF-β-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med.* 2003;9:1202-1208.
  24. Mahne K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood.* 2003;101:4862-4869.
  25. Unger WW, Jansen W, Wolvers DA, et al. Nasal tolerance induces antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells that can transfer their regulatory capacity to naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol.* 2003;15:731-739.
  26. Graca L, Thompson S, Lin CY, et al. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol.* 2002;168:5558-5565.
  27. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;195:695-704.
  28. Dhodapkar MV, Steinman RM. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood.* 2002;100:174-177.
  29. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciu-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells. *Int Immunol.* 1998;10:775-783.
  30. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000;6:782-789.
  31. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001;182:207-214.
  32. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 2001;3:947-954.
  33. Sosrosoeno W, Bird PS, Gemmell E, Seymour GJ. Induction of suppressor cells following mucosal presentation of *Actinomyces viscosus* in mice. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:318-322.
  34. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol.* 2001;167:4245-4253.
  35. Ploix C, Bergerot I, Durand A, et al. Oral administration of cholera toxin B-insulin conjugates protects NOD mice from autoimmune diabetes by inducing CD4<sup>+</sup> regulatory T-cells. *Diabetes.* 1999;48:2150-2156.
  36. Bergerot I, Fabien N, Maguer V, Thivolet C. Oral administration of human insulin to NOD mice generates CD4<sup>+</sup> T cells that suppress adoptive transfer of diabetes. *J Autoimmun.* 1994;7:655-663.
  37. Harrison LC, Dempsey-Collier M, Kramer DR, Takahashi K. Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med.* 1996;184:2167-2174.
  38. Bynoe MS, Evans JT, Viret C, Janeway CA Jr. Epicutaneous immunization with autoantigenic peptides induces T suppressor cells that prevent experimental allergic encephalomyelitis. *Immunity.* 2003;19:317-328.
  39. Zhou J, Carr RI, Liwski RS, Stadnyk AW, Lee TD. Oral exposure to alloantigen generates intragraft CD8<sup>+</sup> regulatory cells. *J Immunol.* 2001;167:107-113.
  40. Akiyama Y, Shirasugi N, Uchida N, et al. B7/CTLA4 pathway is essential for generating regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen in mice. *Transplantation.* 2002;74:732-738.
  41. Akiyama Y, Shirasugi N, Aramaki O, et al. Intratracheal delivery of a single major histocompatibility complex class I peptide induced prolonged survival of fully allogeneic cardiac grafts and generated regulatory cells. *Hum Immunol.* 2002;63:888-892.
  42. Uchida N, Shirasugi N, Akiyama Y, et al. Induction of indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts and generation of regulatory cells by intratracheal delivery of alloantigens under blockade of the CD40 pathway. *Transplantation.* 2003;75:878-884.
  43. Waldmann H, Cobbold S. How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? *Annu Rev Immunol.* 1998;16:619-644.
  44. Qin S, Cobbold SP, Pope H, et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science.* 1993;259:974-977.
  45. Wise MP, Berman F, Cobbold SP, Waldmann H. Linked suppression of skin graft rejection can operate through indirect recognition. *J Immunol.* 1998;161:5813-5816.
  46. Taylor PA, Friedman TM, Korngold R, Noelle RJ, Blazar BR. Tolerance induction of allreactive T cells via ex vivo blockade of the CD40:CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell. *Blood.* 2002;99:4601-4609.
  47. Graca L, Honey K, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. *J Immunol.* 2000;165:4783-4786.
  48. Homann D, Jahreis A, Wolfe T, et al. CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity.* 2002;16:403-415.
  49. Koenen HJ, Joosten I. Blockade of CD86 and CD40 induces alloantigen-specific immunoregulatory T cells that remain anergic even after reversal of hyporesponsiveness. *Blood.* 2000;95:3153-3161.
  50. Martin E, O'Sullivan B, Low P, Thomas R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity.* 2003;18:155-167.
  51. Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol.* 2002;63:1156-1163.
  52. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, non-proliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000;192:1213-1222.
  53. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;193:233-238.
  54. Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechner RI. Induction of allopeptide-specific human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells ex vivo. *Blood.* 2003;102:2180-2186.
  55. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* 2002;99:2468-2476.
  56. Grouard G, Rissoo MC, Filgueira L, et al. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 1997;185:1101-1111.
  57. Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;193:F5-F9.
  58. Wakach A, Cottrez F, Groux H. Differentiation of regulatory T cells 1 is induced by CD2 costimulation. *J Immunol.* 2001;167:3107-3113.
  59. Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:544-556.
  60. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2002;8:1024-1032.
  61. Ohishi K, Katayama N, Shiku H, Varnum-Finney B, Bernstein ID. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14:143-150.
  62. Robey E. Regulation of T cell fate by Notch. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:283-295.
  63. Baron M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14:113-119.
  64. Hoyne GF, Dallman MJ, Champion BR, Lamb JR. Notch signalling in the regulation of peripheral immunity. *Immunol Rev.* 2001;182:215-227.
  65. Hoyne GF, Le RI, Corsin-Jimenez M, et al. Serate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *Int Immunol.* 2000;12:177-185.
  66. Vigouroux S, Yvon E, Wagner HJ, et al. Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes. *J Virol.* 2003;77:10872-10880.
  67. Yvon ES, Vigouroux S, Rousseau RF, et al. Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1 induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood.* 2003;102:3815-3821.
  68. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997;389:737-742.
  69. Groux H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation.* 2003;75:8S-12S.
  70. Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood.* 2003;101:3581-3589.
  71. Wakach A, Fournier N, Brun V, et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003;18:605-617.
  72. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
  73. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med.* 1996;184:19-29.
  74. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory

- CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002;195:603-616.
75. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, et al. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol.* 2001;166:5530-5539.
  76. McGuirk P, McCann C, Mills KH. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med.* 2002;195:221-231.
  77. Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, Tokura Y. Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology.* 2001;103:449-457.
  78. Chen ZM, O'Shaughnessy MJ, Gramaglia I, et al. IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells to acquire regulatory cell function. *Blood.* 2003;101:5076-5083.
  79. Taylor A, Namba K. In vitro induction of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). *Immunol Cell Biol.* 2001;79:358-367.
  80. Aramaki O, Takayama T, Yokoyama T, et al. High dose of antithrombin III induces indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts and generates regulatory cells. *Transplantation.* 2003;75:217-220.
  81. Wang HY, Lee DA, Peng G, et al. Tumor-specific human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity.* 2004;20:107-118.
  82. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med.* 2002;195:1641-1646.
  83. Young KJ, Yang L, Phillips MJ, Zhang L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2002;100:3408-3414.
  84. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Lederman S, Suciu-Foca N. Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by T suppressor cells. *Hum Immunol.* 1999;60:568-574.
  85. Cortesini R, LeMaoult J, Ciubotariu R, Cortesini NS. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol Rev.* 2001;182:201-206.
  86. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 2002;3:237-243.
  87. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:46-53.
  88. Watanabe T, Yoshida M, Shirai Y, et al. Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4<sup>+</sup> T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J Immunol.* 2002;168:2188-2199.
  89. Priatel JJ, Utting O, Teh HS. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol.* 2001;167:6188-6194.

## G / Discussion de l'article 3

Cet article est une revue générale de la littérature sur les LTR induits par opposition au LTR CD4+CD25+ naturellement présent dans le sang périphérique. Nous y avons inclus nos 2 travaux originaux démontrant le rôle de la voie Notch dans l'induction de LTR humains spécifiques d'antigènes.

Après quelques définitions préliminaires relatives aux LTR induits, nous résumons les connaissances sur les mécanismes d'induction des LTR en les divisant en 4 groupes: présentation muqueuse ou cutanée de l'antigène, costimulation sous-optimale, signal ligand-récepteur (dont l'interaction Notch-Jagged1) ou cytokine. Nous décrivons ensuite les bases cellulaires et moléculaires soutenant la spécificité antigénique et enfin nous passons en revue les différents mécanismes d'action des LTR.

## **VI / Conclusion et perspectives**

Une manière d'aborder les connaissances acquises sur les LTR est de se fixer comme objectif l'utilisation de ces cellules en thérapeutique humaine (Bluestone JA, 2005 ; Franco A et Albani S, 2006). Les domaines médicaux potentiellement concernés sont vastes car ils comprennent les maladies auto-immunes (Lan RY et al, 2005), les maladies allergiques, la prévention du rejet dans les transplantations d'organes ainsi que la prévention et/ou le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques. Dans tous ces domaines, les manifestations immunologiques pathologiques résultent potentiellement d'un défaut qualitatif ou quantitatif des LTR. Une correction de ce défaut par une thérapie cellulaire utilisant des LTR apparaît donc dans ce contexte comme un objectif raisonnable. A l'opposé, certains travaux démontrent que le développement de certaines tumeurs malignes peut être favorisé par l'inhibition de l'immunité anti-tumorale résultant d'un excès de LTR au sein de la tumeur (Beyer M et Schultze JL, 2006 ; Zou W, 2006). Dans ce cas, l'inhibition des LTR est un objectif recherché de la thérapie cellulaire.

