

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**Induction de tolérance en transplantation par blocage de la voie
CD40/CD40L: caractérisation des cellules tolérogènes induites chez
le rat et évaluation chez le primate**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

ANGIN Mathieu

Le 22 décembre 2008, devant le jury ci-dessous

Président Yan CHEREL, Professeur, Nantes

Rapporteurs Antoine BLANCHER, Professeur, Toulouse

..... Alain LE MOINE, Docteur, Bruxelles

Examineur Yan CHEREL, Professeur, Nantes

Directeur de thèse Brigitte LE MAUFF, Professeur, Caen

Sommaire

Sommaire	2
Abréviations.....	7
Liste des figures	9
Liste des tableaux	13
Avant Propos	14
Introduction.....	16
1. Le rejet	16
1.1. Le rejet suraigu	16
1.2. Le rejet aigu	16
1.3. Le rejet chronique	17
2. Les mécanismes de la réponse immune en transplantation.....	18
2.1. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.....	19
2.1.1. Les molécules CMH de classe I.....	19
2.1.2. Les molécules CMH de classe II.....	20
2.1.3. Les antigènes d'histocompatibilité mineurs	21
2.2. L'allorecognition.....	21
2.2.1. L'allorecognition directe	21
2.2.2. L'allorecognition indirecte	21
2.2.3. L'allorecognition semi-directe	22
2.3. Phase d'activation lymphocytaire T	22
2.3.1. Le signal antigénique	23
2.3.2. Le signal de costimulation	23
2.3.3. Le signal des cytokines	24
2.3.4. Différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺	25
2.3.5. Les chimiokines.....	27
2.4. Les mécanismes effecteurs du rejet d'allogreffe	28
2.4.1. Les lymphocytes T cytotoxiques	28
2.4.2. Mécanismes dépendants des alloanticorps.....	28
2.4.3. Macrophages et éosinophiles.....	29
3. Le signal de costimulation	30
3.1. La voie CD28	30
3.1.1. La voie CD28/B7/CTLA4.....	30
a) Présentation de CD28.....	30
b) CTLA4 et CTLA4-Ig	31
c) Les anticorps anti-CD28 chez l'homme	32
d) CD28 et les lymphocytes T régulateurs.....	33

3.1.2. La voie ICOS/ICOS-L.....	33
3.1.3. La voie PD1:PD-L1/PD-L2	34
3.1.4. B7-H3 et B7-H4.....	34
3.1.5. BTLA.....	35
3.2. La voie CD40/CD40 ligand.....	36
3.2.1. Présentation.....	36
3.2.2. Blocage de CD40/CD40L en transplantation.....	37
4. La tolérance.....	40
4.1. Tolérance Centrale.....	40
4.2. Tolérance périphérique	41
4.2.1. L'ignorance.....	41
4.2.2. La délétion	41
4.2.3. L'anergie	41
4.2.4. Les lymphocytes T régulateurs	42
Les lymphocytes T régulateurs CD4 ⁺	43
a) Les lymphocytes T CD4 ⁺ CD25 ⁺	43
b) Les lymphocytes T CD4 ⁺ CD25 ⁻	46
c) Les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1).....	46
d) Les lymphocytes Th3.....	47
Les lymphocytes T CD8 ⁺ régulateurs.....	47
e) Les lymphocytes T CD8 ⁺ CD28 ⁻	47
f) Les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ ⁺	48
g) Les lymphocytes T CD8 ⁺ CD122 ⁺	49
h) Les lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	50
i) Les lymphocytes T CD8 ⁺ CD11c ⁺	51
Les autres types de lymphocytes T régulateurs.....	51
j) Les lymphocytes T CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	51
k) Les lymphocytes NKT	53
l) Les lymphocytes T $\gamma\delta$	53
5. Le transfert de gène.....	55
5.1. Présentation.....	55
5.2. Voies d'administration	57
5.2.1. Injection locale	57
5.2.2. Injection intraveineuse	57
5.2.3. Autres voies d'administrations.....	57
5.3. Les vecteurs viraux	58
5.3.1. Les rétrovirus	58
a) Présentation	58
b) Le cycle de réplication du rétrovirus	59
c) Les vecteurs rétroviraux.....	61

5.3.2. <i>Les adénovirus</i>	64
a) Présentation	64
b) Le cycle réplicatif de l'adénovirus.....	64
c) Les vecteurs adénoviraux	66
5.3.3 <i>Les Adeno-Associated Virus (AAV)</i>	69
a) Présentation	69
b) Cycle réplicatif	71
c) Les vecteurs AAV	73
5.3.4) <i>Herpes Simplex Virus</i>	78
a) Présentation	78
b) Cycle réplicatif	79
c) Les vecteurs HSV	80
5.3.5) <i>Les limites du transfert de gène</i>	82
a) Intégration du vecteur	82
b) Les promoteurs inductibles	82
c) La réponse immunitaire dirigée contre le transgène	83
5.4. Les vecteurs non viraux	84
5.4.1. <i>L'ADN nu</i>	84
5.4.2. <i>Les vecteurs synthétiques</i>	84
a) Les polymères cationiques.....	85
b) Les dendrimères.....	85
c) Les lipides cationiques	85
6. Le transfert de gène en allo-transplantation.....	86
6.1. Atténuation des conséquences néfastes de l'ischémie-reperfusion du greffon	86
6.2. Le blocage de la costimulation	87
6.3. Inhibition des molécules d'adhésion.....	88
6.4. Les cytokines pro-inflammatoires et immunomodulatrices.....	88
6.5. Inhibition des chimiokines	89
6.6. Prévention du rejet chronique	89
6.7. Le chimérisme hématopoïétique	90
Caractérisation de lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} induits par un adénovirus CD40-Ig dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat	93
Matériels et méthodes.....	94
1. Modèle animal	94
1.1. Les souches de rat utilisées.....	94
1.2. La greffe cardiaque	94
1.3. Technique d'injection	94

3. Tri cellulaire	95
3.1. Isolation des lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} et CD4 ⁺ CD25 ⁻	95
3.2. Isolation des cellules dendritiques plasmacytoïdes	96
4. Puces à ADN et PCR quantitative	96
4.1. Principes des puces à ADN	96
4.2. Application à la caractérisation de lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} ..	98
4.3. Confirmation par PCR quantitative	99
4.4. Extraction et PCR sur les greffons	102
5. mise au point d'un test de suppression <i>in vitro</i>	102
Resultats	104
1. Introduction	104
2. La présentation de l'antigène	107
3. Cytotoxicité	109
4. Activation lymphocytaire et cycle cellulaire	110
5. La voie de l'interleukine-12 et IFN- γ	111
6. La Fibrinogen like 2 (Fgl2)	115
7. Chimiokines et récepteurs des chimiokines	118
8. adhésion cellulaire	120
9. Les cellules Natural Killer (NK).....	121
10. La costimulation	122
11. Molécules surexprimées dans d'autres types de lymphocytes T régulateurs.....	124
12. Autres gènes.....	126
Discussion	127
Mise en place d'un modèle de transfert de gene par vecteur viral chez le primate pour l'évaluation de l'induction de tolerance via le blocage des voies de costimulation CD28/B7 et CD40/CD40L et suivi immunologique	136
Matériels et Méthodes	137
1. Préparation des vecteurs et tests <i>in vitro</i>	137
2. Injection des animaux.....	139
3. Greffe de rein.....	140
4. Evaluation de la réponse immune	140
Résultats	142
1. Introduction	142
2. Préparation des plasmides AAV/hCD40-Ig et AAV/sc28AT et tests fonctionnels <i>in vitro</i>	144
3. Injection, taux circulant, effets secondaires et immunisation	147
3.1. CD40-Ig.....	147

3.2. sc28AT	148
3.3. Combinaison sc28AT & CD40-Ig	151
3.4. Déclassement pour greffe	153
4. Greffes	154
4.1. Greffe CD40-Ig.....	155
4.2. Greffe sc28AT	157
4.3. Greffe en combinaison CD40-Ig & sc28AT	157
Discussion	159
Bibliographie.....	169
Annexe 1: Production de cellules productrices d'insuline à partir de cellules souches embryonnaires murines	198
Annexe 2: Liste des 349 gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'animaux tolérants et d'animaux naïfs	210
Annexe 3 : Comparison of islet CTLA4-Ig production using recent viral vectors.....	220
Annexe 4 : Promises and Obstacles for the Blockade of CD40–CD40L Interactions in Allotransplantation	231

Abréviations

AAV :	Adeno-Associated Virus
AICD :	Apoptosis Induced Cell Death
AIRE :	Autoimmune Regulator
AMPc :	Adénosine Monophosphate cylique
β 2m :	Beta2-microglobuline
BTLA :	B and T Lymphocyte Attenuator
CD :	Cellule Dendritique
CD40L :	CD40 Ligand
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA :	Cellules Présentatrice d'Antigène
CTLA4 :	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DISC :	Death Inducing Signaling Complex
DN :	Lymphocyte T Double Négatif
EAE :	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
ECP :	Eosinophil Cationic Protein
ENV :	Envelope Protein
EPO :	Eosinophil Peroxidase
FasL :	Fas Ligand
FC :	Fold Change
Fgl2 :	Fibrinogen like 2
Foxp3 :	Forkhead Trancription Factor 3
GAG :	Group Antigens
GVHD :	Graft Versus Host Disease
HLA :	Antigène Leucocytaire Humain
Hm :	Antigène mineur d'histocompatibilité
HVEM :	Herpes Virus Entry Mediator
HVS :	Herpes Virus Simplex
ICOS :	Inducible Costimulatory
IDO :	Indoleamine 2,3 Dioxygenase
IFN- γ :	Interféron gamma
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
ITR :	Inverted Terminal repeat
KGF :	Keratinocyte Growth Factor
KIR :	Killer Cell Immunoglobulin

KO :	Knock Out
LTC :	Lymphocyte T cytotoxique
LTR :	Long terminal Repeat
MBP :	Major Basic Protein
MLR :	Mixed Lymphocytes Reaction
MMP :	Metallo Proteinase Matricielle
NK :	Natural Killer
NO :	Oxyde Nitrique
NOD :	Non Obese Diabetic
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cell
pDG :	AAV-Helper & Packaging vectors
pDC :	Plasmacytoïd Dendritic Cell
PDL :	Programmed Death Ligand
POL :	Reverse Transcriptase
PV :	Particules Virales
RC :	Rejet Chronique
ScFv :	Single chain Fv
SCID :	Severe Combined Immunodeficiency
TCR :	T cell Receptor
TGF- β :	Tumor Growth Factor beta
Th :	Lymphocyte T auxiliaire
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor Alpha
Treg :	T régulateur
TSD :	Transfusion du Sang du Donneur

Liste des figures

Figure 1. Mécanismes du rejet aigu.....	17
Figure 2. Morphologie d'une artère atteinte de rejet chronique.....	17
Figure 3. Structure du CMH chez l'Homme (HLA) et chez le rat (RT1).....	19
Figure 4. Les CMH de classe I et II.....	20
Figure 5. L'allorecognition lymphocytaire T	22
Figure 6. Le TCR-CD3 associé au CD4.....	23
Figure 7. Les molécules de costimulation	24
Figure 8. L'activation lymphocytaire T.....	25
Figure 9. La dichotomie Th1/Th2.....	26
Figure 10. Les chimiokines et leurs récepteurs.....	27
Figure 11. Coopération entre les lymphocytes T et B.....	28
Figure 12. Interaction CD28/CTLA4/B7	31
Figure 13. La voie de costimulation CD28	35
Figure 14. Rôle de CD40/CD40 ligand dans les interactions entre les lymphocytes T et les CPA.....	37
Figure 15. Les mécanismes de la tolérance périphérique	42
Figure 16. Les différents mécanismes suppresseurs des lymphocytes T régulateurs CD4 ⁺ CD25 ⁺	45
Figure 17. Mécanisme de suppression présumé des lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} chez les rats traités par un adénovirus rat CD40-Ig.....	51
Figure 18. Mécanismes suppresseurs des lymphocytes T $\gamma\delta$	54
Figure 19. Différences pharmacologiques entre la protéothérapie et le transfert de gène.....	56
Figure 20. Structure générale d'un rétrovirus (a) et de son génome (b).....	59
Figure 21. Cycle de réplication du rétrovirus.....	61
Figure 22. Production et pseudotypage des rétrovirus	63
Figure 23. Structure d'un adénovirus.....	64
Figure 24. Entrée d'un adénovirus dans sa cellule cible.....	65
Figure 25. Organisation du génome adénoviral	66
Figure 26. Production d'adénovirus gutless	67
Figure 27. Stratégies générales permettant de modifier le tropisme des vecteurs adénoviraux afin de cibler les récepteurs des cellules d'intérêt.....	69
Figure 28. Organisation du génome de l'AAV	70
Figure 29. Entrée de l'AAV2 dans la cellule cible.....	71
Figure 30. La phase de latence et la phase productive du cycle de vie de l'AAV	72
Figure 31. Cycle réplcatif de l'AAV2.....	73
Figure 32. a) Méthode classique de production d'AAVr utilisant un virus helper et b) Méthode utilisant un plasmide portant les gènes du virus helper	74
Figure 33. Devenir du génome de l'AAVr.....	77
Figure 34. Structure de l'HSV et de son génome	78
Figure 35. Cycle de réplication de HSV	79
Figure 36. Les systèmes d'expression inductibles	82

Figure 37. Représentation schématique de la protéine recombinante CD40-Ig	95
Figure 38. Nombre de publications concernant les puces à ADN de 1993 à 2007 (Medline)	97
Figure 39. Hybridation et révélation des puces Applied Biosystems.....	97
Figure 40. Représentation normalisée de la répartition des 14195 gènes ayant passé le 1er filtre pour chaque puce	99
Figure 41. Graphique en "volcan" des 14195 gènes	99
Figure 42. Test de suppression <i>in vitro</i>	103
Figure 43. Test de suppression en transwell.....	103
Figure 44. Représentation de l'expression des 349 gènes différemment exprimés sur les puces réalisées à partir de lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraits d'animaux traités au CD40-Ig et non traités.....	105
Figure 45. Diagramme présentant les gènes différemment exprimés entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraits d'animaux naïfs et tolérants en fonction de leur fonction biologique ...	106
Figure 46. Représentation obtenue à partir du logiciel Ingenuity des différentes molécules impliquées dans la présentation de l'antigène et surexprimés sur les CD8 ⁺ CD45RC ^{low} des animaux tolérants	107
Figure 47. Expression relative des différents gènes impliqués dans la présentation de l'antigène et analysés par PCR quantitative dans les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} des animaux tolérants et les animaux naïfs	108
Figure 48. Expression du CMH-II B analysée par cytométrie de flux sur les lymphocytes CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraits d'animaux naïfs et tolérants.....	108
Figure 49. Expression relative des gènes impliqués dans la mort cellulaire analysés par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs	109
Figure 50. Analyse par PCR quantitative de l'expression de fasl et cystatin7 dans les greffons d'animaux syngéniques et tolérants.....	110
Figure 51. Expression relative des gènes impliqués dans l'activation lymphocytaire et la prolifération cellulaire	110
Figure 52. Analyse par PCR quantitative de l'expression de cflar dans les greffons syngéniques et les greffons tolérants	111
Figure 53. Expression relative du gène de la sous-unité bêta du récepteur de l'interleukine 12 entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites des animaux tolérants et des animaux naïfs.....	111
Figure 54. Expression relative des gènes de l'IL12Rb1 et des hétérodimères de l'interleukine 12 p35 et p40 analysés par PCR quantitative à partir des greffons extraits des animaux tolérants et des animaux naïfs.	112
Figure 55. Expression relative de du gène de la sous-unité p19 de l'interleukine 23 analysée par PCR quantitative à partir des greffons extraits des animaux tolérants et des animaux naïfs	112
Figure 56. Expression relative du gène de l'interféron gamma analysée par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs et l'expression de l'IFN-γ au niveau du greffon entre des animaux recevant des cœurs syngéniques et des animaux tolérants.....	113
Figure 57. Expression relative du gène IDO-1 analysée par PCR quantitative au niveau du greffon entre les animaux receveurs de greffes syngéniques et des animaux tolérants.....	113
Figure 58. La voie de l'IL-12 et IDO	114
Figure 59. Expression relative de l'expression du TNF-α analysée par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs et l'expression du TNF-α au niveau du greffon entre les animaux receveurs de greffes syngéniques et les animaux tolérants.....	114