Les premières cellules régulatrices décrites phénotypiquement furent en 1995 les lymphocytes T CD4+CD25+ naturellement présents dans le sang périphérique (Sakaguchi S, 1995). Dans l'état actuel des connaissances, l'utilisation thérapeutique de ces cellules posent au moins trois problèmes. Le premier est l'absence de marqueur phénotypique spécifique. En effet, au sein de la population lymphocytaire T CD4+CD25+, bon nombre de cellules sont des cellules effectrices activées et non des cellules régulatrices. En d'autres termes, les LTR naturels sont CD4+CD25+,

mais tous les lymphocytes CD4+CD25+ ne sont pas des LTR. Le deuxième problème est le faible nombre des lymphocytes T CD4+CD25+, problème accru par le fait que les cellules régulatrices se trouvent en fait au sein de la petite sous-population des cellules exprimant fortement le CD25 (Baecher-Allan C et al, 2001). Le troisième problème est l'absence de spécificité antigénique ou plus exactement le très large spectre des spécificités antigéniques (Fujishima M et al, 2005). Il est en effet difficile d'imaginer la présence naturelle dans l'organisme de cellules exerçant une action immunosuppressive sans aucune spécificité.

Pour ces raisons, de nombreux travaux ont été entrepris pour tenter de préciser le phénotype des LTR CD4+CD25+. Il a ainsi été démontré qu'elles exprimaient fortement les molécules de surface CD45RO, CD62-Ligand et CTLA-4 (Dieckmann D et al, 2001 ; Jonuleit H et al, 2001). Des travaux plus récents ont précisé les choses ont démontrant l'expression de GITR (Shimizu J et al, 2002) et de Foxp3 (Fontenot JD et al, 2003). L'intérêt autour de la découverte de Foxp3 est grand puisqu'il s'agit non seulement d'un marqueur phénotypique intracellulaire mais aussi d'une molécule jouant un rôle certain dans le développement et le fonctionnement des LTR. Ceci a été montré dans un modèle murin particulier (souris scurfy) dans lequel le défaut d'expression du gène Foxp3 par mutation entraîne un grave syndrome lymphoprolifératif auto-immun (Chang X et al, 2005). Un deuxième exemple intéressant est le développement de rares syndromes auto-immuns (touchant le système endocrinien et le système digestif) chez des être humains portant un gène Foxp3 muté (Bennet CL et al, 2001). Les progrès dans la caractérisation phénotypique sont donc substantiels. Cependant la possibilité offerte par ces connaissances d'isoler spécifiquement et uniquement des cellules

régulatrices reste incertaine car des résultats récents démontrent l'absence de spécificité absolue de Foxp3 pour les cellules régulatrices (Morgan ME et al, 2005 ; Gorner M et al, 2006). Ainsi, la déclaration de Goran Moller en 1988: « jusqu'à présent personne n'a pu obtenir de population cellulaire pure de cellules suppressives dans un tube à essai » reste aussi vraie aujourd'hui qu'elle l'était à l'époque.

Les deux autres problèmes de faible nombre et de manque de spécificité des LTR CD4+CD25+ peuvent théoriquement être résolus par la stimulation de ces cellules lors d'une présentation antigénique qui assurerait une spécificité antigénique aux cellules stimulées (Nishimura E et al, 2004). Il s'agit alors d'induire des lymphocytes T régulateurs spécifiques d'antigènes. En effet, les méthodes actuelles d'induction de LTR ne permettent pas de différencier entre l'expansion d'une faible population de LTR préexistants (ce qui serait le cas dans l'expansion de LTR CD4+CD25+) et l'acquisition véritable d'un phénotype régulateur par des cellules T naïves ou mémoires. Quoi qu'il en soit, tous ces efforts de recherche sur l'induction de LTR sont justifiés par le fait qu'une thérapie cellulaire immunosuppressive utilisant un nombre suffisant de cellules spécifiques d'antigènes connus est préférable à l'utilisation d'un faible nombre de cellules porteuses de nombreuses spécificités antigéniques inconnues.

Il convient toutefois de discuter ici un travail publié en 2003 et qui a démontré dans un modèle murin de réaction du greffon contre l'hôte que l'injection de lymphocytes T CD4+CD25+ permettait non seulement de limiter le risque de GvHD mais laissait parallèlement se développer un effet du greffon contre la maladie

(Edinger M et al, 2003). Dans ce travail, les cellules n'avaient pas été préalablement stimulées par les alloantigènes, stimulation qui aurait pu expliquer la spécificité allogénique observée. Ces effets, surprenants par la finesse de la spécificité observée, sont obtenus dans des modèles murins forcément éloignés de la situation physiopathologique des patients greffés à risque de GvHD. Cependant ce niveau élevé de spécificité observé avec la séparation de l'effet « greffon contre l'hôte » de l'effet « greffon contre maladie » pose des questions non encore résolues sur l'absence de spécificité ou plutôt dans ce cas de figure sur les spécificités antigéniques multiples des lymphocytes T CD4+CD25+ et invite à ne pas relâcher les efforts de recherche portant sur ces cellules. Il convient toutefois de rester prudent quant à l'utilisation de LTR sans spécificité antigénique restreinte. En effet, ces cellules pourraient exposer les patients à des risques d'infections ou de proliférations malignes. Ces risques sont particulièrement à prendre en considération dans les populations de patients greffés de moelle ou d'organes solides déjà particulièrement exposées à ces risques en raison de l'immunosuppression médicamenteuse nécessairement présente dans ces contextes cliniques.

Il est donc probable que l'avenir favorise plutôt l'utilisation de LTR induits avec une spécificité antigénique choisie, pour le traitement de certaines maladies auto-immunes, allergiques ou dans les domaines de la greffe de moelle ou d'organes. Comme nous l'avons vu, de nombreuses voies d'induction, très diverses et souvent propres à chaque modèle expérimental ont été décrites ces dernières années. Notre travail original s'inscrit dans ce contexte en démontrant que l'activation de Notch favorise l'induction de LTR humains spécifiques d'antigènes. L'induction de LTR allospécifiques après activation de Notch permet même d'envisager des applications

thérapeutiques dans les greffes d'organes ou de moelle osseuse afin de contrôler les réactions immunitaires non désirées ou excessives dans ces contextes. Il est notable que toutes les méthodes d'induction de LTR ont été décrites dans des modèles *in vitro* ou *in vivo* chez la souris. Il serait donc sans doute souhaitable dans les années qui viennent de développer des techniques d'expansion de ces cellules afin d'obtenir suffisamment de cellules pour un utilisation chez l'homme (Masteller et al, 2006). Certaines méthodes récemment décrites, reposant sur l'utilisation de cocktails cytokiniques permettent une expansion des LTR CD4+CD25+ sans perte des fonctions suppressives (Goerner M et al, 2006 ; Karakhanova S et al, 2006) et sont peut-être applicables aux LTR induits. De plus, les travaux de caractérisation phénotypique des LTR vont également se poursuivre afin d'offrir de nouvelles possibilités d'évaluer plus finement l'efficacité des différentes voies d'induction des LTR. Des résultats récents suggèrent en effet que certains lymphocytes B pourraient également avoir des fonctions régulatrices (Mizoguchi A et Bhan AK, 2006), ouvrant ainsi un nouveau champ de recherche sur les cellules régulatrices.

En conclusion, il a fallu 10 ans pour passer des lymphocytes T CD4+CD25+ naturels dont l'utilisation en thérapeutique humaine est difficile à envisager en l'état actuel des connaissances, aux lymphocytes T régulateurs induits. Le contrôle de la spécificité antigénique de ces cellules les rend plus attrayantes d'un point de vue immunologique et clinique. Il est probable que les 10 prochaines années verront s'accélérer les travaux de recherche visant à expandre et mieux caractériser ces cellules, pavant ainsi la voie pour de futures applications cliniques. Cette probabilité est d'autant plus élevée qu'après la période initiale de scepticisme autour des

lymphocytes T régulateurs, ces cellules constituent actuellement et à juste titre l'un des domaines les plus stimulants de la recherche en immunologie.