Figure 60. Expression relative des gènes liés à l'interféron gamma. Analyse par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs.....	115
Figure 61. Expression relative de Muc4. Analyse par PCR quantitative entre les greffons des animaux receveurs de greffes syngéniques et les animaux tolérants	115
Figure 62. Expression relative de l'expression de fgl2 analysée par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs et au niveau du greffon entre des animaux receveurs de greffes syngéniques et les animaux tolérants	116
Figure 63. Prolifération des lymphocytes T naïfs CD4 ⁺ CD25 ⁻ du receveur en présence des pDC du donneur (1W) plus les lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraits d'un animal naïf en présence ou non d'un anticorps bloquant anti-Fgl2.....	117
Figure 64. Test de prolifération en transwell et action de l'anticorps anti-Fgl2	117
Figure 65. Expression relative des gènes des chimiokines et des récepteurs aux chimiokines analysés par PCR quantitative dans les CD8 ⁺ CD45RC ^{low} des animaux tolérants et les animaux naïfs ..	118
Figure 66. Expression relative des gènes des récepteurs des chimiokines analysés par PCR quantitative entre les greffons des animaux recevant des greffes syngéniques et des animaux tolérants.....	118
Figure 67. Expression relative des gènes des chimiokines correspondant aux récepteurs surexprimés par CD8 ⁺ CD45RC ^{low} des animaux tolérants, dans les greffons d'animaux recevant des greffes syngéniques et d'animaux tolérants.....	119
Figure 68. Expression relative des gènes liés à l'adhésion cellulaire analysés par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} d'animaux tolérants et naïfs	120
Figure 69. Expression relative de l'expression de nedd9 analysée par PCR quantitative entre les greffons d'animaux recevant des greffes syngéniques et des animaux tolérants.....	120
Figure 70. Expression relative des gènes liés aux cellules NK. Analyse par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} d'animaux tolérants et naïfs	121
Figure 71. Expression relative de nkg2a, ocil et nkg7 analysée par PCR quantitative entre les greffons extraits d'animaux recevant des greffes syngéniques et d'animaux tolérants	121
Figure 72. Expression relative des gènes liés à la costimulation analysée par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants	122
Figure 73. Prolifération des lymphocytes T naïfs CD4 ⁺ CD25 ⁻ du receveur en présence des pDC du donneur (1W) plus les lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraits d'un animal naïf en présence ou non d'un anticorps anti-ICAM-1	122
Figure 74. Test de prolifération en transwell et effet de CD137L-Fc.....	123
Figure 75. tableau récapitulatif des gènes surexprimés dans les lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} tolérogènes et retrouvés dans d'autres études de puces à ADN impliquant des lymphocytes Treg	124
Figure 76. Expression relative des gènes mis en évidence dans d'autres types de lymphocytes T régulateurs. Analyse par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs.....	125
Figure 77. Expression relative des gènes Nrd1 et Myadm1. Analyse par PCR quantitative entre les cellules CD8 ⁺ CD45RC ^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs.....	126
Figure 78. Construction scFv28.3-Haat	137
Figure 79. Représentation des protéines recombinantes CD40-Ig et sc28AT	137
Figure 80. Structure du plasmide AAV-CD40-Ig.....	144
Figure 81. Marquage des lymphocytes du sang circulant activés de l'Homme et du macaque en fonction de la concentration en CD40-Ig.....	144
Figure 82. Prolifération des lymphocytes B extraits de l'homme et du macaque sur un tapis de cellules CD40L en fonction de la concentration en CD40-Ig	145

Figure 83. Structure du plasmide AAV-sc28AT	145
Figure 84. Activité de la molécule issue du plasmide AAV sc28AT après transfection de cellules in vitro.	146
Figure 85. Activité de la molécule issue de l'infection de cellules en culture par l'AAV sc28AT	146
Figure 86. Concentration en hCD40-Ig circulant en fonction du temps chez les animaux injectés avec l'AAV-CD40-Ig détecté par ELISA	147
Figure 87. Quantité d'anticorps (unité arbitraire) dirigée contre hCD40-Ig en fonction du temps mesurée par ELISA.....	148
Figure 88. Concentration en sc28AT chez l'animal injecté avec l'AAV/sc28AT et quantification des masca dans la circulation	149
Figure 89. Activité représentative de la molécule sc28AT in vivo, après injection de l'AAV et activité de la molécule sc28AT en présence d'anti-sc28AT.	149
Figure 90. Pourcentage de saturation des sites CD28 des lymphocytes T circulants en fonction de la concentration en sc28AT circulants chez l'animal injecté avec l'AAVsc28AT	150
Figure 91. Fixation de sc28AT sur les sites CD28 des lymphocytes T (CD3 ⁺) circulants analysés par cytométrie en flux.....	150
Figure 92. Fixation de sc28AT sur les sites CD28 des lymphocytes T (CD3 ⁺) circulants analysés par cytométrie en flux chez un animal non injecté par l'AAVsc28AT.....	150
Figure 93. Concentration en hCD40-Ig circulant en fonction du temps chez les animaux injectés avec l'AAV-CD40-Ig et chez l'animal injecté en combinaison CD40-Ig/sc28AT (OWC7).....	151
Figure 94. Concentration en sc28AT circulant en fonction du temps chez l'animal injecté avec l'AAV-sc28AT (OPU6) et chez l'animal injecté en combinaison CD40-Ig/sc28AT (OWC7).....	151
Figure 95. Concentration en sc28AT circulant en fonction du temps chez l'animal injecté avec l'AAVsc28AT et présence des anticorps dirigés contre le sc28AT d'istotype IgG et IgM (masca)	152
Figure 96. Pourcentage de saturation des sites CD28 des lymphocytes T circulants en fonction de la concentration en sc28AT circulants chez l'animal injecté avec les AAVsc28AT et AAVCD40-Ig.....	152
Figure 97. Fixation de sc28AT sur les sites CD28 des lymphocytes T (CD3 ⁺) circulants analysée par cytométrie en flux chez l'animal injecté en combinaison avec les AAVsc28AT et AAVCD40-Ig	153
Figure 98. Concentration en sc28AT et en CD40-Ig circulants chez l'animal injecté en combinaison avec les AAVsc28AT et AAVCD40-Ig et présence des masca IgG	153
Figure 99. Courbes des moyennes de concentration en particules virales/ml déterminée par PCR quantitative en fonction du temps pour les animaux injectés avec l'AAVCD40-Ig et l'AAVsc28AT	154
Figure 100. Mode de sélection des animaux receveur/donneur d'organes et proportion des animaux sélectionnables	154
Figure 101. Suivre de la créatinémie en fonction du temps après la greffe des animaux injectés avec l'AAV CD40-Ig et des animaux contrôles	155
Figure 102. Fixation de CD40-Ig sur les lymphocytes T périphériques d'un animal injecté avec l'AAV/CD40-Ig.....	156
Figure 103. Fixation de CD40-Ig sur les lymphocytes T périphériques d'un animal contrôle, non greffé et non injecté avec l'AAVCD40-Ig.....	156
Figure 104. Taux circulants de sc28AT et créatinémie de l'animal injecté en avec l'AAV sc28AT	157
Figure 105. Taux circulants de CD40-Ig et sc28AT et créatinémie de l'animal injecté en combinaison avec l'AAV CD40-Ig et l'AAV sc28AT	158
Figure 106. Facteurs de transcriptions intervenant dans le développement du pancréas	199
Figure 107. Le protocole Lumelsky.....	201

Figure 108. Analyse de l'expression des ARNm codants pour les facteurs de transcription exprimés dans le développement précoce du pancréas (stade 2-3).....	201
Figure 109. Analyse de l'expression des ARNm codants pour les facteurs de transcription exprimés durant la différenciation pancréatique.....	202
Figure 110. Immunomarquage par fluorescence de corps embryoides durant le protocole Lumelsky	203
Figure 111. Mécanisme de l'action du Chlorure de Lithium	204
Figure 112. Effet du lithium sur l'expression de Brachyury	204
Figure 113. Les protocoles Kubo et Ku.....	205
Figure 114. Effet du « Serum Replacement » ajouté à un stade précoce dans le protocole Kubo.....	205
Figure 115. Effet du « Serum Replacement » ajouté à un stade tardif dans le protocole Ku	205
Figure 116. Protocole utilisé par l'équipe de Baetge pour produire des cellules productrices d'insuline à partir de cellules souches embryonnaires humaines	207

Liste des tableaux

Tableau 1. Types, phénotypes et mécanismes d'action des différents lymphocytes T régulateurs.....	43
Tableau 2. Le transfert de gène: approches et applications	55
Tableau 3. Types et caractéristiques des virus recombinants utilisés en transfert de gènes	58
Tableau 4. Adénovirus humains, sous-groupes et tropismes.	68
Tableau 5. Tropisme des différents sérotypes d'AAV	75
Tableau 6. Liste non exhaustive des différentes études utilisant le transfert de gène dans des modèles expérimentaux de transplantation (cf texte)	92
Tableau 7. Séquences des amorces utilisées pour la confirmation des résultats obtenus par les puces à ADN.....	101
Tableau 8. Séquences des amorces complémentaires utilisées dans notre étude	102
Tableau 9. Gènes impliqués dans la présentation de l'antigène et surexprimés par les lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} des animaux tolérants.....	107
Tableau 10. Les anticorps anti-CD40L (monothérapie) en allogreffe chez le primate	161
Tableau 11. Le blocage de la voie CD28/B7 en allogreffe chez le primate	164

Avant Propos

Permuter un organe défaillant par un autre valide, remplacer un membre amputé ou échanger des parties du corps entre différentes espèces; ces idées sont vieilles d'au moins trois millénaires et ont formées quantités de mythes. Nous devons les plus anciens écrits sur ce sujet aux Indiens et aux Chinois. Dans la mythologie indienne, la transplantation est utilisée avec des animaux comme donneurs afin de remplacer les têtes d'individus décapités par Shiva dans un excès de colère. Les Indiens n'ont pas le monopole de la « xéno-transplantation mythologique »: les Égyptiens ont le sphinx, mais les Grecs sont assurément les champions dans ce domaine (centaure, minotaure, chimère, hippocampe, sirène, gryphon, triton, sphinx...). On peut lire dans les anciens écrits chinois plusieurs exemples de transplantations; le cas du légendaire docteur Pien Ch'iao, qui a échangé le cœur de deux individus afin « d'équilibrer leurs énergies », est le plus intéressant car il fait le lien entre la médecine de la superstition et la médecine moderne rationnelle. Ce type de récits apparaît aussi dans le monde chrétien, comme lorsque Jésus guérit le serviteur d'un prêtre en remplaçant l'oreille qui lui avait été sectionnée.

Il faut attendre le XVe siècle pour voir les premiers comptes-rendus de transplantation : Gaspare Tagliacozzi développa une méthode de reconstruction de nez à partir de tissus autogènes (c'est à dire du patient) et affirmait déjà à l'époque que « le caractère singulier de l'individu empêche fondamentalement de prélever des tissus d'une personne pour les transplanter sur une autre ». De nombreuses autres tentatives historiques de transplantations d'organes ont été tentées et se sont soldées par des échecs du fait du rejet des greffons. La première transplantation complète de l'histoire fut une greffe de cornée réalisée par l'ophtalmologiste autrichien Eduard Zim en 1905: le patient a retrouvé la vue et l'a conservée jusqu'à la fin de ses jours. En 1912, Georg Schöne émettait l'hypothèse que le rejet des organes résultait d'un processus immunologique. La première transplantation rénale réussie a été réalisée par Joseph Murray à Boston en 1954 entre des jumeaux. Au-delà de l'acte chirurgical, la clé du problème du rejet de greffe se trouve donc dans la compréhension de ses mécanismes immunologiques.

Dans les années 60, Gowans, Brent et Medawar et d'autres ont montré que les lymphocytes étaient à la fois les cellules qui exprimaient les antigènes et celles qui répondaient à ces antigènes en développant un modèle *in vitro* d'allogreffe. Ainsi, l'introduction d'alloantigènes, sous forme d'organe ou de tissus, dans un organisme provoque une réaction immunologique chez le receveur. Ce rejet immunologique dépend de nombreux facteurs liés à l'hôte et à l'organe greffé : les différences entre les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur et du receveur, la nature plus ou moins immunogène de l'organe greffé et le statut immunologique du receveur. Le développement de modèles animaux d'allogreffe a permis le développement de traitements immunosuppresseurs (ciclosporine A, FK-506, Rapamycine...) qui ont très largement contribué à la réussite des allogreffes. Cependant ces traitements chroniques ont des effets secondaires lourds tels que l'augmentation de la susceptibilité aux cancers et aux infections virales et peuvent être néphrotoxiques, induire un diabète ou de l'athérosclérose... De plus, si ces traitements immunosuppresseurs sont efficaces sur le rejet aigu, ils n'empêchent pas la survenue du rejet chronique du greffon à long terme, responsable d'une altération fonctionnelle progressive. Aujourd'hui, l'un des objectifs majeurs de la recherche en transplantation consiste donc à diminuer les traitements immunosuppresseurs, voire à les arrêter, au profit de l'induction d'un état de tolérance au greffon susceptible d'être efficace à long terme et sans lésion chronique.

Dans cette thèse, je vais tout d'abord présenter les différents types de rejets auxquels sont confrontés les patients greffés. Je détaillerai les mécanismes impliqués dans la réaction immune contre le greffon et les voies de costimulation impliquées dans l'activation lymphocytaire en m'arrêtant sur les voies CD40/CD40L et CD28/B7 que nous avons privilégié. Les mécanismes de la tolérance et les différents types de lymphocytes régulateurs seront abordés. Le transfert de gène et ses applications dans des modèles expérimentaux de transplantation seront également discutés. Dans un deuxième temps, les projets de recherches auxquels j'ai contribué seront décrits et discutés. Le premier projet vise à caractériser par la technique des puces à ADN des lymphocytes T régulateurs CD8⁺ CD45RC^{low} tolérogènes obtenus par injection d'un adénovirus codant pour CD40-Ig, un inhibiteur de la voie CD40/CD40L, dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat. Le deuxième projet traité vise à évaluer l'induction de la tolérance en transplantation par le transfert d'un gène codant pour CD40-Ig chez le primate non humain en le combinant ou non avec sc28AT, une molécule inhibitrice de la voie CD28/B7. En annexe vous pourrez lire un chapitre concernant les travaux réalisés au cours de ma première année de thèse sur la génération de cellules productrices d'insuline à partir de cellules souches embryonnaires murines.

Introduction

1. Le rejet

La transplantation d'organes, de tissus ou de cellules entre organismes de la même espèce mais possédant des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) différents (allogreffe) induit naturellement une réponse du système immunitaire. Cette réponse immunitaire est inexistante si le donneur et le receveur possèdent le même CMH, c'est-à-dire jumeaux homozygotes ou animaux de la même lignée consanguine (greffe syngénique). La réponse immunitaire est amplifiée si la greffe est réalisée entre organismes d'espèces différentes (xénogreffe). Les mécanismes du rejet de greffe impliquent un nombre très important de cellules et de mécanismes moléculaires. On peut distinguer trois types de rejet : le rejet suraigu, aigu et chronique.

1.1. Le rejet suraigu

Le rejet suraigu intervient généralement dans les 48 heures après la transplantation. Cette réaction est due à la présence, chez le receveur, d'anticorps préformés dirigés contre les antigènes ABO du groupe sanguin du donneur (Porter 1965) ou contre les molécules du CMH du donneur (Williams, Hume et al. 1968). Lors d'une greffe d'organe, cette réaction est dirigée contre les cellules endothéliales du greffon et induit une thrombose intravasculaire, l'ischémie et finalement la nécrose. La présence d'anticorps anti-CMH peut s'expliquer par des transfusions sanguines, une grossesse ou une précédente allogreffe. Pour empêcher le rejet suraigu, il est nécessaire de déterminer avant la transplantation les groupes sanguins, d'effectuer un typage CMH et de rechercher la présence d'anticorps dirigés contre le CMH (test de cross-match).

1.2. Le rejet aigu

Le rejet aigu (Figure 1) est la principale cause de la perte du greffon en allogreffe et prend place dans les premiers jours ou semaines suivant la transplantation. Le rejet aigu est dépendant de l'activation des lymphocytes T du receveur qui est amorcée par la reconnaissance du complexe CMH/peptide allogénique du donneur. Les lymphocytes T vont synthétiser des cytokines proinflammatoires, interféron- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor (TNF), (Wu, Lovett et al. 1992) et permettre le recrutement des macrophages au niveau du greffon qui vont à leur tour sécréter du TNF- α , de l'oxyde nitrique (NO) ou des radicaux libres et activer les cellules endothéliales et les cellules « natural killer » (NK). Les lymphocytes T cytotoxiques vont détruire le greffon via l'activation de la voie Fas/FasL ou par l'exocytose de perforines et de granzymes (Kreisel, Krupnick et al. 2002). Les lymphocytes B jouent également un rôle dans le rejet aigu via la synthèse d'anticorps qui vont pouvoir se fixer sur les cellules endothéliales, provoquer l'activation du complément et contribuer à l'inflammation (Saadi, Holzkecht et al. 1995). Le processus inflammatoire peut évoluer pour devenir un infiltrat composé de lymphocytes, macrophages et cellules phagocytaires.