## Références

- Abbas AK and Lichtman AH. (2003) Cellular and molecular immunology. Fifth Edition. Saunders Editions.
- Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH et al. (2002) Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 8:1024-1032.
- Akiyama Y, Shirasugi N, Uchida N et al. (2002) B7/CTLA4 pathway is essential for generating regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen in mice. *Transplantation.* 74:732-738.
- Akiyama Y, Shirasugi N, Aramaki O et al. (2002) Intratracheal delivery of a single major histocompatibility complex class I peptide induced prolonged survival of fully allogeneic cardiac grafts and generated regulatory cells. *Hum Immunol.* 63:888-892.
- Almeida AR, Rocha B, Freitas AA et al. (2005) Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin Immunol.* Jun;17(3):239-49.
- Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Yvon E et al. (2003) Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. *Blood.* Sep 15;102(6):2292-9.
- Aramaki O, Takayama T, Yokoyama T et al. (2003) High dose of antithrombin III induces indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts and generates regulatory cells. *Transplantation.* 75:217-220.
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. (1995) Notch signaling. *Science.* Apr 14;268(5208):225-32. Review
- Asherson GL, Zembala M. (1976) Suppressor T cells in cell-mediated immunity. *Br Med Bull.* May;32(2):158-64.
- Aster JC, Xu L, Karnell FG, Patriub V et al. (2000) Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol Cell Biol.* Oct;20(20):7505-15.
- Baecker-Allan C, Brown JA, Freeman GJ et al. (2001) CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 167:1245-1253.
- Barchet W, Price JD, Cella M et al. (2006) Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell responses but allow for dendritic-cell maturation. *Blood.* Feb 15;107(4):1497-504.

Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A et al. (2002) In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 195:603-616.

Belghith M, Bluestone JA, Barriot S et al. (2003) TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med.* Sep;9(9):1202-8.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* Jan;27(1):20-1.

Bergerot I, Fabien N, Maguer V et al. (1994) Oral administration of human insulin to NOD mice generates CD4+ T cells that suppress adoptive transfer of diabetes. *J Autoimmun.* 7:655-663.

Beyer M, Schultze JL. (2006) Regulatory T cells in cancer. *Blood.* 2006 Aug 1;108(3):804-11.

Bluestone JA. (2005) Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nat Rev Immunol.* Apr;5(4):343-9.

Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC et al. (2004) Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med.* Dec 20;200(12):1623-33.

Bynoe MS, Evans JT, Viret C et al. (2003) Epicutaneous immunization with autoantigenic peptides induces T suppressor cells that prevent experimental allergic encephalomyelitis. *Immunity.* 19:317-328.

Chai JG, Xue SA, Coe D et al. (2005) Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation.* May 27;79(10):1310-6.

Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS et al. (2002) Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 3:237-243.

Chang X, Gao JX, Jiang Q et al. (2005) The Scurfy mutation of FoxP3 in the thymus stroma leads to defective thymopoiesis. *J Exp Med.* Oct 17;202(8):1141-51.

Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L et al. (2005) Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 11;102(2):419-24.

Chen ZM, O'Shaughnessy MJ, Gramaglia I et al. (2003) IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function. *Blood.* 101:5076-5083.

Cong Y, Konrad A, Iqbal N et al. (2005) Generation of antigen-specific, Foxp3-expressing CD4+ regulatory T cells by inhibition of APC proteosome function. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2787-95.

Copelan EA. (2006) Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* Apr 27;354(17):1813-26.

Cortesini R, LeMaoult J, Ciubotariu R et al. (2001) CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol Rev.* 182:201-206.

Csencsits K, Wood SC, Lu G et al. (2005) Transforming growth factor-beta1 gene transfer is associated with the development of regulatory cells. *Am J Transplant.* Oct;5(10):2378-84.

Dallman MJ, Smith E, Benson RA et al. (2005) Notch: control of lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr Opin Immunol.* Jun;17(3):259-66. Review.

Deftos ML, Bevan MJ. (2000) Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol.* Apr;12(2):166-72.

Dhopakar MV, Steinman RM. (2002) Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood.* 2002;100:174-177.

Dhopakar MV, Steinman RM, Krasovsky J et al. (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;193:233-238.

Dieckmann D, Plotter H, Berchtold S et al. (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 193:1303-1310

Edinger M, Hoffmann P, Ermann J et al. (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med.* Sep;9(9):1144-50.

Ellisen LW, Bird J, West DC et al. (1991) TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* Aug 23;66(4):649-61.

Every AL, Kramer DR, Mannerling SI et al. (2006) Intranasal vaccination with proinsulin DNA induces regulatory CD4+ T cells that prevent experimental autoimmune diabetes. *J Immunol.* Apr 15;176(8):4608-15.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G et al. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* May 1;172(9):5149-53.

Ferrara JL, Reddy P. (2006) Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol.* Jan;43(1):3-10.

Fischer K, Voelkl S, Heymann J et al. (2005) Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2828-35.

Franco A, Albani S. (2006) Translating the concept of suppressor/regulatory T cells to clinical applications. *Int Rev Immunol*. Jan-Apr;25(1-2):27-47. Review.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.

Fu S, Yopp AC, Mao X et al. (2004) CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am J Transplant*. Jan;4(1):65-78.

Fu S, Zhang N, Yopp AC et al. (2004) TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*. 2004 Oct;4(10):1614-27.