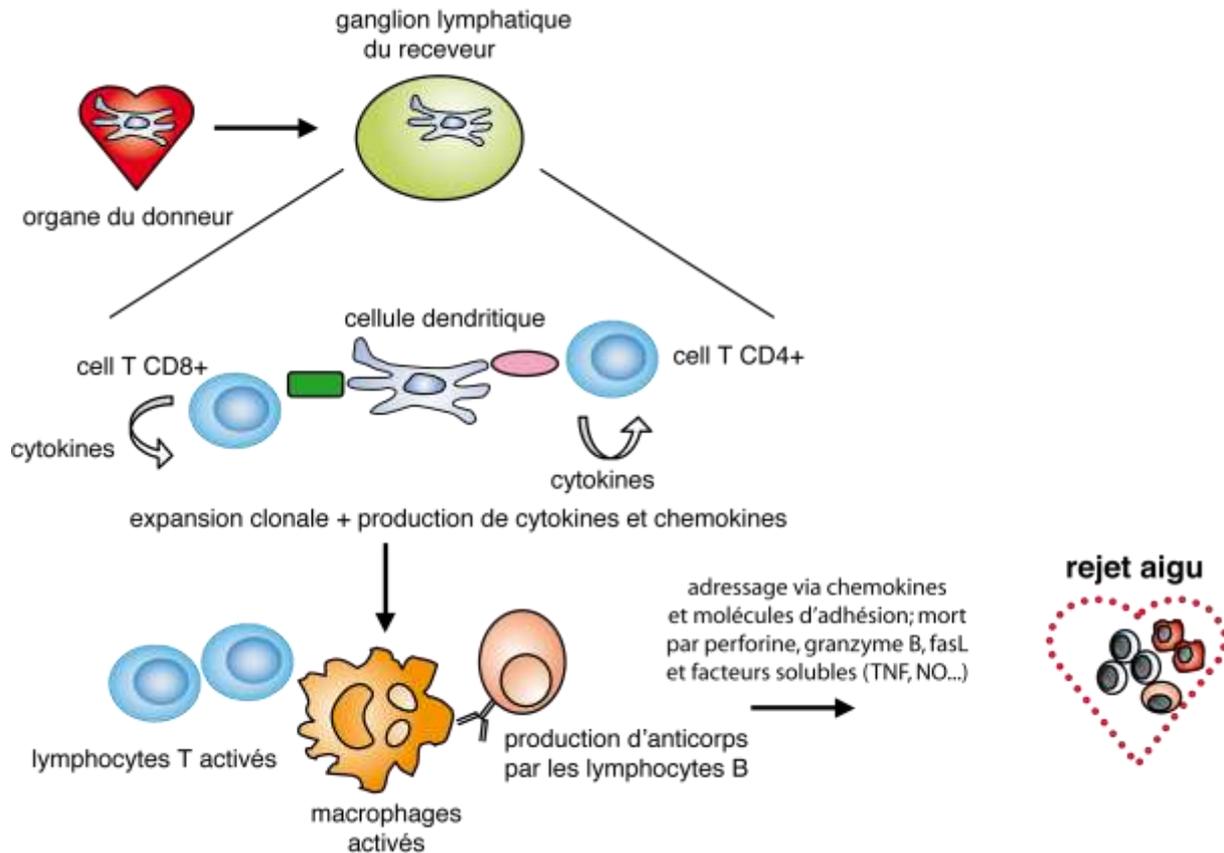


Figure 1. Mécanismes du rejet aigu
(Lechler, Sykes et al. 2005)

1.3. Le rejet chronique

Le rejet chronique (RC) peut survenir plusieurs mois voir plusieurs années après la greffe. La classification de Banff décrit le développement d'une glomérulopathie chronique d'allogreffe, de vasculopathie associée à des lésions vasculaires touchant principalement les artères et conduisant à la prolifération de l'intima et de la media, d'atrophie tubulaire et de fibrose des tissus.

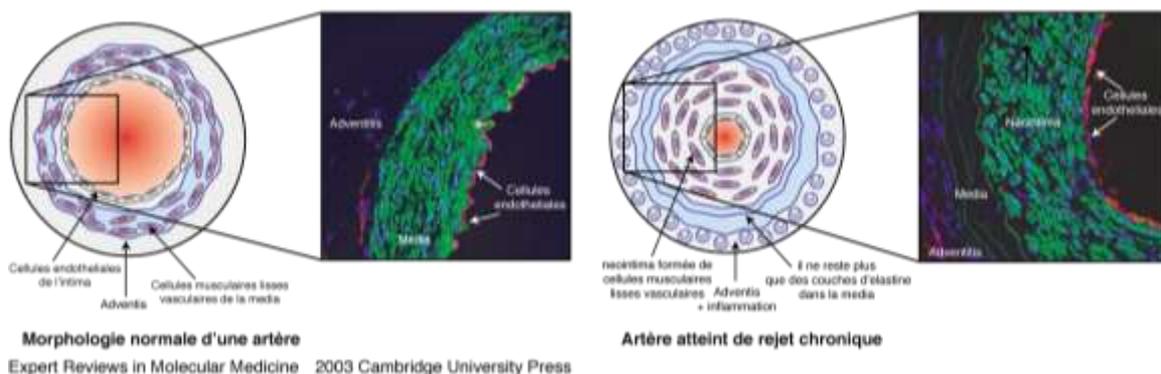


Figure 2. Morphologie d'une artère atteinte de rejet chronique

Les lésions de vasculopathie d'allogreffe peuvent en partie être expliquées par des mécanismes non immuns. L'utilisation de traitements immunosuppresseurs contre le rejet aigu participe aux lésions tissulaires d'ischémie en induisant une hypertension artérielle. Les immunosuppresseurs sensibilisent également les receveurs aux attaques virales et la corrélation entre le développement des lésions de rejet chronique et l'infection du receveur par le cytomégalovirus a été démontrée (Grattan, Moreno-Cabral et al. 1989). Les phénomènes d'ischémie-reperfusion et d'hypoxie induisant une réponse pro-inflammatoire (Walter G Land 2005) et les éventuels dépôts athérosclérotiques préexistants (Alonso, Starek et al. 1977) participent également au rejet chronique. L'administration de la ciclosporine A (Islam et coll. 2001), un immuno-supresseur anti-calcineurine, cause une néphrotoxicité médiée par la production de TGF- β qui va favoriser la fibrose (Cohen and Nast 1998).

Les mécanismes immunologiques prenant place lors du rejet chronique sont encore mal connus. Il a été proposé que l'activation indirecte des lymphocytes T CD4⁺ Th2⁺ joue un rôle prédominant dans le rejet chronique en produisant des cytokines favorisant la production d'anticorps et la fibrose tissulaire (Shirwan 1999). D'un autre côté la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ est suffisante pour induire le rejet chronique (Allan, Choo et al. 1997). Plusieurs études ont montré que la présence d'anticorps anti-CMH dirigés contre le donneur (Worthington, Martin et al. 2003) ou non dirigés contre le donneur (Hourmant, Cesbron-Gautier et al. 2005) (Terasaki and Ozawa 2005) est associée avec une perte tardive du greffon. Les anticorps anti-MICA (un antigène polymorphe associé au CMH) sont également associés au rejet chronique, même en l'absence d'anticorps anti-CMH (Mizutani, Shibata et al. 2006).

2. Les mécanismes de la réponse immune en transplantation

Le rejet de greffe résulte principalement de la réponse immune cellulaire dirigée contre les antigènes allogéniques exprimés sur les cellules du greffon. Pour être reconnu par les principaux effecteurs de cette réponse immune, les lymphocytes T, il est nécessaire que ces alloantigènes soient présentés sous forme de peptides au sein d'une molécule du CMH. Après reconnaissance du complexe CMH/peptide, les lymphocytes T sont capables de recevoir des signaux complémentaires des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et vont déclencher une réponse immune effectrice.

2.1. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

Le complexe majeur d'histocompatibilité humain est appelé antigène leucocytaire humain (HLA), complexe RT1 chez le rat et H2 chez la souris. Il a été initialement caractérisé en utilisant des anticorps dirigés contre les leucocytes. Le gène HLA est divisé en trois régions. La région de classe I contient les gènes HLA-A, -B, -C chez l'Homme et RT1-C/E, -M, -A chez le rat et code la chaîne lourde des molécules de classe I. La région de classe II est composée de plusieurs sous régions, chacune contenant des gènes A et B encodant respectivement les chaînes α et β (Marsh, Albert et al. 2005). Il existe trois sous-régions : HLA-DP, -DQ, -DR chez l'homme et RT1-H, -B, -D chez le rat. La région de classe III n'encode pas de molécule HLA mais contient des gènes intervenant dans les réponses immunes tels que le système du complément (C2, C4, le facteur B), le TNF (facteur de nécrose des tumeurs), et quelques autres gènes (Beck and Trowsdale 2000).

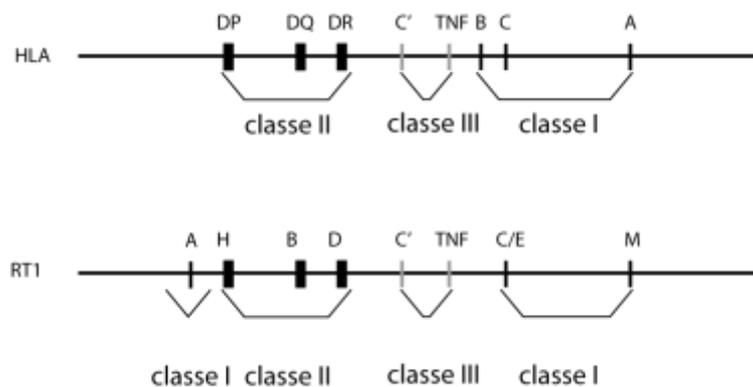


Figure 3. Structure du CMH chez l'Homme (HLA) et chez le rat (RT1)

2.1.1. Les molécules CMH de classe I

Les molécules du CMH de classe I sont exprimées à la surface de quasiment toutes les cellules nucléées. Elles sont formées de chaînes lourdes glycosylées liées de manière non-covalente à la β 2-microglobuline extracellulaire (β 2m) (Bjorkman and Parham 1990). La chaîne lourde de classe I possède trois domaines extracellulaires (α 1, α 2 et α 3), une région transmembranaire, et un domaine intracytoplasmique (Figure 4). Entre les domaines α 1 et α 2 se forme un sillon constituant le site de fixation du peptide antigénique dont la longueur est comprise entre 8 et 10 acides aminés (Klein and Sato 2000) (Engelhard 1994). Le domaine α 3 et la β 2m constituent la partie constante du CMH de classe I (Bjorkman, Saper et al. 1987).

Les lymphocytes T CD8⁺, restreints au CMH de classe I, reconnaissent les antigènes endogènes synthétisés à l'intérieur de la cellule cible (protéines cellulaires, transformées ou induites par un virus) (Pamer and Cresswell 1998). Le système de reconnaissance des cellules NK n'est pas restreint par le CMH mais ces cellules peuvent reconnaître et détruire les cellules sous-exprimant les molécules du CMH de classe I comme les cellules tumorales et les cellules infectées par un virus. D'autres cellules peuvent être la cible des cellules NK en fournissant des signaux activateurs aux récepteurs des NK : la majorité de ces ligands sont des molécules du CMH de classe I (Parham 2003).

2.1.2. Les molécules CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II ne sont exprimées que par les lymphocytes B, les cellules présentatrices d'antigène (monocytes, macrophages et cellules dendritiques), et les lymphocytes T activés. Chez l'Homme, le CMH de classe II peut être exprimé par d'autres cellules activées comme les cellules endothéliales. Elles sont formées d'un hétérodimère de chaînes de polypeptides glycosylés α et β associées de manière non-covalente. Les chaînes α et β sont transmembranaires et ont la même structure générale. La portion extracellulaire composée de deux domaines ($\alpha 1$ et $\alpha 2$, ou $\beta 1$ et $\beta 2$) est ancrée dans la membrane par une courte région transmembranaire et possède un domaine cytoplasmique. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment un sillon constituant le site de fixation de l'antigène dont la longueur peut être supérieure à 12 acides aminés (Brown, Jardetzky et al. 1993).

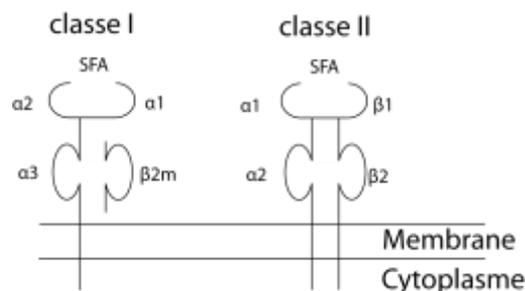


Figure 4. Les CMH de classe I et II

La molécule de classe I est constituée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, la $\beta 2$ -microglobuline.
La molécule de classe II est un hétérodimère constitué de chaînes α et β . SFA : site de fixation antigénique.

2.1.3. Les antigènes d'histocompatibilité mineurs

Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (Hm) résultent de polymorphismes dans des protéines non encodées par le CMH. La combinaison de multiples histo-incompatibilités mineures peut induire collectivement une réponse semblable à une incompatibilité CMH, conduisant rapidement à un rejet de greffe. L'importance de ces antigènes d'histocompatibilité mineurs dans la réaction du greffon contre l'hôte et le rejet de greffe chez l'Homme a été montrée en greffe de moelle osseuse chez des individus apparentés ayant un HLA identique (Goulmy, Gratama et al. 1983).

2.2. L'allorecognition

Les deux mécanismes les plus importants de présentation des allopeptides (allorecognition) sont la voie directe et la voie indirecte. Ces deux voies peuvent agir de manière simultanée ou non. Il existe également une troisième voie d'allorecognition: la voie semi-directe.

2.2.1. L'allorecognition directe

L'allorecognition directe correspond à la reconnaissance, par des lymphocytes T du receveur, de molécules intactes du CMH de classe I ou de classe II portées par des cellules du donneur (Figure 5) (Daniel, Horvath et al. 1998). Lechler démontra en 1982 que l'acceptation d'une allogreffe rénale chez le rat pouvait être obtenue en greffant temporairement un rein à un receveur immuno-supprimé, conduisant à la perte des CPA avant la transplantation dans un receveur immuno-compétent. L'immunogénicité du greffon a pu être rétablie en injectant des CPA de la souche du donneur (Lechler and Batchelor 1982). La réactivité croisée des lymphocytes T restreints au CMH +/- peptide du soi avec les complexes CMH/peptide allogéniques est un phénomène très fréquent et explique le nombre important de lymphocytes T ayant une allospécificité directe (Lindahl and Wilson 1977).

2.2.2. L'allorecognition indirecte

La voie indirecte est caractérisée par la présentation des alloantigènes en peptides présentés par les complexes CMH de classe II des CPA du receveur (Figure 5). Des études effectuées sur des souris déficientes pour le CMH de classe I (Auchincloss, Lee et al. 1993) ont montré que ces souris peuvent rejeter des greffes de peau issues de souris déficientes pour le CMH de classe II. Ainsi les souris receveuses ne pouvaient développer les lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître directement les molécules du CMH de classe I du donneur. Dans ces conditions, les lymphocytes T CD4⁺ des animaux receveurs sont seuls capables de reconnaître le CMH du donneur, après présentation indirecte. Cette allorecognition indirecte a été corrélée avec l'apparition du rejet chronique (Benichou, Valujskikh et al. 1999) mais également avec le développement du rejet aigu d'allogreffes chez le rongeur (Fangmann, Dalchau et al. 1992) et l'Homme (Liu, Colovai et al. 1996). Ce mécanisme peut amplifier le rejet du fait de la génération de multiples épitopes à partir des alloantigènes; néanmoins la mise en place de cette voie prend plus de temps que la voie directe. La réponse anti-donneur directe est ainsi plus importante dans la phase précoce suivant la

transplantation et persiste tant que le greffon contient des CPA, alors que la réponse anti-donneur indirecte intervient surtout plus tardivement et persiste avec le greffon.

2.2.3. L'alloreconnaissance semi-directe

Le CMH intact, tout comme d'autres molécules de surface, peut être transféré entre les cellules du système immunitaire (Tsang, Chai et al. 2003). Ainsi, les CPA du receveur peuvent présenter simultanément les molécules intactes du CMH de classe I du donneur aux lymphocytes T CD8⁺ par la voie directe mais aussi des peptides allogéniques aux lymphocytes T CD4⁺ par la voie indirecte (Figure 5)(Huang, Yang et al. 1999). Ce phénomène de transfert de molécules du CMH par acquisition de fragments de membrane cellulaire a été observé entre les cellules endothéliales et les cellules dendritiques (CD) (Jiang, Herrera et al. 2004), mais aussi entre les CD par l'intermédiaire des exosomes (They, Duban et al. 2002). En clinique, l'importance de la voie semi-directe d'alloreconnaissance est encore inconnue.

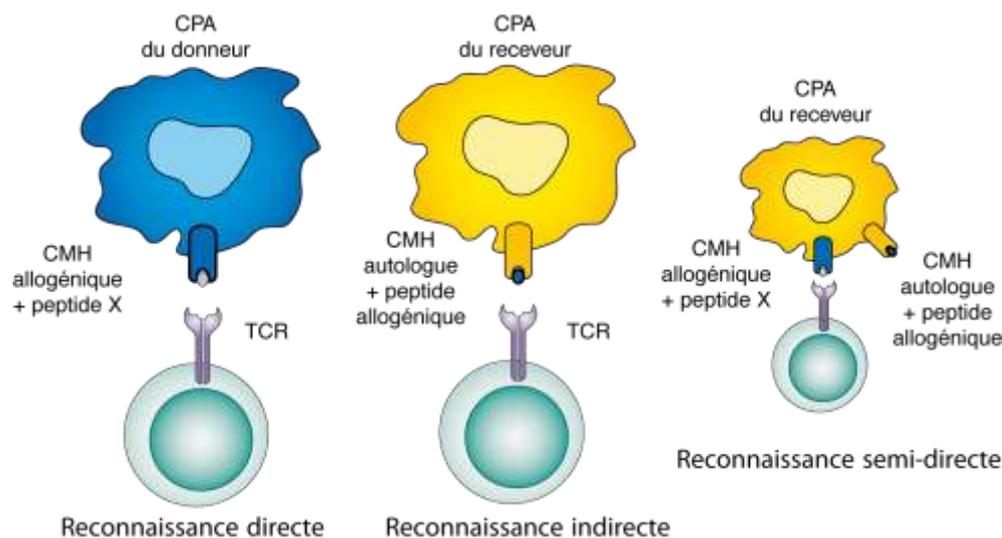


Figure 5. L'alloreconnaissance lymphocytaire T

2.3. Phase d'activation lymphocytaire T

Pour être activés, les lymphocytes T doivent recevoir 3 types de signaux. Le premier signal résulte de la reconnaissance par le récepteur du lymphocyte T (TCR) du complexe CMH/peptide porté par la cellule présentatrice d'antigène. Le second signal met en jeu des interactions moléculaires entre les molécules de costimulation du CPA et leurs ligands situés sur les lymphocytes T. Finalement, le troisième signal est fourni par les cytokines paracrines et/ou autocrines.

2.3.1. Le signal antigénique

Les lymphocytes T expriment à leur surface un complexe multimérique, le TCR-CD3 (Figure 6). Le TCR est composé de deux chaînes clonotypiques α , β résultant du réarrangement des segments V, D, J. Le TCR est associé de manière non covalente au CD3, composé de cinq chaînes invariantes ϵ , δ , γ , η et ζ . Le complexe TCR-CD3 est associé au co-récepteur CD4 ou CD8 nécessaire à la détermination de la classe de CMH reconnu par le lymphocyte (le CMH de classe I pour le CD8 et de classe II pour le CD4). La reconnaissance du complexe CMH/peptide va aboutir à la transduction d'un signal d'activation intracellulaire via les motifs ITAM du CD3.

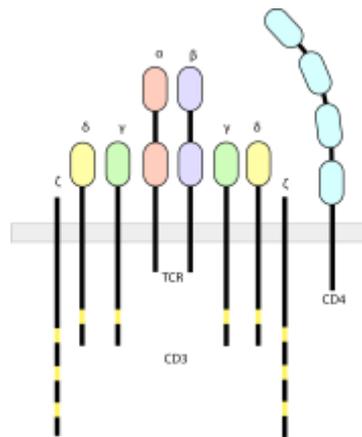


Figure 6. Le TCR-CD3 associé au CD4

En jaune, les motifs ITAM du CD3

2.3.2. Le signal de costimulation

Le deuxième signal, dit signal de costimulation, est constitué par des interactions entre les molécules exprimées de part et d'autre de l'interface lymphocyte/CPA (Figure 7). Les lymphocytes T expriment des molécules appartenant à la famille des CD28 ou à la superfamille du TNF et des récepteurs du TNF. Je traiterai plus en détail des molécules de la superfamille des CD28 et de l'interaction CD40/CD40L (famille du TNFR/TNF) dans le chapitre 3. Certaines interactions ont une fonction inhibitrice de l'activation T. La complexité de ces interactions permet de moduler le signal de costimulation, et le signal résultant peut être activateur ou inhibiteur. En présence d'un signal de costimulation positif, le lymphocyte T est activé et répond en premier lieu par la synthèse d'interleukine-2 (IL-2). En absence de ce second signal, le lymphocyte T devient anergique, c'est-à-dire incapable de proliférer ou de produire des cytokines.

Deux autres catégories de molécules sont impliquées dans l'activation. Les intégrines, situées à la surface des lymphocytes T, permettent une adhésion optimale avec la CPA (ex : LFA-1 avec ICAM-1 ou -2). La stabilisation de l'interaction lymphocyte T/CPA est réalisée par les molécules accessoires, notamment CD2 sur le lymphocyte T et LFA-3 sur la CPA.

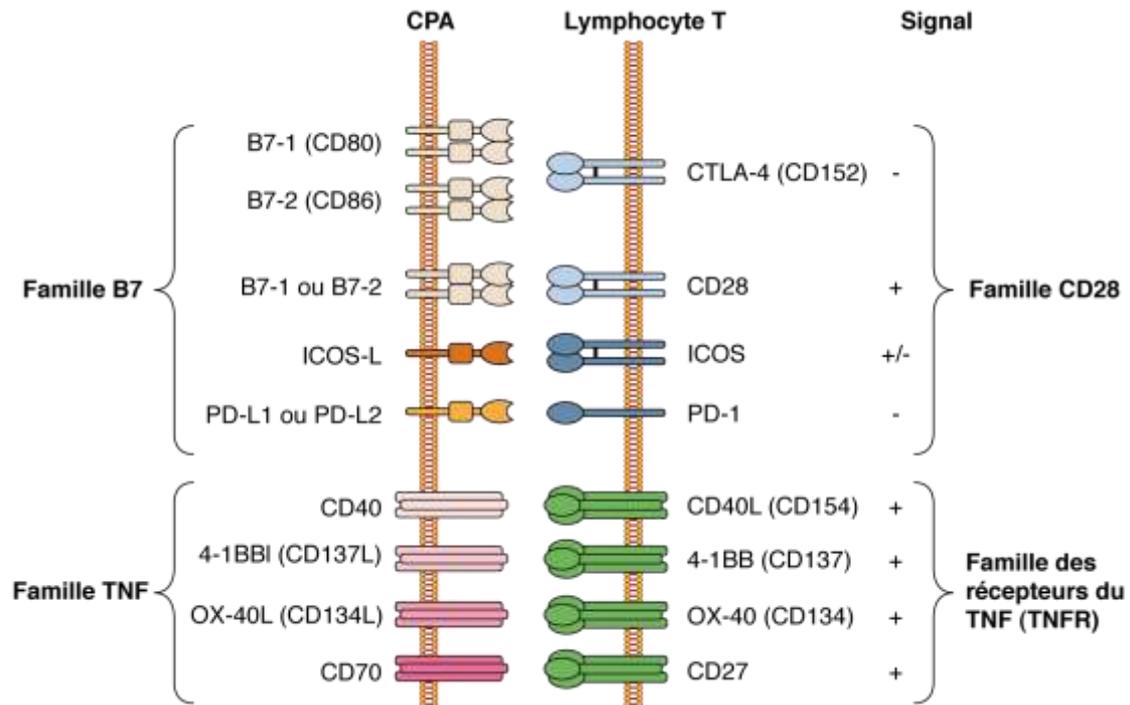


Figure 7. Les molécules de costimulation

D'après (Candon 2007)

2.3.3. Le signal des cytokines

Les signaux 1 et 2 activent trois voies de signalisation : la voie des calcineurines, la voie des MAP kinases et la voie de la protéine kinase C/NF- κ B (Figure 8). Ces signaux aboutissent à l'induction de l'expression de CD40L, de CD25 (la chaîne α du récepteur à l'IL-2) et à la sécrétion d'IL-2. La liaison de l'IL-2 à son récepteur de haute affinité fournit le signal 3 de prolifération, par l'intermédiaire des voies de la PI3K et de mTOR. L'IL-15 qui partage la chaîne β du récepteur à l'IL-2 permet aussi la progression des lymphocytes T dans le cycle cellulaire. Certaines drogues immunosuppressives utilisées en transplantation agissent sur l'activation des lymphocytes T: les glucocorticoïdes vont inhiber la voie PKC/NF- κ B, la ciclosporine et le FK506 (Tacrolimus) sont des inhibiteurs de la calcineurine, la Rapamycine inhibe mTOR.

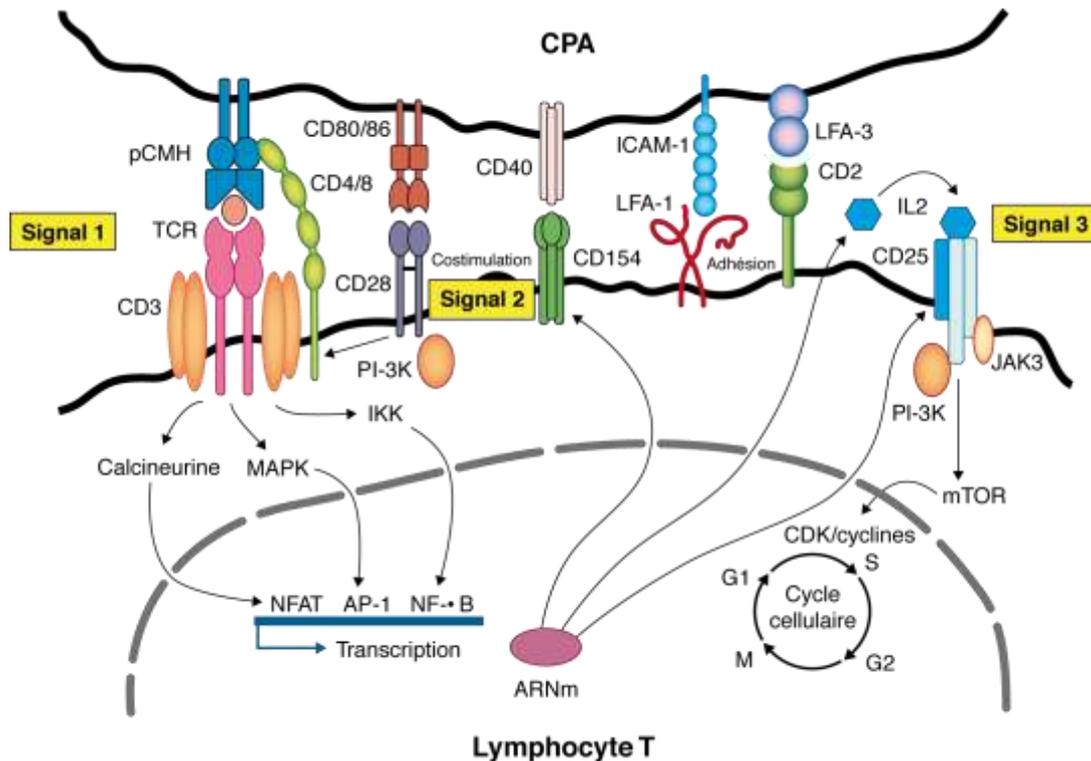


Figure 8. L'activation lymphocytaire T

D'après (Candon 2007)

2.3.4. Différenciation des lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle essentiel dans le rejet d'allogreffe et peuvent se différencier en différentes sous-populations caractérisées par les cytokines qu'elles sécrètent. Les lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Th1) produisent de l'IFN- γ et de l'IL-2. Les lymphocytes T CD4⁺ de type Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et de l'IL-13 (Figure 9). Contrairement aux Th1, les Th2 ne sécrètent pas de FasL et n'interviennent donc pas dans la cytotoxicité directe.

Il existe un antagonisme mutuel entre ces deux sous-populations. La présence d'IL-4 lors du développement *in vitro* d'effecteurs Th favorise le développement d'effecteurs sécrétant l'IL-4 (Th2) et inhibe le développement d'effecteurs sécrétant l'IL-2 (Th1) (Swain, Weinberg et al. 1990). Par ailleurs, l'IL-12 va agir directement sur les précurseurs CD4⁺ en stimulant la synthèse d'IFN- γ et en inhibant la synthèse d'IL-4 (Constant and Bottomly 1997). L'IFN- γ peut induire la surexpression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 sur les lymphocytes T naïfs et inhiber leur production d'IL-4 (Zhang, Apilado et al. 2001).

La sous-population Th1 est responsable de nombreuses fonctions à médiation cellulaire comme l'hypersensibilité retardée: les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les lymphocytes Th1 vont activer les monocytes et les macrophages recrutés localement, aboutissant à un processus inflammatoire associé à des lésions tissulaires au niveau de l'organe greffé. Les Th1 sont également responsables de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques dont je parlerai dans le chapitre suivant. Elles interviennent également dans la production d'anticorps IgG promoteurs de

l'opsonisation (fixation d'anticorps à leur antigène cible sur une membrane cellulaire). La sous-population Th2 contrôle les lymphocytes B en induisant une production importante d'IgM, d'IgE et d'isotypes IgG qui n'activent pas le complément. Elle stimule également l'activation et la différenciation des éosinophiles.

Le rôle des lymphocytes Th1 et Th2 dans le rejet de greffe est assez controversé. Initialement, les lymphocytes Th1 étaient décrits comme associés au rejet d'allogreffe, et les lymphocytes Th2 semblaient être responsable de la tolérance au greffon (Dallman, Shiho et al. 1991) (Scully, Cobbold et al. 1997). Cependant, d'autres études plus récentes semblent indiquer un rôle essentiel de certaines cytokines de type Th1 comme l'IFN- γ dans la mise en place des mécanismes de tolérance (Zhang 2007). A l'inverse, les lymphocytes Th2 peuvent contribuer au rejet de l'allogreffe (Le Moine, Surquin et al. 1999) (VanBuskirk, Wakely et al. 1996)

Récemment, de nouvelles sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires ont été décrites. Les lymphocytes T CD4⁺ Th17 sécrètent de l'IL-17, une molécule proinflammatoire (Afzali, Lombardi et al. 2007), et des études ont montré une augmentation des transcrits IL-17 (dans le greffon) et de la protéine (dans les cellules mononuclées infiltrées) dans un modèle de rejet aigu chez le rat mais également au niveau protéique en allogreffe rénale humaine durant le rejet infraclinique (Loong, Hsieh et al. 2002). De plus, l'antagonisme de l'IL-17 a permis de prolonger la survie du greffon dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Li, Simeoni et al. 2006). Les lymphocytes T CD4⁺ folliculaires (Thf) produisent de l'IL-21, une molécule favorisant la différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps (King, Tangye et al. 2008). Il existe également des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs dont je parlerai dans le chapitre 4.2.4.

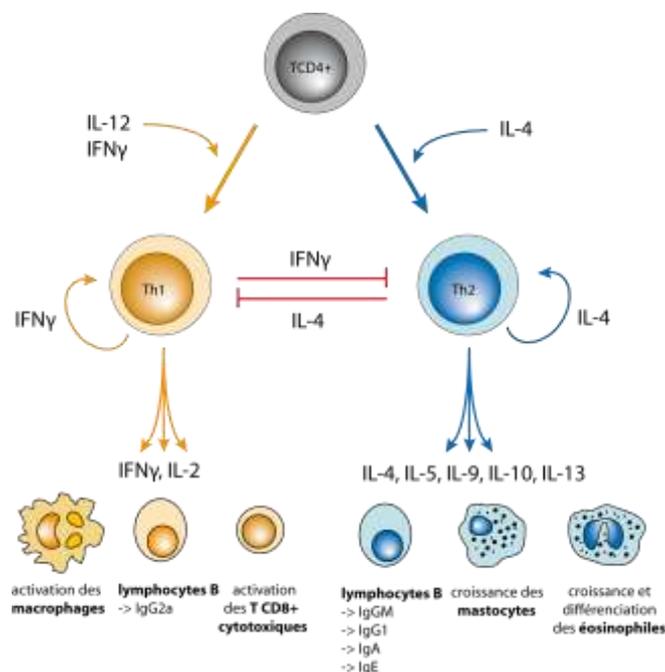


Figure 9. La dichotomie Th1/Th2

2.3.5. Les chimiokines

Les chimiokines sont une superfamille de petites protéines jouant un rôle crucial dans les réactions immunitaires et inflammatoires (Figure 10). Il existe 4 groupes de chimiokines, classés selon le nombre et l'arrangement de cystéines (C) conservées en partie N-terminale: C, CC, CXC, CX3C.

Les récepteurs des chimiokines sont différenciellement exprimés sur les cellules polarisées Th. CXCR3 et CCR5 sont préférentiellement exprimés sur les lymphocytes Th1 (Gao, Zhou et al. 2003) alors que CCR3, CCR4 et CCR8 sont associés à un phénotype Th2 (Sallusto, Mackay et al. 1997) (Zingoni, Soto et al. 1998) (Imai, Nagira et al. 1999). Les chimiokines sont capables de guider les cellules de la réponse immune vers le greffon via un gradient de concentration. En transplantation, à travers le regroupement et l'activation des neutrophiles et des monocytes, les chimiokines initient les lésions indépendantes des antigènes lors de la phase précoce du rejet cellulaire. Dans un deuxième temps, les chimiokines sont capables de recruter les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ au niveau de l'organe. La phase de rejet chronique du greffon fait également intervenir des chimiokines.

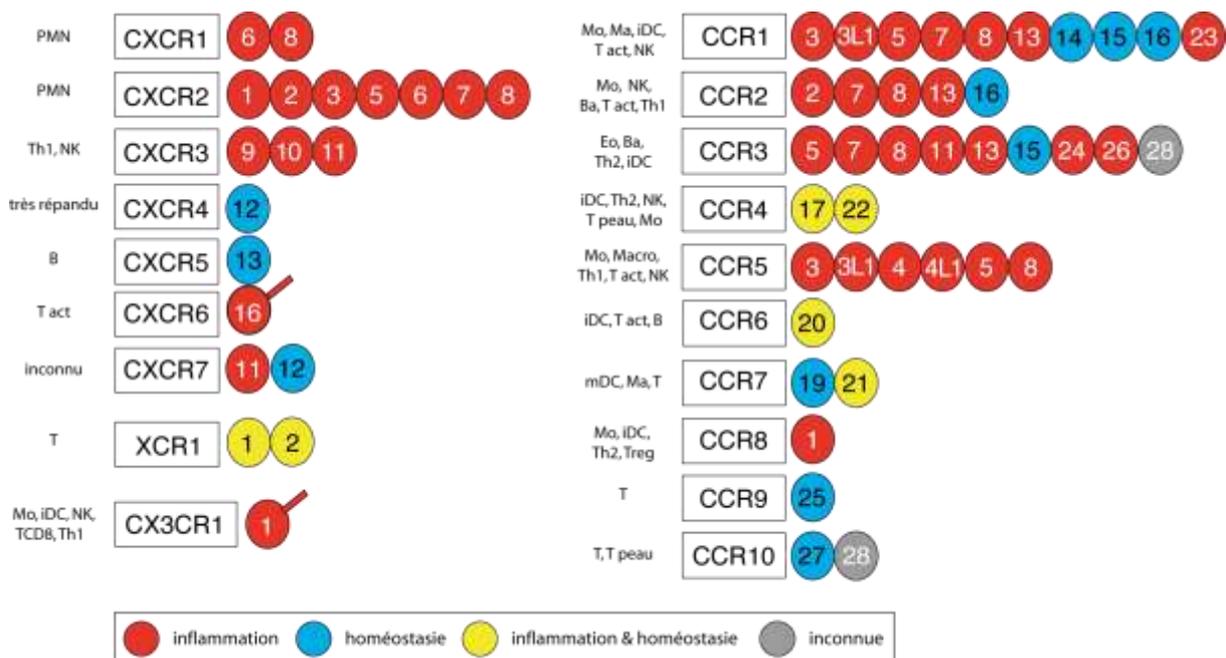


Figure 10. Les chimiokines et leurs récepteurs

D'après (Zlotnik, Yoshie et al. 2006)

PMN : neutrophile. Th1 et Th2 : Lymphocyte T CD4⁺ Th1 et Th2. NK : cellules NK. Mo : Monocytes. iDC : cellules dendritiques immatures. Ma : macrophages. Ba : basophiles. T act : lymphocytes T activés. Eo : éosinophiles. T peau : Lymphocytes T de la peau. mDC : cellules dendritiques matures. Treg : lymphocytes T régulateurs.