Fujishima M, Hirokawa M, Fujishima N et al. (2005) TCRalpha/beta repertoire diversity of human naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Immunol Lett*. Jul 15;99(2):193-7.

Gershon RK, Kondo K. (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology*. Dec;21(6):903-14.

Gilliet M, Liu YJ. (2002) Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 195:695-704.

Karakhanova S, Munder M, Schneider M et al. (2006) Highly efficient expansion of human CD4+CD25+ regulatory T cells for cellular immunotherapy in patients with graft-versus-host disease. *J Immunother*. May-Jun;29(3):336-49.

Gorelik L, Flavell RA. (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol*. 2:46-53.

Graca L, Honey K, Adams E et al. (2000) Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. *J Immunol*. 165:4783-4786.

Graca L, Thompson S, Lin CY et al. (2002) Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol*. 168:5558-5565.

Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. (2002) Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med*. 195:1641-1646.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W et al. (2004) Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. Oct;21(4):589-601.

Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L et al. (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 185:1101-1111.

Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 389:737-742.

Groux H. (2003) Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation*. 75:8S-12S

Groux H, Bigler M, de Vries JE et al. (1996) Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*. 184:19-29.

Harrison LC, Dempsey-Collier M, Kramer DR et al. (1996) Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med*. 184:2167-2174.

Hoffmann P, Edinger M. (2006) CD4+CD25+ regulatory T cells and graft-versus-host disease. *Semin Hematol*. Jan;43(1):62-9.

Homann D, Jahreis A, Wolfe T et al. (2002) CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity*. 16:403-415.

Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B et al. (2005) Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 3;102(18):6449-54.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

Hoyne GF, Dallman MJ, Champion BR et al. (2001) Notch signalling in the regulation of peripheral immunity. *Immunol Rev*. Aug;182:215-27.

Hoyne GF, Le Roux I, Corsin-Jimenez M et al. (2000) Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *Int Immunol*. Feb;12(2):177-85.

Janeway CA Jr. (1988) Do suppressor T cells exist? A reply. *Scand J Immunol*. Jun;27(6):621-3.

Jarriault S, Le Bail O, Hirsinger E et al. (1998) Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol*. Dec;18(12):7423-31.

Jiang S, Camara N, Lombardi G et al. (2003) Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. *Blood*. 102:2180-2186.

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M et al. (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 2001;193:1285-1294.

Karakhanova S, Munder M, Schneider M et al. (2006) Highly efficient expansion of human CD4+CD25+ regulatory T cells for cellular immunotherapy in patients with graft-versus-host disease. *J Immunother*. May-Jun;29(3):336-49.

Kemper C, Chan AC, Green JM et al. (2003) Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature*. Jan 23;421(6921):388-92.

Koenen HJ, Joosten I. (2000) Blockade of CD86 and CD40 induces alloantigen-specific immunoregulatory T cells that remain anergic even after reversal of hyporesponsiveness. *Blood*. 95:3153-3161.

Kronenberg M, Goverman J, Haars R et al. (1985) Rearrangement and transcription of the beta-chain genes of the T-cell antigen receptor in different types of murine lymphocytes. *Nature*. Feb 21-27;313(6004):647-53.

Kuwana M. (2002) Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol*. Dec;63(12):1156-63.

Lan RY, Ansari AA, Lian ZX et al. (2005) Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2005 Jul;4(6):351-63.

Leong KG, Karsan A. (2006) Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*. Mar 15;107(6):2223-33.

Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F et al. (2001) IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol*. 166:5530-5539.

Liu Z, Tugulea S, Cortesini R et al. (1998) Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol*. 10:775-783.

Liu Z, Tugulea S, Cortesini R et al. (1999) Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by T suppressor cells. *Hum Immunol*. 60:568-574.

Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. (2006) Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci*. Feb;7(2):93-102.

Luo X, Yang H, Kim IS et al. (2005) Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation*. May 15;79(9):1091-6.

Mahnke K, Qian Y, Knop J et al. (2003) Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*. 101:4862-4869.

Martin E, O'Sullivan B, Low P et al. (2003) Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity*. 18:155-167.

Masteller EL, Tang Q, Bluestone JA. (2006) Antigen-specific regulatory T cells -- ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol*. 2006 Apr;18(2):103-10.

McGuirk P, McCann C, Mills KH. (2002) Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10

production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med.* 195:221-231.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA et al. (2002) CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* Feb;16(2):311-23.

Miller JF, Basten A. (1996) Mechanisms of tolerance to self. *Curr Opin Immunol.* 8:815-821.