2.4. Les mécanismes effecteurs du rejet d'allogreffe

2.4.1. Les lymphocytes T cytotoxiques

Après activation, les lymphocytes T CD8⁺ acquièrent des propriétés cytotoxiques leur permettant de tuer leur cible par apoptose. Les deux principaux mécanismes mis en jeu sont les systèmes perforine/granzyme et Fas/Fas-ligand. Le mécanisme perforine/granzyme est surtout utilisé par les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent également exercer une activité cytotoxique via les systèmes perforine/granzyme (Williams and Engelhard 1996) ou Fas/FasL (Stalder, Hahn et al. 1994).

Lorsqu'un lymphocyte T cytotoxique reconnaît un complexe CMH/peptide, il forme une jonction serrée avec la cellule allogénique, permettant aux granules du lymphocyte cytotoxique de fusionner avec la membrane de la cellule cible. Les molécules perforines présentes dans ces granules vont former un canal permettant aux granzymes de passer dans le cytoplasme de la cellule cible. Les granzymes peuvent entrer dans le noyau ou cliver les procaspases cytoplasmiques en caspases qui vont ensuite rejoindre le noyau et fragmenter l'ADN pour finalement provoquer l'apoptose de la cellule cible.

L'interaction de Fas-ligand avec Fas, un récepteur de mort exprimé à la surface de la plupart des cellules, induit la formation d'un complexe de signalisation inducteur de mort (DISC, death inducing signaling complex) et l'activation de la cascade des caspases qui va induire la mort de la cellule cible.

2.4.2. Mécanismes dépendants des alloanticorps

Les lymphocytes B sont capables de reconnaître les alloantigènes sous leur forme native, non apprêtée par les CPA. Pour se diviser et produire des anticorps, les lymphocytes B requièrent l'aide des lymphocytes T CD4⁺ (Figure 11). Cette coopération entre les lymphocytes T et B fait intervenir la production de cytokines de type Th1, Th2 ou Thf, des interactions non spécifiques de l'antigène par l'intermédiaire de molécules de costimulation (dont l'interaction CD40/CD40L) et des interactions spécifiques de l'antigène via le TCR et le complexe CMH/allopeptide (via la présentation indirecte).

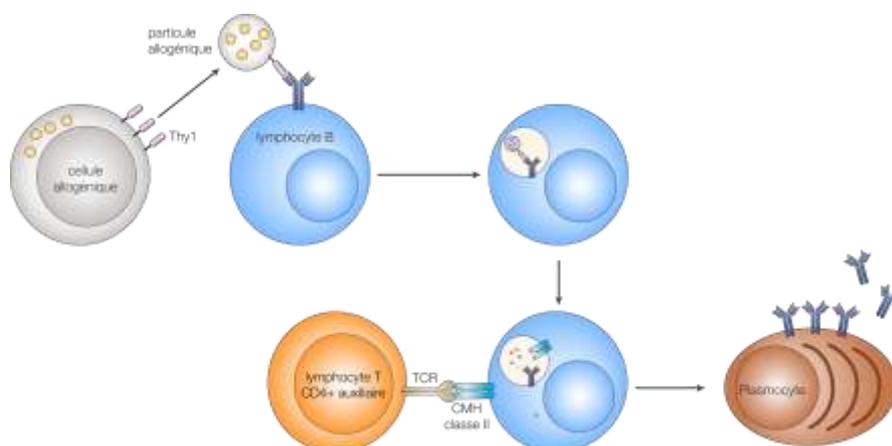


Figure 11. Coopération entre les lymphocytes T et B

D'après (Mitchison 2004)

Les mécanismes induits par la fixation des anticorps sur leur antigène cible impliquent l'opsonisation, l'activation du complément, la cascade de la coagulation et la cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC) impliquant les cellules NK et les macrophages et leurs récepteurs $Fc\gamma$. Les alloanticorps interviennent également dans le rejet chronique, mais si les patients développant des anticorps anti-HLA *de novo* ont un risque plus important de perdre leurs greffons (Terasaki and Ozawa 2005), il est possible que les anticorps anti-HLA soient présents en absence de dysfonctionnement du greffon. Ce phénomène d'accommodation peut être expliqué par l'intervention de protéines anti-apoptotiques ou l'induction de mécanismes inhibiteurs de l'activation du complément.

2.4.3. Macrophages et éosinophiles

On parle d'hypersensibilité retardée pour décrire les conséquences de l'infiltrat inflammatoire riche en lymphocytes T et macrophages. Une fois activés, les Th1 vont sécréter de l'IFN- γ et du TNF- α , conduisant à l'activation des macrophages qui vont alors sécréter des molécules toxiques comme l'oxyde nitrique ou le monoxyde d'azote (toxique à forte concentration, vasodilatateur), des intermédiaires de l'oxygène (stress oxydant) et du TNF- α (apoptose). Les macrophages sont également responsables de la mise en place de mécanismes de cytotoxicité lorsqu'ils reconnaissent certains composants du complément (C3b) et des anticorps fixés sur les cellules. De part leurs capacités de cytotoxicité et de phagocytose, les macrophages jouent un rôle important dans le rejet (MacPherson and Christmas 1984).

Les lymphocytes Th2 peuvent recruter et activer les éosinophiles dans le greffon via la production d'IL-4 et d'IL-5. Les éosinophiles activés vont sécréter des substances toxiques qui vont induire des mécanismes oxydatifs et des pores dans les membranes des cellules cibles (Goldman, Le Moine et al. 2001).

3. Le signal de costimulation

Après avoir reçu le signal CMH/peptide de la CPA, le lymphocyte T reçoit un signal déclenché par l'interaction de molécules situées à la surface des lymphocytes T et des CPA. En l'absence du signal alloantigénique, ces molécules dites « costimulatrices » ne peuvent déclencher l'activation. Si le signal de costimulation n'est pas effectif, le lymphocyte T ayant reçu le signal alloantigénique peut devenir anergique et/ou entrer en apoptose (Schwartz 1990) (Jenkins, Taylor et al. 1991). Les signaux de costimulation peuvent être activateurs ou inhibiteurs et plusieurs signaux peuvent être lancés simultanément au lymphocyte T, permettant la modulation de sa réponse.

3.1. La voie CD28

Les membres de la famille des molécules de costimulation CD28 sont des glycoprotéines transmembranaires (Sharpe and Freeman 2002). Les molécules les mieux caractérisées sont CD28 et le « cytotoxic T lymphocyte antigen 4 » CTLA4, qui interagissent avec B7-1 et B7-2. Les autres voies connues sont les voies « inducible costimulatory » ICOS/ICOS-L, « programmed death » PD/PDL1/PDL2, « B7-homologue 3 » B7/H3, « B7-homologue 4 » B7/H4 et BTLA.

3.1.1. La voie CD28/B7/CTLA4

a) Présentation de CD28

CD28 est exprimé par les lymphocytes T naïfs et activés, mais aussi par les cellules NK (Nandi, Gross et al. 1994), les neutrophiles (Venuprasad, Parab et al. 2001) et les éosinophiles (Woerly, Roger et al. 1999). Les molécules CD28 et CTLA4 présentent un motif extracellulaire MYPPPY essentiel pour la liaison avec leurs ligands, les molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86). La liaison de CD28 sur les lymphocytes T augmente la production de cytokines, en particulier IL-2 (Lenschow, Walunas et al. 1996), et augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xl (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993). L'activation de CD28 augmente également l'expression d'autres molécules de costimulation telles que CD40L, CD134 et ICOS qui vont augmenter l'expression de B7 et CD40 sur les CPA, provoquant une boucle rétroactive (McAdam, Chang et al. 2000) (Beier, Hutloff et al. 2000). Les ligands B7-1 et B7-2 ont des fonctions distinctes et complémentaires. B7-2 est constitutivement exprimé et rapidement surexprimé sur les CPA après l'engagement du TCR et B7-1 est faiblement exprimé sur les CPA au repos et surexprimé après une stimulation prolongée (McAdam, Schweitzer et al. 1998) (Kim, Denton et al. 2001). Ces différences d'expression suggèrent des rôles distincts: B7-2 semble jouer un rôle important dans l'initiation de l'activation des lymphocytes T alors que B7-1 semble perpétuer la réponse immune.

La voie de costimulation CD28/B7 régule également la balance Th1/Th2. En l'absence de CD28, les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 ne sont pas produites, suggérant que la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes de type Th2 est dépendante de la voie de costimulation CD28/B7 (Rulifson, Sperling et al. 1997) (Schweitzer and Sharpe 1998). CD28 est également impliqué dans l'inflammation en induisant la production de chimiokines telles que MIP-1 α (CCL3) et MIP-1 β .

(CCL4) (Herold, Lu et al. 1997) ou l'expression de récepteurs de chimiokines comme CXCR4 (Carroll, Riley et al. 1997). L'étude de souris NOD (Non Obese Diabetic) a permis de montrer que la voie de costimulation CD28/B7 était essentielle au développement et à l'homéostasie des lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ régulatrices (Salomon, Lenschow et al. 2000) (Tang, Henriksen et al. 2003).

b) CTLA4 et CTLA4-Ig

Après activation du lymphocyte T par l'interaction CD28/B7, la molécule CTLA4 est surexprimée (Alegre, Frauwirth et al. 2001). CTLA4 est structurellement homologue à CD28 mais à une plus forte avidité pour les ligands B7-1/B7-2 et est un inhibiteur des lymphocytes T (Figure 12). L'interaction CTLA4/B7 conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 des lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ naïfs (Krummel and Allison 1996) (Walunas, Bakker et al. 1996). L'arrêt du cycle cellulaire induit par CTLA4 peut conduire à l'apoptose des lymphocytes activées (Scheipers and Reiser 1998). Cette molécule est constitutivement exprimée par les lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+$ et est essentielle au développement de leur activité inhibitrice (Takahashi, Tagami et al. 2000) (Greenwald, Boussiotis et al. 2001).

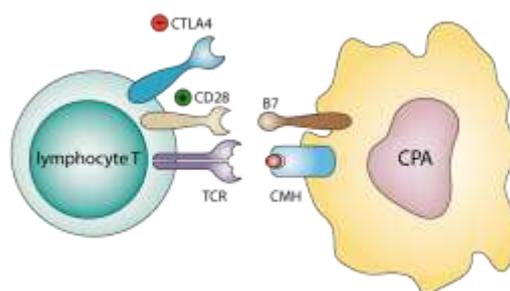


Figure 12. Interaction CD28/CTLA4/B7

La protéine de fusion CTLA4-Ig a été développée pour inhiber la costimulation des lymphocytes T liée à B7-1 et -2. Dans des modèles de transplantation chez le rongeur, la survie du greffon est régulièrement prolongée par un traitement au CTLA4-Ig, induisant dans de nombreux cas une tolérance spécifique du donneur mais ces résultats n'ont pu être réitérés dans un modèle de transplantation rénale chez le primate (Larsen, Pearson et al. 2005). Cet échec a été mis sur le compte de la faible affinité de CTLA4 pour B7-2 par rapport à B7-1. Des expériences de mutagenèse dirigée sur les régions contrôlant l'avidité de la molécule ont permis d'obtenir une deuxième génération de molécules de fusion CTLA4-Ig, le Belatacept. Ainsi, dans plusieurs études de transplantation rénale chez le primate non humain, le Belatacept s'est montré beaucoup plus efficace que les molécules de première génération et, combiné avec les immunosuppresseurs Basiliximab (un anti-récepteur à l'IL-2), des stéroïdes, et le MMF (un antiprolifératif), la fonction du greffon est significativement prolongée (Larsen, Pearson et al. 2005). De plus, le Belatacept est capable d'inhiber la formation d'anticorps contre le donneur, connus pour contribuer au rejet chronique et constituant un obstacle majeur à la retransplantation. Des études cliniques de phase III utilisant le Belatacept sont actuellement en cours (Vincenti and Kirk 2008).

c) Les anticorps anti-CD28 chez l'homme

Le blocage de l'interaction CD28/B7 via des anticorps dirigés contre B7-1 et B7-2 a également été évalué. Expérimentalement, ces anticorps bloquent la costimulation et induisent une forte immunosuppression, cependant le développement clinique d'anticorps anti-B7.1/anti-B7.2 a été stoppé en raison du coût engendré par l'administration de 2 anticorps monoclonaux et des difficultés liées à des problèmes de propriétés intellectuelles entourant B7.1/B7.2.

Cibler CD28 avec un anticorps divalent peut conduire à la dimérisation de la molécule et donc à son activation. Vanhove *et al.* (Vanhove, Laflamme et al. 2003) ont développé une molécule de fusion monovalente antagoniste provenant de la fusion d'un fragment ScFv (Single chain Fv) d'un anticorps anti-CD28 humain bloquant de haute affinité avec l' α 1-anti-trypsine humaine qui permet d'augmenter la demi-vie de l'anticorps en augmentant la taille de la protéine (Ferkol, Eckman et al. 2000). La protéine obtenue est appelée sc28AT et un des projets auquel je participe, et qui est discuté dans cette thèse, contribue à l'évaluation de l'efficacité de cette molécule en allotransplantation chez le primate non humain.

Certains anticorps dirigés contre CD28 sont agonistes ou superagonistes. Le FK734, un anticorps agoniste partiel de CD28, induit la production de cytokines ainsi que la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ en réaction lymphocytaire mixte mais est capable d'inhiber la réaction lorsque les cellules stimulatrices sont transduites avec B7-2. Administré à des souris immunodéficientes SCID (Severe combined immunodeficiency) ayant reçu une greffe de peau humaine et des PBMC humains, cet anticorps a retardé le rejet médié par les lymphocytes T chez le rongeur (Shiao, McNiff et al. 2007). Un anti-CD28 superagoniste, TGN1412, capable d'induire chez le primate non humain une expansion des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ sans affecter la composante inflammatoire, a été testé en essai clinique. L'utilisation de cet anticorps chez l'Homme a provoqué un choc cytokinique et une déficience multiorgane chez six volontaires sains (Suntharalingam, Perry et al. 2006). La présence chez l'Homme d'acides aminés additionnels dans la partie inter-membranaire du CD28 et impliqués dans la transmission du signal pourrait expliquer les résultats divergents entre l'Homme et le primate non humain (Ohresser, Olive et al. 2006).

d) CD28 et les lymphocytes T régulateurs

Plusieurs résultats expérimentaux montrent que CD28 est nécessaire aux lymphocytes T régulateurs. Le blocage de la voie de costimulation CD28/B7 conduit au développement d'un diabète associé à une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ périphériques chez la souris prédiabétique NOD (Salomon, Lenschow et al. 2000). Les lymphocytes Tregs CD8⁺CD122⁺ isolés à partir de souris déficientes en CD28 ne présentent pas d'activité suppressive (Shi, Rifa'i et al. 2008). De plus, l'utilisation d'un anticorps anti-CD28 superagoniste augmente la fréquence des lymphocytes T régulateurs *in vitro* et *in vivo* (Lin and Hünig 2003). CD28 semble augmenter la génération de ces lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ en amplifiant les signaux liés au TCR, en augmentant l'expression de CD25, et en favorisant la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T conventionnels (Tang, Henriksen et al. 2003). S'il semble important pour médier leur génération, CD28 n'est pas indispensable à la fonction régulatrice des lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ (Guo, Iclozan et al. 2008). En clinique, l'administration d'anticorps antagonistes anti-CD28 chez des patients nouvellement greffés pourrait donc empêcher le développement de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ à long terme (Hünig 2007).

3.1.2. La voie ICOS/ICOS-L

ICOS partage 30-40% d'homologie avec CD28 et CTLA4 mais ne possède pas le motif extracellulaire MYPPPY nécessaire pour interagir avec B7-1 et B7-2 (Beier, Hutloff et al. 2000) (Hutloff, Dittrich et al. 1999). ICOS interagit avec ICOS-ligand, exprimé constitutivement par les lymphocytes B, et faiblement sur les monocytes. L'expression d'ICOS-ligand peut aussi être induite sur les fibroblastes, les tissus non lymphoïdes et d'autres cellules présentatrices d'antigène non professionnelles (Swallow, Wallin et al. 1999) (Yoshinaga, Whoriskey et al. 1999). ICOS n'est pas constitutivement exprimé par les lymphocytes T naïfs, mais est induit après l'activation (Yoshinaga, Whoriskey et al. 1999). ICOS est également exprimé par les lymphocytes T mémoires (Hutloff, Dittrich et al. 1999), dont l'activation est indépendante des interactions B7/CD28 et CD40/CD40L (London, Lodge et al. 2000). Cette molécule module la réponse immune des lymphocytes T activés et des lymphocytes T mémoires (Hutloff, Dittrich et al. 1999). Les souris déficientes en ICOS ont une réponse humorale réduite due en raison de difficultés à former des centres germinatifs et à opérer la commutation isotypique des immunoglobulines (Dong, Juedes et al. 2001) (Dong, Temann et al. 2001) (Tafari, Shahinian et al. 2001).