Mizoguchi A, Bhan AK. (2006) A case for regulatory B cells. *J Immunol.* Jan 15;176(2):705-10.

Moller G. (1988) Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol.* Mar;27(3):247-50. Review.

Moore KW, de Waal MR, Coffman RL et al. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 19:683-765.

Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM et al. (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol.* 2005 Jan;66(1):13-20.

Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F et al. (2001) Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood.* Nov 1;98(9):2736-44.

Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R et al. (2004) Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004 Aug;16(8):1189-201.

Ohishi K, Katayama N, Shiku H et al. (2003) Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol.* Apr;14(2):143-50.

Piccirillo CA, Shevach EM. (2001) Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 167:1137-1140.

Pierce CW, Kapp JA. (1980) Activities of nonspecific and specific suppressor T-cell factors in immune responses. *Agents Actions Suppl.* 7:126-33.

Ploix C, Bergerot I, Durand A et al. (1999) Oral administration of cholera toxin B-insulin conjugates protects NOD mice from autoimmune diabetes by inducing CD4+ regulatory T-cells. *Diabetes.* 48:2150-2156.

Priatel JJ, Utting O, Teh HS. (2001) TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol.* Dec 1;167(11):6188-94.

Price JD, Schaumburg J, Sandin C et al. (2005) Induction of a regulatory phenotype in human CD4+ T cells by streptococcal M protein. *J Immunol.* Jul 15;175(2):677-84.

Qin S, Cobbold SP, Pope H et al. (1993) "Infectious" transplantation tolerance. *Science*. 259:974-977.

Qin HY, Mukherjee R, Lee-Chan E et al. (2006) A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol*. Jul;18(7):1001-15.

Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I et al. (2004) Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med*. Nov 1;200(9):1123-34.

Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. (2001) Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med*. Jan 15;193(2):F5-9

Rooney CM, Smith CA, Ng CY et al. (1995) Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet*. Jan 7;345(8941):9-13.

Rooney CM, Smith CA, Ng CY et al. (1998) Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*. Sep 1;92(5):1549-55.

Rossig C, Bolland CM, Nuchtern JG et al. (2002) Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood*. Mar 15;99(6):2009-16.

Rousseau RF, Biagi E, Dutour A et al. (2006) Immunotherapy of high-risk acute leukemia with a recipient (autologous) vaccine expressing transgenic human CD40L and IL-2 after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. Feb 15;107(4):1332-41.

Rousseau RF, Haight AE, Hirschmann-Jax C et al. (2003) Local and systemic effects of an allogeneic tumor cell vaccine combining transgenic human lymphotactin with interleukin-2 in patients with advanced or refractory neuroblastoma. *Blood*. Mar 1;101(5):1718-26.

Rudd CE, Schneider H. (2003) Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 3:544-556.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. Aug 1;155(3):1151-64.

Sato K, Yamashita N, Baba M et al. (2003) Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood*. 101:3581-3589.

Schwartz RH. (1996) Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med*. 184:1-8.

Seo N, Hayakawa S, Takigawa M et al. (2001) Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology*. 103:449-457.

Shayakhmetov DM, Lieber A. (2000) Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol*. Nov;74(22):10274-86.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T et al. (2002) Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. Feb;3(2):135-42.

Sosroseno W, Bird PS, Gemmell E et al. (2003) Induction of suppressor cells following mucosal presentation of *Actinomyces viscosus* in mice. *Oral Microbiol Immunol*. 18:318-322.

Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, et al. (2002) CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*. 99:2468-2476.

Steinmetz M, Minard K, Horvath S et al. (1982) A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature*. Nov 4;300(5887):35-42.

Straathof KC, Bolland CM, Popat U et al. (2005) Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus--specific T lymphocytes. *Blood*. Mar 1;105(5):1898-904.

Suci-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. (2003) Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol*. 11:235-244.

Sun Y, Ge BS, Kasai M et al. (2006) Induction of regulatory T cells from mature T cells by allogeneic thymic epithelial cells in vitro. *Transpl Int*. May;19(5):404-14.

Taylor PA, Friedman TM, Korngold R et al. (2002) Tolerance induction of alloreactive T cells via ex vivo blockade of the CD40:CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell. *Blood*. 99:4601-4609.

Taylor A, Namba K. (2001) In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). *Immunol Cell Biol*. 79:358-367.

Thornton AM, Shevach EM. (2000) Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*. 164:183-190.

Trenado A, Charlotte F, Fisson S et al. (2003) Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*. Dec;112(11):1688-96.