L'efficacité du seul blocage d'ICOS en allogreffe cardiaque chez le rat est controversée. Plusieurs études n'ont montré aucune prolongation de la survie du greffon (Salama, Yuan et al. 2003) (Guo, Fujino et al. 2003) alors qu'une étude réalisée par notre laboratoire a montré une légère prolongation de la survie (Guillonnet, Aubry et al. 2005). Ces divergences semblent dues à la dose d'anti-ICOS/ICOS-Ig ou aux souches d'animaux utilisés.

3.1.3. La voie PD1:PD-L1/PD-L2

PD1 est exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés, les lymphocytes B, les cellules NK et les macrophages (Sharpe and Freeman 2002). PD1 peut interagir avec deux ligands exprimés par les CPA après activation, PD-L1 et PD-L2 (Latchman, Wood et al. 2001) (Freeman, Long et al. 2000). PD-L1 et/ou PD-L2 sont constitutivement exprimés par diverses cellules parenchymateuses dans des organes non lymphoïdes tels que le cœur, le poumon, le rein, le pancréas et peuvent être induits sur les cellules endothéliales (Rothstein and Sayegh 2003). L'activation de cette voie provoque l'arrêt de la progression dans le cycle cellulaire, sans pour autant induire la mort cellulaire (Latchman, Wood et al. 2001).

In vitro, l'utilisation d'un anticorps monoclonal bloquant PD-L1 augmente la prolifération T alloantigénique et favorise la différenciation Th1 (Sandner, Clarkson et al. 2005). PD-L1Ig ou PD-L2Ig ne peuvent prolonger la survie d'une greffe de cœur, cependant PD-L1Ig agit de manière synergique avec la ciclosporine A et la Rapamycine, des anticorps anti-CD40L ou chez des souris CD28^{-/-} pour induire une survie à long terme du greffon (Ozkaynak, Wang et al. 2002) (Gao, Demirci et al. 2003). Le blocage de PDL1, et non PDL2, empêche l'induction de la tolérance médiée par CTLA4-Ig dans un modèle murin d'allogreffe cardiaque (Tanaka, Albin et al. 2007). De plus, cette voie semble participer à la génération de cellules régulatrices (Aramaki, Shirasugi et al. 2004) (Wang, Pino-Lagos et al. 2008).

3.1.4. B7-H3 et B7-H4

B7 homolog 3 (B7-H3) est exprimé par les CPA (Prasad, Nguyen et al. 2004) mais aussi dans les tissus non lymphoïdes et est surexprimé sous l'effet des médiateurs de l'inflammation (Chapoval, Ni et al. 2001) (Suh, Gajewska et al. 2003) (Sun, Richards et al. 2002). Son récepteur reste inconnu et serait induit à la surface des lymphocytes T activés. B7-H3 a été initialement défini comme une molécule induisant un signal positif mais des études portant sur des souris KO et de nouvelles molécules de fusion suggèrent une fonction régulatrice négative dans la réponse immune médiée par les lymphocytes T (Suh, Gajewska et al. 2003). De plus, l'utilisation d'un anticorps monoclonal antagoniste chez la souris induit la prolifération des lymphocytes T *in vitro* et l'exacerbation d'un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (Prasad, Nguyen et al. 2004).

B7 homolog 4 (B7-H4) régule négativement la réponse des lymphocytes T *in vitro* en délivrant un signal capable d'inhiber la prolifération médiée par le TCR, la progression du cycle cellulaire en phase G0/G1, et la production d'IL-2 (Sica, Choi et al. 2003) (Prasad, Richards et al. 2003) (Zang, Loke et al. 2003). Cette molécule est inductible sur les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques et les monocytes chez l'Homme. Son récepteur n'a pas encore été identifié, mais la fixation de B7-H4Ig est restreinte aux lymphocytes T activés (Sica, Choi et al. 2003) (Prasad, Richards et al. 2003). L'administration de B7-H4Ig chez la souris réduit la prolifération et l'activité des LTC et permet de prolonger la survie dans un modèle de GVHD (Sica, Choi et al. 2003). De plus la sécrétion de l'IL-10 par les lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺ pourrait induire l'expression de B7-H4 à la surface des CPA et

leurs conférer des propriétés immunosuppressives (Kryczek, Wei et al. 2006), néanmoins le rôle des lymphocytes Tregs dans ce phénomène reste discuté (Mirza and Gabrilovich 2007).

3.1.5. BTLA

BTLA (B and T lymphocyte attenuator) est exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺ Th1 activés et sur les lymphocytes B (Watanabe, Gavrieli et al. 2003) (Greenwald, Freeman et al. 2005). La liaison avec son ligand, HVEM (herpes virus entry mediator), diminue la prolifération T induite par la stimulation allogénique (Sedy, Gavrieli et al. 2005). Les souris déficientes pour BTLA sont plus susceptibles à l'EAE (Watanabe, Gavrieli et al. 2003). Son implication dans le rejet et la tolérance est encore inconnue.

De façon plus générale, on peut rappeler que ces molécules inhibitrices de la famille CD28/B7 ont été retrouvées surexprimées dans le microenvironnement de nombreux cancers chez le rongeur et l'Homme, et semblent contribuer à l'immuno-évasion des tumeurs (Zou and Chen 2008).

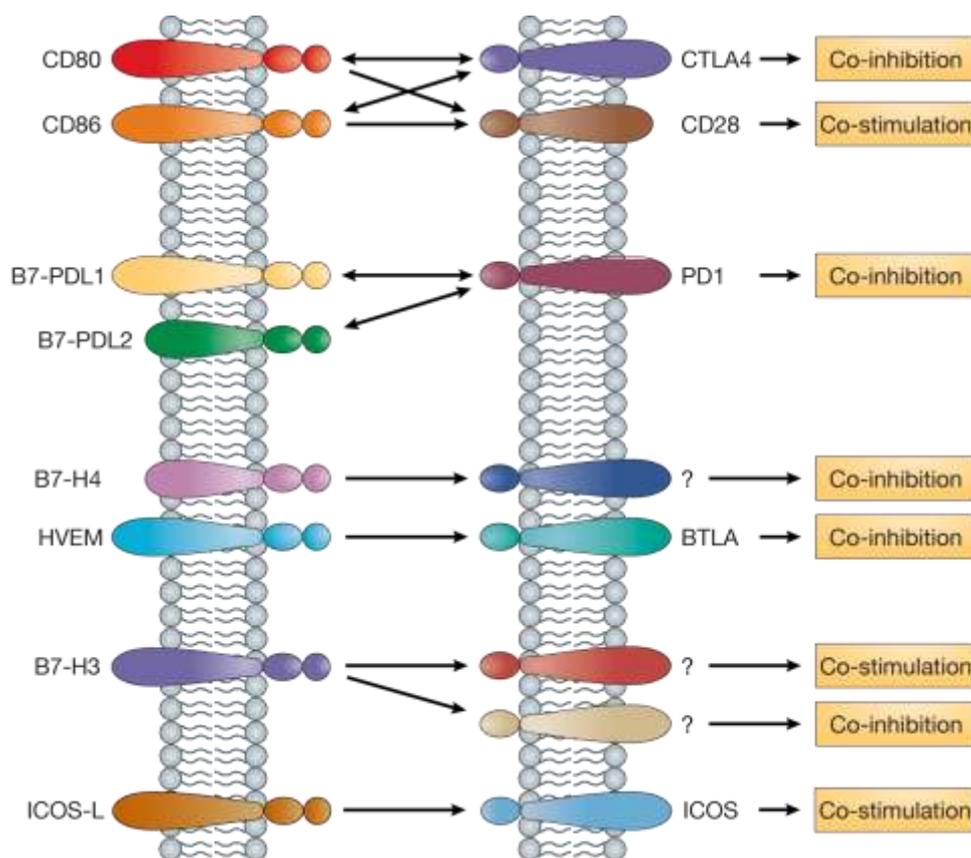


Figure 13. La voie de costimulation CD28

D'après (Chen 2004)

3.2. La voie CD40/CD40 ligand

3.2.1. Présentation

CD40 est une protéine transmembranaire de la famille des récepteurs au TNF exprimée constitutivement à la surface des lymphocytes B (Grammer, McFarland et al. 1999), des cellules endothéliales (Karmann, Hughes et al. 1995), des plaquettes (Inwald, McDowall et al. 2003), des macrophages (Mach, Schînbeck et al. 1997) et des cellules dendritiques activées (McLellan, Sorg et al. 1996). CD40 ligand (CD154) fait partie de la famille des TNF et existe sous forme membranaire mais également sous forme soluble, pouvant jouer le rôle de cytokine sur les cellules CD40⁺ distantes (Ludewig, Henn et al. 1996). CD40 ligand a été identifié sur les lymphocytes T activés (Klaus, Choi et al. 1997), les lymphocytes B activées (Higuchi, Aiba et al. 2002), les plaquettes activées (Henn, Slupsky et al. 1998), les cellules mastocytaires, les basophiles (Gauchat, Henchoz et al. 1995) et les éosinophiles.

CD40 active la prolifération, la différenciation et la production d'Ig chez les lymphocytes B (Foy, Aruffo et al. 1996) et prolonge la survie des lymphocytes B mémoires en stimulant l'activité télomérase (Hu, Lee et al. 1997). L'activation dépendante de CD40 va guider les lymphocytes B au cours de leur différenciation en évitant l'apoptose, en permettant la différenciation des cellules du centre germinatif, la commutation isotypique et la maturation en lymphocytes B mémoires. Le signal CD40 doit ensuite disparaître afin de permettre la différenciation complète des lymphocytes B matures activés en cellules plasmocytaires (Arpin, DÇchanet et al. 1995) (Randall, Heath et al. 1998). L'activation de CD40 sur les lymphocytes B induit la production de cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α), l'expression de molécules d'adhésion et de récepteurs de la costimulation (ICAM, CD23, B7-1, B7-2).

L'activation du CD40 exprimé par les CPA permet leur survie (Foy, Aruffo et al. 1996), la sécrétion de cytokines (dont IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , MIP-1 α) et de certaines enzymes comme les métallo-protéinases matricielles (MMP) (Grewal and Flavell 1998), et la synthèse de NO. La liaison CD40/CD40 ligand modifie également le phénotype des CPA en induisant la surexpression de molécules de costimulation (CD80/B7-1 et CD86/B7-2) et de molécules d'adhésion (CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3). CD40 va donc jouer un rôle primordial dans la relation lymphocyte T/CPA en permettant la maturation complète des cellules dendritiques en cellules présentatrices d'antigène plus performantes (Figure 14).

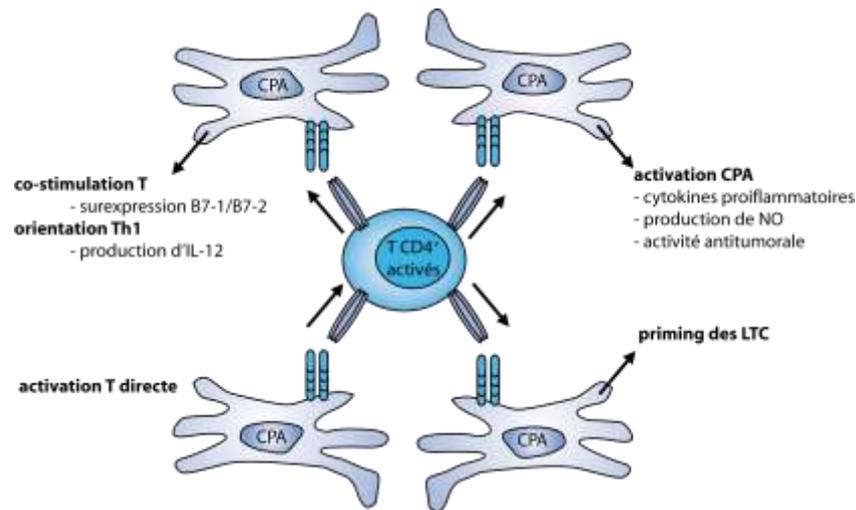


Figure 14. Rôle de CD40/CD40 ligand dans les interactions entre les lymphocytes T et les CPA

D'après (van Kooten and Banchereau 2000). CD40 est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes et CD40 ligand par les lymphocytes T CD4⁺ activés.

3.2.2. Blocage de CD40/CD40L en transplantation

Du fait du rôle majeur de l'interaction CD40/CD40L dans la réponse immunitaire, de nombreuses équipes se sont intéressées au blocage de cette voie afin d'empêcher le rejet d'allogreffe dans des modèles expérimentaux. En 1995, Parker *et al* (Parker, Greiner et al. 1995) ont démontré l'intérêt de l'anticorps anti-CD40L sur le rejet d'allogreffe en le combinant à une injection de lymphocytes inactivés du donneur (TSD, transfert de sang du donneur). Par la suite, d'autres équipes ont démontré l'intérêt du blocage de l'interaction CD40/CD40L dans des modèles murins via des anticorps anti-CD40L, anti-CD40 ou la protéine de fusion CD40-Ig. L'efficacité des thérapies visant à bloquer cette voie dépend du dosage des anticorps, du traitement associé, du type d'allogreffe et de l'espèce.

Si on s'en tient à la présentation de la voie CD40/CD40L, en transplantation, les anticorps anti-CD40L devraient limiter la maturation des CPA, l'interaction CD28/B7 pour conduire à l'absence du signal 2 de costimulation et permettre l'induction d'anergie (Ranheim and Kipps 1993; Ranheim and Kipps 1995). Dans la pratique, les anticorps anti-CD40L utilisés en monothérapie favorisent la survie à long terme du greffon dans de nombreux modèles chez le rongeur et synergisent avec le blocage de CD28. Néanmoins, chez la souris, les anticorps anti-CD40L ne peut éviter le rejet induit par les lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ (Honey, Cobbold et al. 1999) (Jarvinen, Blazar et al. 2003). De plus, le blocage de CD40L inhibe l'activation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs mais est incapable d'agir sur les lymphocytes T CD8⁺ mémoires ou les lymphocytes T CD8⁺ déjà activés (Valujskikh, Pantenburg et al. 2002) (Zhai, Meng et al. 2002). D'autres études ont montré qu'une infection par un virus ou un autre agent infectieux peut modifier la réponse au blocage de CD40L en induisant une réaction croisée des lymphocytes T CD8⁺ vers les alloantigènes (Welsh, Markees et al. 2000) (Forman, Welsh et al. 2002) (Pantenburg, Heinzl et al. 2002).

Pour être efficace, il est donc nécessaire d'associer le blocage de la voie CD40/CD40L avec une autre stratégie. La combinaison d'un anti-CD40L avec le CTLA4-Ig agit en synergie pour induire la survie à long terme en allogreffe cardiaque et en greffe de peau chez la souris (C P Larsen et coll. 1996), et en allogreffe cardiaque chez le primate (Kirk, Harlan et al. 1997). De plus, des études ont montré que l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA4 annulait les effets des anticorps anti-CD40L et anti-B7-2 en allogreffe cardiaque chez la souris (Tsai, Ho et al. 2004) (Coenen, Koenen et al. 2006), ce qui suggère que le signal CTLA4 est nécessaire à l'action des anticorps anti-CD40L. Pour être efficace, il semble nécessaire de bloquer spécifiquement CD28 en préservant les mécanismes inhibiteurs liés à CTLA4 en utilisant, par exemple, l'anticorps sc28AT (voir chapitre 3.1.1c).

L'association avec un traitement TSD améliore également les effets de l'anti-CD40L (Lin, Bolling et al. 1993). Les cellules injectées lors du traitement vont rapidement entrer en apoptose, et leurs peptides être présentés par les CPA. L'anti-CD40L va empêcher la maturation de ces CPA, rendant ces allopeptides tolérogènes. Cependant, même en combinant les traitements TSD et CTLA4-Ig, le blocage de CD40/CD40L n'évite pas le rejet chronique chez le rongeur (Guillonneau, Louvet et al. 2004) (Shirasugi, Adams et al. 2002). L'induction d'un chimérisme mixte par greffe de moelle osseuse associé à un traitement anti-CD40L chez la souris a permis d'obtenir une tolérance vis à vis du donneur, et ce en absence d'irradiation du thymus ou de l'utilisation d'anticorps anti-lymphocytes T déplétants (Wekerle, Sayegh et al. 1999).

L'association avec des médicaments immunosuppresseurs peut avoir des conséquences variées. Ainsi, *in vitro*, l'addition d'un inhibiteur des calcineurines, la ciclosporine A, limite l'expression de CD40L à la surface des cellules (Fuleihan, Ramesh et al. 1994), inhibe la prolifération, l'apoptose et donc la délétion des lymphocytes T allo-réactives nécessaires à l'induction de la tolérance périphérique (Li, Li et al. 1999). Néanmoins, chez des patients traités à la ciclosporine A, reste CD40L exprimé dans les tissus lymphoïdes, suggérant que la voie CD40/CD40L reste fonctionnelle (van Rijen, Kuijff et al. 2002). La combinaison avec la Rapamycine, un inhibiteur de mTOR, semble plus appropriée. L'utilisation d'un anti-CD40L et CTLA4-Ig combinée avec la Rapamycine induit une apoptose massive des lymphocytes T allo-réactifs et une tolérance à la greffe de peau et à la greffe cardiaque chez la souris, alors que la ciclosporine A associée à l'anti-CD40L et CTLA4-Ig abroge cette tolérance (Li, Li et al. 1999). Chez le primate non humain, l'administration d'un traitement combiné TSD/Rapamycine/anti-CD40L permet d'induire une survie à long terme d'une greffe de peau (Xu, Montgomery et al. 2003).

La combinaison avec le blocage des molécules d'adhésion LFA-1/ICAM1, (Metzler, Gfeller et al. 2004), l'utilisation d'un anti-CD45RB (cellules mémoires) (Rothstein, Livak et al. 2001), ou un anti-IL-7 (nécessaire à la génération des lymphocytes mémoires) (Wang, Dai et al. 2006) donne des résultats encourageants. La stratégie visant à associer du sérum anti-lymphocytaire afin de dépléter les lymphocytes T pré-activés allo-réactifs réduit les effets bénéfiques du blocage (Haanstra, Sick et al. 2006).

Les mécanismes observés dans ces différentes études sont multiples : délétion des lymphocytes T CD8⁺ (Iwakoshi, Mordes et al. 2000) et CD4⁺ (Blair et coll. 2000) alloréactifs par apoptose et déplétion directe dépendante de la région Fc (Monk, Hargreaves et al. 2003), inhibition ou retard de la production d'anticorps anti donneur, anergie des cellules CD4⁺ et développement de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Coenen, Koenen et al. 2005) (Zhai, Meng et al. 2006) (Masunaga, Yamashita et al. 2005). Notre laboratoire a également mis en évidence que l'utilisation de la molécule de fusion CD40-Ig dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat induit une survie à long terme du greffon via la génération de lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} produisant de l'IFN-γ et agissant via l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) (Guillonnet, Hill et al. 2007). L'ensemble de ces résultats montre clairement que le blocage de l'interaction CD40/CD40L n'agit pas uniquement de manière passive mais est également capable d'induire des mécanismes tolérogènes.

Chez le primate non humain, le traitement avec des anticorps anti-CD40L retarde efficacement le rejet de greffe (Kirk, Harlan et al. 1997) (Xu, Tadaki et al. 2002), mais induit une immunosuppression prolongée plutôt qu'une véritable tolérance. Les animaux développent des réponses IgG spécifiques du donneur et, après l'arrêt de la thérapie, peuvent développer un rejet aigu. En absence de rejet aigu, les animaux montrent des signes histopathologiques de rejet chronique. Différentes raisons peuvent expliquer ces différences d'efficacité entre les deux types de modèles. Les rongeurs issus d'animaleries exemptes d'organismes pathogènes ont moins de cellules mémoires et sont plus sensibles à l'induction de tolérance par blocage CD40/CD40L que les rongeurs infectés par des virus ayant plus de cellules mémoires (Adams, Williams et al. 2003). Comme l'interaction CD40/CD40L est importante pour l'activation des lymphocytes T naïfs mais pas pour les lymphocytes T mémoires (Borrow, Tough et al. 1998), le manque d'efficacité du blocage de CD40/CD40L chez le primate pourrait être dû au plus grand nombre de lymphocytes T mémoires capables de reconnaître aussi les antigènes du donneur.

4. La tolérance

Le système immunitaire est constamment en équilibre entre la tolérance aux antigènes du soi et la réponse aux éléments venus de l'extérieur (pathogènes, antigènes étrangers). En transplantation, la tolérance à une allogreffe se définit par l'acceptation du greffon sans traitement immunosuppresseur prolongé, l'absence de lésion de rejet chronique, et la conservation des défenses immunes vis-à-vis des pathogènes et antigènes étrangers. On distingue deux catégories de mécanismes de tolérance à l'allogreffe: la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

4.1. Tolérance Centrale

Pendant le développement précoce des lymphocytes T, les réarrangements des gènes du récepteur des lymphocytes T (TCR) permettent de générer environ 10^{18} récepteurs différents, capables de reconnaître l'ensemble des structures antigéniques, y compris les antigènes du soi. Dans le thymus, les précurseurs des lymphocytes T, les thymocytes $CD4^+CD8^-$ doubles négatifs vont être en contact avec les complexes CMH/peptides du soi présentés par l'épithélium et les cellules dendritiques du cortex thymique. Seuls les thymocytes capables de se lier à un complexe CMH/peptide avec suffisamment d'affinité reçoivent un signal de survie, c'est la sélection positive. Selon le type de CMH que le TCR aura pu lier, il perdra un de ses deux marqueurs pour devenir simple positif $CD4^+$ ou $CD8^+$. Les thymocytes ayant survécu migrent dans la médulla thymique où ils sont mis en présence de peptides du soi complexés avec les molécules du CMH. Les cellules dont le TCR agit fortement avec les antigènes du soi vont générer des signaux apoptotiques et mourir, c'est la sélection négative. Les lymphocytes vont ensuite pouvoir se différencier progressivement pour devenir matures et migrer en périphérie du thymus. Le gène *AIRE* (Autoimmune Regulator) permet la présentation des peptides autologues, normalement exprimés en périphérie dans le thymus et donc l'établissement d'un état de tolérance au soi en intervenant dans la sélection négative des thymocytes auto-réactifs (Zuklys, Balciunaite et al. 2000). Ainsi, des souris *AIRE*^{-/-} développent des maladies auto-immunes (Anderson, Venanzi et al. 2002). Le thymus est également la source de cellules régulatrices $CD4^+$ spécifiques d'antigènes du soi, caractérisées par l'expression élevée et constitutive de CD25, la chaîne alpha du récepteur à L'IL-2 (Itoh, Takahashi et al. 1999).

En transplantation, on peut obtenir une tolérance centrale en colonisant le thymus du receveur avec les cellules hématopoïétiques du donneur. Les lymphocytes capables de reconnaître les complexes CMH/peptides du donneur vont donc mourir suite à la sélection négative. Cette technique aboutit à la coexistence de cellules ayant des fonds génétiques différents dans un même organisme, c'est-à-dire un chimérisme mixte. L'établissement d'un chimérisme hématopoïétique est capable d'entraîner une tolérance en allogreffe chez les rongeurs mais aussi chez les primates et chez l'Homme (Gibbons and Sykes 2008). La greffe de moelle osseuse est aujourd'hui la seule méthode capable d'induire un état de tolérance en allotransplantation chez l'Homme (Fudaba, Spitzer et al. 2006).

4.2. Tolérance périphérique

4.2.1. L'ignorance

En immunologie, l'ignorance correspond à l'absence de réponse des lymphocytes T à une stimulation antigénique spécifique. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène. 1) L'affinité du TCR vis-à-vis du complexe CMH/peptide peut être en dessous du seuil d'activation. 2) Les lymphocytes T et les cellules dendritiques peuvent être séparés physiquement. Il existe en effet des sites immunologiquement privilégiés comme le cerveau, les testicules ou la chambre antérieure de l'œil. (Figure 15)

4.2.2. La délétion

Comme nous l'avons vu précédemment, la délétion clonale prend place dans le thymus; néanmoins cette délétion peut également avoir lieu en périphérie. En effet, après avoir reconnu le complexe CMH/peptide et en absence de signal de costimulation (Ferber, Schînrich et al. 1994), ou de facteurs de croissance (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21) (Forster, Hirose et al. 1995), le lymphocyte T peut entrer en apoptose (Ferber, Schînrich et al. 1994). De plus, suite à des stimulations allogéniques répétées, l'IL-2 peut entraîner l'expression de FasL (Li, Wells et al. 2000), qui va se lier au Fas constitutivement exprimé et provoquer la mort des lymphocytes T par AICD (apoptosis induced cell death) (Forster, Hirose et al. 1995). (Figure 15)

4.2.3. L'anergie

L'anergie définit l'incapacité fonctionnelle des lymphocytes T naïfs activés par un antigène à proliférer lorsqu'ils sont restimulés par ce même antigène (Schwartz 1996). Cet état d'anergie peut être dû à une activation incomplète résultant de l'absence de costimulation ou à l'altération du signal lié à l'engagement du TCR avec un ligand modifié (Sloan-Lancaster, Steinberg et al. 1996). Les cellules n'exprimant pas le CTLA4 résistent à l'induction de l'anergie (Greenwald, Boussiotis et al. 2001), montrant la nécessité de l'engagement CTLA4-B7 dans l'anergie *in vivo*. Sur le plan moléculaire, l'association des facteurs de transcription NFAT et AP-1 au niveau des séquences de promoteurs de gènes de cytokines est nécessaire à une réponse immunitaire effective (Figure 8). La fixation nucléaire de NFAT seule induit l'activation d'un nombre limité de gènes (Maciàn, García-Cózar et al. 2002) et inhibe le signal d'activation si le lymphocyte T est restimulé. En transplantation, le blocage de la costimulation induit une tolérance dans de très nombreux modèles animaux (voir chapitre costimulation) qu'il s'agisse du blocage de la liaison CD28/B7 ou de la liaison CD40/CD40L. Cette tolérance est souvent inhibée par la ciclosporine A, ce qui souligne l'implication de la fixation nucléaire de NFAT dans ce processus de tolérance. Néanmoins, l'induction de tolérance observée par l'association de la ciclosporine A et du blocage de la liaison de la molécule de costimulation ICOS à son ligand (Ozkaynak, Gao et al. 2001) suggère que les mécanismes de tolérance périphérique induits par le blocage de la costimulation ne se limitent pas uniquement à l'anergie. (Figure 15)

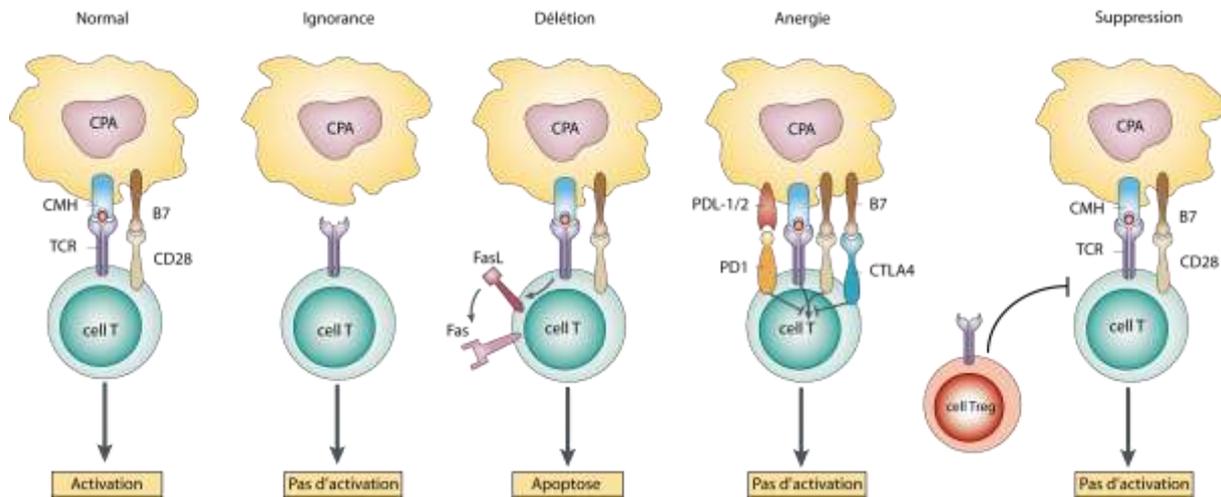


Figure 15. Les mécanismes de la tolérance périphérique

(Walker and Abbas 2002)

4.2.4. Les lymphocytes T régulateurs

Depuis que l'équipe de *Sakaguchi* a mis en évidence l'importance du mécanisme d'immunosuppression dépendant de lymphocytes T dans la tolérance aux antigènes du soi, de nombreuses équipes se sont intéressées aux lymphocytes T régulateurs. Ces travaux ont mis en évidence la capacité des lymphocytes $CD4^+CD25^+$ à maintenir la tolérance en transplantation. D'autres sous-populations de Tregs peuvent contribuer à cette tolérance et j'ai choisi de classer ces cellules selon leurs phénotypes. Ce chapitre ne se veut pas exhaustif mais traitera de différents groupes et mécanismes régulateurs (Tableau 1) des lymphocytes T régulateurs $CD4^+$ de type 1 (Tr1), des lymphocytes Th3, des lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^-$ anergiques, des lymphocytes Tregs $CD8^+CD28^-$, des lymphocytes Tregs $CD3^+CD4^-CD8^-$ doubles négatives, des lymphocytes NKT, et des lymphocytes T $\gamma\delta$. Il existe également plusieurs types de cellules non T régulatrices capables d'induire la tolérance périphérique qui ne seront pas traités ici (cellules dendritiques (Moser 2003) et cellules dendritique plasmacytoïdes (Arpinati, Chirumbolo et al. 2003), cellules souches mésenchymateuses (Rasmusson 2006), macrophages activés alternativement (Schebesch, Kodelja et al. 1997), cellules myéloïdes suppressives (Dugast, Haudebourg et al. 2008)).

Type		Phénotype	Mécanisme	Rôle en Transplantation
CD4+	CD25	CTLA4 (CD152), GITR (TNRSF18), CD62L, CD45, CD122, CD103, Foxp3	- cytokines inhibitrices - cytolyse - privation métabolique - ciblage des CD	Connu
	CD25-		- cytokines inhibitrices	Connu
	Tr1		- cytokines inhibitrices - ciblage des CD	Connu
	Th3		- cytokines inhibitrices - induction Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺	Connu
CD8+	CD28-	GITR, CTLA4, Foxp3, récepteurs KIR	- induit les récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 sur les CPA - Induction Tregs	Connu
	CD8 $\alpha\alpha$		- TCR restreint au Qa-1 - cytolyse - syngénique	Inconu
	CD122+		- cytokines inhibitrices	Inconnu
	CD45RC _{low}	Foxp3, CTLA4, GITR	- ciblage des CPA	Connu
	CD11c ⁺		- ciblage des CPA	Inconnu
	CD4- CD8-	CD3+	- cytolyse	Connu
	NKT	CD161, NKKRP-1	- restreint au CD1d - induction CD4 ⁺ CD25 ⁺	Connu
T $\gamma\delta$	TCR $\gamma\delta$	- cytolyse - cytokines inhibitrices - favorise la barrière épithéliale	Connu	

Tableau 1. Types, phénotypes et mécanismes d'action des différents lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺

a) Les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺

Les lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ peuvent inhiber l'activité effectrice des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que la fonction des NK, NKT, lymphocytes B, macrophages, ostéoclastes et cellules dendritiques (von Boehmer 2005) (Tang and Bluestone 2008) (Shevach, DiPaolo et al. 2006) (Miyara and Sakaguchi 2007). L'expression de CD25 n'est généralement pas détectable sur les lymphocytes T au repos et son expression est augmentée après exposition à un antigène et l'activation des lymphocytes T. Les lymphocytes T conventionnels activés expriment CD25 transitoirement, et à un niveau faible, mais il est facile de les confondre avec les lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺. Les recherches visant à identifier les marqueurs potentiels des Tregs sont très actives, on peut citer plusieurs marqueurs potentiels : CTLA4 (CD152), GITR (TNFRSF18), CD62L, CD45RB, CD122, CD103, CD127. Néanmoins ces marqueurs sont également exprimés par d'autres sous-groupes de lymphocytes T et ne permettent pas d'identifier précisément ces lymphocytes CD4⁺CD25⁺

Tregs. En 2003, le facteur de transcription FOXP3 (forkhead transcription factor) a été identifié comme le régulateur central du développement de ces Tregs. Néanmoins une proportion variable des lymphocytes Foxp3⁺ n'exprime aucun des marqueurs susnommés dont CD25 et peuvent être CD8⁺ (Fontenot, Rasmussen et al. 2005). De plus, chez l'Homme, les lymphocytes T deviennent Foxp3 positifs durant les premières étapes de l'activation.

Les données *in vitro* et *in vivo* permettent d'illustrer l'hétérogénéité des mécanismes d'action mis en jeu par ces lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ (Figure 16). Parmi ces mécanismes, plusieurs études ont mis en évidence l'importance des cytokines. Ainsi, le blocage de l'IL-10 empêche l'induction et la maintenance de la tolérance par les Tregs dans un modèle de greffe de peau (Kingsley, Karim et al. 2002) (Hara, Kingsley et al. 2001). Une étude portant sur un modèle de greffe de moelle osseuse suggère que ce sont les lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ qui sécrètent l'IL-10. L'inhibition de TGF- β bloque l'inhibition de la réponse aux alloantigènes médiée par ces lymphocytes Tregs (Josien, Douillard et al. 1998) (Bickerstaff, VanBuskirk et al. 2000) et les souris déficientes en TGF- β développent spontanément de l'autoimmunité (Gorelik and Flavell 2000). Le TGF- β semble intervenir directement sur les cellules sensibles à la suppression et/ou en maintenant l'expression de Foxp3 et l'activité suppressive des Tregs (von Boehmer 2005). Les lymphocytes Tregs Foxp3⁺ produisent également de grandes quantités d'IL-35, une interleukine possédant des propriétés immunosuppressives (Collison, Workman et al. 2007).

La consommation de cytokines par les Tregs peut être responsable de l'apoptose des lymphocytes T répondeurs (Pandiyana, Zheng et al. 2007). Les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ sont également capables de provoquer la surexpression de l'AMPc intracellulaire (Adénosine Monophosphate cyclique), un important second messager inhibiteur qui va empêcher la prolifération des lymphocytes T et la production d'IL-2 (Bopp, Becker et al. 2007). L'expression de CD39 et CD73 par les Tregs est capable de générer de l'adénosine péri-cellulaire, qui va se fixer au récepteur à adénosine 2A (RA_{2A}) des lymphocytes T et induire des effets immunosuppresseurs (Deaglio, Dwyer et al. 2007) (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007) (Kobie, Shah et al. 2006). La liaison à RA_{2A} est également capable de participer à la génération de lymphocytes T régulateurs en inhibant IL-6 et en favorisant la sécrétion de TGF- β (Zarek, Huang et al. 2008).

Les lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ peuvent également médier leur effet inhibiteur via des mécanismes cytolytiques. Chez l'Homme, les lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ peuvent induire la mort de leurs cellules cibles via le granzyme A et la perforine (Vignali 2008). Les Tregs isolés de souris granzyme B^{-/-} possèdent une activité suppressive réduite *in vitro* (Gondek, Lu et al. 2005). Les lymphocytes CD4⁺CD25⁺ Tregs peuvent également induire l'apoptose des lymphocytes B (Zhao, Thornton et al. 2006) et des cellules NK (Cao, Cai et al. 2007).