Uchida N, Shirasugi N, Akiyama Y et al. (2003) Induction of indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts and generation of regulatory cells by intratracheal delivery of alloantigens under blockade of the CD40 pathway. *Transplantation*. 75:878-884.

Unger WW, Jansen W, Wolvers DA et al. (2003) Nasal tolerance induces antigen-specific CD4+CD25- regulatory T cells that can transfer their regulatory capacity to naive CD4+ T cells. *Int Immunol*. 15:731-739.

Wakkach A, Cottrez F, Groux H. (2001) Differentiation of regulatory T cells 1 is induced by CD2 costimulation. *J Immunol*. 167:3107-3113.

Wakkach A, Fournier N, Brun V et al. (2003) Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 18:605-617.

Waldmann H, Cobbold S. How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? *Annu Rev Immunol*. 1998;16:619-644.

Walker MR, Carson BD, Nepom GT et al. (2005) De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 15;102(11):4103-8.

Wang HY, Lee DA, Peng G et al. (2004) Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity*. Jan;20(1):107-18.

Watanabe T, Yoshida M, Shirai Y et al. (2002) Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4+ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J Immunol*. 2002;168:2188-2199.

Wei S, Kryczek I, Zou L et al. (2005) Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*. Jun 15;65(12):5020-6.

Wei S, Kryczek I, Zou W. (2006) Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood*. Jul 15;108(2):426-31.

Weigmann B, Jarman ER, Sudowe S et al. (2006) Induction of regulatory T cells by leflunomide in a murine model of contact allergen sensitivity. *J Invest Dermatol*. Jul;126(7):1524-33.

Weiner HL. (2001) Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 182:207-214.

Weiner HL. (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*. 3:947-954.

Wise MP, Bemelman F, Cobbold SP et al. (1998) Linked suppression of skin graft rejection can operate through indirect recognition. *J Immunol*. 61:5813-5816.

Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I et al. (2004) Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood*. Nov 15;104(10):3294-301.

Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F et al. (2001) Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem.* Nov 30;276(48):45031-40.

Yotnda P, Onishi H, Heslop HE et al. (2001) Efficient infection of primitive hematopoietic stem cells by modified adenovirus. *Gene Ther.* Jun;8(12):930-7.

Young KJ, Yang L, Phillips MJ et al. (2002) Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood.* 100:3408-3414.

Zhang X, Izikson L, Liu L et al. (2001) Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol.* 67:4245-4253.

Zhang ZX, Yang L, Young KJ et al. (2000) Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 6:782-789.

Zhou J, Carr RI, Liwski RS et al. (2001) Oral exposure to alloantigen generates intragraft CD8+ regulatory cells. *J Immunol.* Jul 1;167(1):107-13.

Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P et al. (1997) Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev.* 156:199-209.

Zou W. (2006) Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* Apr;6(4):295-307.

## RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS

Les lymphocytes T régulateurs (LTR) sont des cellules immunosuppressives régulant la tolérance périphérique. Notch est une famille de récepteurs transmembranaires exprimés à la surface des lymphocytes jouant un rôle important dans la lymphopoïèse. L'activation de Notch est secondaire à la liaison avec son ligand Jagged1.

Nous avons démontré dans 2 modèles de stimulation antigénique *in vitro* (virale et allogénique) que la surexpression de Jagged1 sur des lymphocytes B humains transformés par l'Epstein Barr virus (EBV) utilisées comme cellules présentatrices d'antigènes et mises en culture avec des lymphocytes T humains permettait l'induction de LTR spécifiques de l'EBV dans le premier modèle et des alloantigènes dans le second.

Ces résultats démontrent que l'activation forcée de Notch lors d'une présentation antigénique permet l'induction de LTR spécifiques d'antigènes et ajoutent à Notch un rôle possible dans la régulation du système immunitaire périphérique.

## Induction of human Regulatory T lymphocytes by activation of the Notch pathway

Regulatory T lymphocytes (Tr) are immunosuppressive cells that regulate the peripheral tolerance. Notch is a family of transmembrane receptors expressed at the surface of lymphocytes. Notch plays an important role in the lymphopoiesis. The ligation of the ligand Jagged1 induces the activation of Notch.

We have demonstrated in two models of antigenic stimulation *in vitro* (viral and allogeneic) that overexpression of Jagged1 on human B cells transformed by the Epstein Barr Virus (EBV) used as antigen presenting cells and cultured with human T lymphocytes induced EBV specific Tr in the first model and allogeneic specific Tr in the second one.

These results demonstrate that forced activation of Notch during an antigenic stimulation induce antigen specific Tr and add to Notch a possible role in the regulation of the peripheral immune system.