Les lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ peuvent affecter les lymphocytes T effecteurs indirectement en modifiant la fonction des CPA de plusieurs façons. *In vitro*, les Tregs peuvent induire la sous-expression des molécules de costimulation comme B7-1 et B7-2 (Josien, Douillard et al. 1998), les rendant moins aptes à activer les lymphocytes T (Taams, Boot et al. 2000). L'expression de

LAG3 (lymphocyte activation gene-3), exprimé par ces lymphocytes Tregs, peut inhiber les cellules dendritiques en interagissant avec le CMH-II (Liang, Workman et al. 2008). L'expression de l'enzyme IDO par les CPA peut être induite par les lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+$, via un mécanisme dépendant de CTLA4, et va provoquer le catabolisme du tryptophane en kynurénine pro-apoptotique, aboutissant à l'inhibition des lymphocytes T effecteurs (Fallarino, Grohmann et al. 2003).

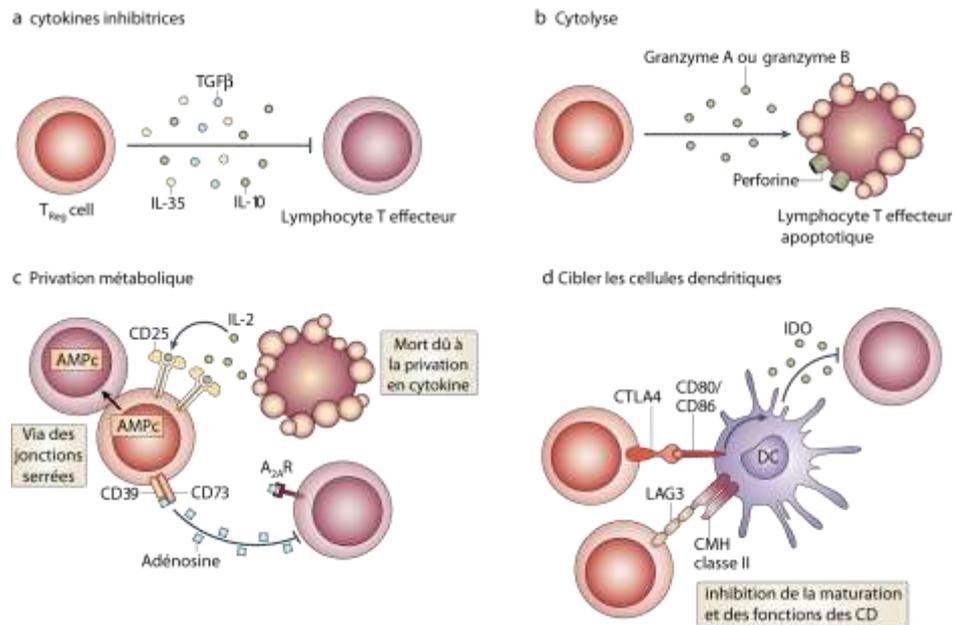


Figure 16. Les différents mécanismes suppresseurs des lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+$
D'après (Vignali 2008)

En 1990, Hall *et al* ont démontré que la survie à long terme d'une allogreffe cardiaque chez le rat traité à la ciclosporine pouvait être obtenue par un transfert adoptif de lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ (Hall, Pearce et al. 1990). D'autres travaux ont démontré que les lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ du receveur possédaient des propriétés régulatrices dans l'induction et la maintenance de la tolérance aux alloantigènes chez la souris (Kingsley, Karim et al. 2002) (Hara, Kingsley et al. 2001) (Sánchez-Fueyo, Weber et al. 2002) (Graca, Thompson et al. 2002). Les lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ se trouvent dans les tissus lymphoïdes du receveur après transplantation (Hara, Kingsley et al. 2001) où la réaction immune est induite, mais également dans le greffon c'est-à-dire le site d'action (Graca, Cobbold et al. 2002). Au laboratoire, des études chez des patients opérationnellement "tolérants" pour une greffe rénale ont montré que ces patients avaient des niveaux équivalents de Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ comparés à des patients sains, mais que les patients développant des lésions de rejet chronique avaient eux significativement moins de lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Louis, Braudeau et al. 2006). Ces lymphocytes Treg $CD4^+CD25^+$ sont donc étudiés avec beaucoup d'attention et un champ actif de la recherche vise à les induire ou à expandre les cellules régulatrices existantes (Taylor, Lees et al. 2002) (Zheng, Gray et al. 2002; Battaglia, Stabilini et al. 2005; Feng, Gao et al. 2008).

b) Les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ dans des modèles d'auto-immunité (Furtado, Olivares-Villagomez et al. 2001) (Stephens and Mason 2000). En transplantation, le transfert de ces cellules empêche le développement d'un rejet de greffe de peau chez la souris bien qu'elles soient dix fois moins efficaces à nombre de cellules équivalent que les lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ (Graca et coll. 2002b). L'analyse de l'expression des gènes des lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ et CD4⁺CD25⁻ après ligation du TCR montre peu de différence entre ces deux populations (Graca, Thompson et al. 2002). Une étude réalisée au laboratoire a également démontré la capacité des lymphocytes T CD25⁻ isolés d'un rat tolérant à une greffe cardiaque via un traitement TSD, à induire la survie à long terme du greffon des receveurs irradiés et nouvellement greffés (Degauque, Lair et al. 2007). Dans ce modèle, les lymphocytes T CD25⁻ d'animaux tolérants sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T CD25⁻ via un mécanisme dépendant du contact cellulaire et de facteurs solubles (IL-10 et IFN- γ). L'acquisition des capacités immunosuppressives de ces cellules pourrait être due à l'éducation des lymphocytes T CD25⁻ par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ (Dieckmann, Plottner et al. 2001) (Jonuleit, Schmitt et al. 2001). Graca *et al.* ont également montré que certains lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ pouvaient perdre l'expression de CD25 et conserver leurs propriétés immunorégulatrices et il a été démontré que les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ perdent leur marqueur CD25 après 5 divisions cellulaires mais restent capable de suppression (Gavin, Clarke et al. 2002).

c) Les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1)

In vitro, la stimulation antigénique de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en présence d'IL-10 génère des lymphocytes régulateurs de type 1 (Tr1) produisant les cytokines immunorégulatrices IL-10 et TGF- β et n'expriment pas Foxp3 (Groux, O'Garra et al. 1997; Cottrez, Hurst et al. 2000). *In vitro*, le surnageant des lymphocytes Tr1 activés rend les cellules dendritiques incapables d'induire une allostimulation (Roncarolo, Bacchetta et al. 2001). Ces lymphocytes Tr1 peuvent être induits par les cellules dendritiques plasmacytoïdes sécrétrices d'IL-10 (Wakkach, Fournier et al. 2003). Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ sont également capables d'induire le développement de lymphocytes Tr1 (Stassen, Fondel et al. 2004). De plus, des lymphocytes T CD4⁺ dérivés du sang de cordon ombilical et stimulés avec des cellules dendritiques immatures peuvent également se différencier en Tr1 (Jonuleit, Schmitt et al. 2000).

La première preuve que les lymphocytes Tr1 humains sont impliqués dans le maintien de la tolérance périphérique *in vivo* est venue d'études effectuées chez des patients SCID (severe combined immune deficiency) greffés avec succès avec des cellules souches allogéniques en absence d'immunosuppresseur. De forts taux d'IL-10 ont été détectés dans le plasma de ces patients, et l'isolation de lymphocytes T CD4⁺ alloréactifs a pu produire des quantités importantes d'IL-10 et de faibles quantités d'IL-2 après stimulation antigénique *in vitro* (Bacchetta, Bigler et al. 1994). Une autre étude a mis en évidence la production spontanée d'IL-10 par les cellules mononuclées du sang périphérique corrélée avec l'absence de réaction du greffon contre l'hôte et une survie prolongée de la

greffe de cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints de cancer (Weston, Geczy et al. 2006). Le développement spontané d'une tolérance à une allogreffe de rein ou de foie a été associé à la présence de cellules CD4⁺ capables de supprimer la réponse des lymphocytes T CD4⁺ naïves via la production d'IL-10 ou de TGF- β (VanBuskirk, Burlingham et al. 2000). Un essai clinique visant à induire des lymphocytes Tr1 pour empêcher la maladie du greffon contre l'hôte est en cours (Allan, Broady et al. 2008).

d) Les lymphocytes Th3

Weiner *et al* ont observé qu'en donnant de faibles doses de MBP (myelin basic protein) à des souris, celles-ci développaient un mécanisme de tolérance. Cette tolérance orale est liée à la différenciation de lymphocytes T dits Th3 sécrétant une grande quantité de TGF- β , de faibles quantités d'IL-10, mais pas d'IFN- γ ou d'IL-2 après activation. Ces lymphocytes Th3 sont ainsi capables de supprimer le développement de l'EAE de manière TGF- β dépendante (Weiner 2001). Cette tolérance orale est opérationnelle dans de nombreux autres modèles de maladies auto-immunes comme l'uvéïte, la thyroïdite, la myasthénie, l'arthrite, la colite inflammatoire, le diabète chez la souris NOD et peut intervenir dans d'autres maladies comme l'asthme, l'athérosclérose, l'allergie (Faria and Weiner). Ces cellules régulatrices sont capables d'inhiber la réponse immunitaire en supprimant l'induction des cellules effectrices Th1 et Th2 de manière non spécifique de l'antigène (effet « bystander ») via la sécrétion de TGF- β (Chen, Kuchroo et al. 1994).

Les lymphocytes Th3 et les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ peuvent interagir entre eux. Ainsi, les lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ exprimant l'intégrine α 4 β 1 induisent les lymphocytes Th3 (Stassen, Fondel et al. 2004). De plus, la sécrétion de TGF- β par les lymphocytes Th3 induit l'expression de Foxp3 dans les lymphocytes T activés pendant leur expansion. Ceci aboutit à la différenciation de cellules CD4⁺CD25⁺ en périphérie. Les Th3 semblent donc jouer un rôle important dans la tolérance immune par leurs effets directs et indirectement par l'induction de lymphocytes T régulateurs CD4⁺. En transplantation, les lymphocytes Th3, en sécrétant le TGF- β , jouent un rôle dans l'induction de la tolérance par transfusion du sang du donneur, en effet les greffons de ces animaux expriment de grandes quantités de TGF- β et le traitement de l'animal greffé par un anticorps anti-TGF- β empêche l'induction de la tolérance (Josien, Douillard et al. 1998).

Les lymphocytes T CD8⁺ régulateurs

e) Les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻

Des lymphocytes T suppresseurs CD8⁺CD28⁻ capables d'inhiber les cellules T CD4⁺ de manière spécifique de l'alloantigène peuvent être générés via une allostimulation répétée *in vitro* (Jiang, Kashleva et al. 1998) (Liu, Tugulea et al. 1998) (Filaci, Fravega et al. 2004). Cette action suppressive n'est pas obtenue par interaction directe avec les lymphocytes T CD4⁺ ni par la sécrétion de cytokines. En fait, ces lymphocytes agissent directement sur les CPA en induisant la surexpression des récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4. De plus les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ diminuent l'expression des molécules costimulatrices par les CPA qui deviennent alors tolérogènes et incapables de stimuler

effectivement les lymphocytes T CD4⁺ alloréactifs (Chang, Ciubotariu et al. 2002) (Manavalan, Rossi et al.). De plus, ces CPA tolérogènes peuvent induire la différenciation de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ et l'expansion des cellules régulatrices CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ (Manavalan, Kim-Schulze et al. 2004). Ces lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ expriment GITR, CTLA4, Foxp3 et de grandes quantités de transcrits de récepteurs KIR (killer cell immunoglobulin-related receptors) (Liu, Tugulea et al. 1998). *In vivo*, les souris CD28^{-/-} déplétées en lymphocytes T CD8⁺ et les souris double KO CD8^{-/-}CD28^{-/-} sont susceptibles à l'EAE (Najafian, Chitnis et al. 2003).

Dans un modèle de greffe de foie chez le rat, un traitement TSD peut induire des lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ capables de prévenir le rejet aigu, mais pas le rejet chronique (Liu, Chen et al. 2007). Chez l'Homme, la présence de ces lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ a été détectée dans le sang périphérique de patients ayant reçu une greffe de cœur, de rein ou de foie (Ciubotariu, Vasilescu et al. 2001). Dans cette étude, les auteurs décrivent une corrélation inverse entre la présence de lymphocytes T suppresseurs et l'incidence du rejet aigu chez ces patients. Il a également été démontré, lors de greffes foie et rein/foie, que les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ étaient présents chez les patients qui avaient arrêté leur traitement immunosuppresseur avec succès, et au contraire absents chez 3 des 4 patients ayant rejeté leur greffon (Sindhi, Manavalan et al. 2005). De la même manière, des lymphocytes Treg CD8⁺CD28⁻ ont pu être isolés de patients ayant reçu une greffe cardiaque et n'ayant pas eu d'épisode de rejet (Chang, Ciubotariu et al. 2002).

f) Les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ +

Les lymphocytes T présentant le corécepteur homodimérique CD8 $\alpha\alpha$ + et le TCR $\alpha\beta$ + représentent une faible proportion (<1%) des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques et la rate mais représentent une grande proportion (40%) des lymphocytes intestinaux (LII) à côté des lymphocytes T CD4⁺ et CD8 $\alpha\beta$ + (Rocha, Vassalli et al. 1991). Ces lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + sont Foxp3 négatifs (Tang, Maricic et al. 2006) et présentent un répertoire TCR oligoclonal (Brimnes, Allez et al. 2005; Tang, Maricic et al. 2007). Par exemple, dans, un modèle d'EAE, les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + ont un TCR exprimant majoritairement le V β 6 et sont restreints au peptide Qa-1 (CMH de classe Ib, HLA-E chez l'Homme) (Tang, Maricic et al. 2007). Inversement, des souris déficientes pour Qa-1 ou pour les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + développent les symptômes de l'EAE. Les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + peuvent être amplifiés *in vivo* en injectant un anticorps monoclonal anti-TCR V β 6, aboutissant au contrôle de l'EAE et ces données suggèrent que les lymphocytes T CD8⁺ restreints au Qa-1 jouent un rôle important dans la protection contre le développement de cette maladie (Jiang, Zhang et al. 1992) (Koh, Fung-Leung et al. 1992) et dans le maintien de la tolérance périphérique (Hu, Ikizawa et al. 2004). La restriction du TCR pourrait venir de leur rôle dans le contrôle de l'auto-réactivité immune (Lambolez, Kronenberg et al. 2007).

Ces lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + ciblent préférentiellement les lymphocytes T activés. Dans un modèle murin, ces cellules sont capables de tuer les lymphocytes V β 8.2+ activés mais pas les cellules naïves ou V β 8.2- (Jiang, Tugulea et al. 1998; Tang, Maricic et al. 2006). L'activation des lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + est également nécessaire à leur fonction régulatrice (Kumar 2004; Tang, Maricic et al.

2006) (Rifa'i, Kawamoto et al. 2004) (Jiang, Tugulea et al. 1998; Panoutsakopoulou, Huster et al. 2004). Il a été suggéré que ces lymphocytes sont activés *in vivo* par les cellules dendritiques ayant endocytosé des lymphocytes T apoptiques et apprêtés des peptides dérivés du TCR dans le contexte des molécules de classe Ib aux lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + (Kumar 2004). Dans un modèle murin d'EAE, les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + nécessitent l'aide de lymphocytes T CD4⁺ V β 14+ (Kumar 2004) (Kumar and Sercarz 1993) (Jiang, Braunstein et al. 2001). Cependant cette restriction des lymphocytes T CD4 est sans doute dépendante du système expérimental et ne peut être généralisée, il n'est donc pas certain que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires soient nécessaires à la fonction des lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + dans d'autres systèmes. La capacité de ces cellules à sécréter de l'IL-10 reste discuté. Un transfert adoptif de CD8 $\alpha\alpha$ + LII provenant de souris IL-10^{+/+}, mais pas de souris IL-10^{-/-}, induit la diminution d'une colite chez la souris receveuse lymphopénique (Poussier, Ning et al. 2002). Néanmoins, deux autres études n'ont pu déterminer d'augmentation des transcrits ARNm *IL-10* dans ces cellules (Madakamutil, Maricic et al. 2003) (Griffith, Kazama et al. 2007). Une étude par puce à ADN a montré que ces cellules surexpriment un grand nombre de récepteurs des NK, surtout inhibiteurs, suggérant la possibilité de classer ces cellules parmi les cellules NKT (Denning, Granger et al. 2007).

g) Les lymphocytes T CD8⁺ CD122⁺

Le CD122 représente la chaîne β du récepteur à l'IL-2/IL-15. Les lymphocytes T CD8⁺ CD122⁺ sont des lymphocytes T régulateurs naturels présents chez la souris naïve. *In vivo*, chez la souris CD122^{-/-}, les lymphocytes T activés prolifèrent de manière incontrôlée, aboutissant à la mort des souris 3-4 mois après leur naissance (Suzuki, KÅndig et al. 1995; Rifa'i, Kawamoto et al. 2004). De plus, le transfert adoptif de cellules CD8⁺CD122⁺ chez ces souris CD122^{-/-} permet d'éviter le développement anormal des lymphocytes T (Rifa'i, Kawamoto et al. 2004) et protège de l'EAE (Lee, Ishida et al. 2008). La déplétion de ces cellules dans un modèle murin de thyroïdite auto-immune, la maladie de Graves, augmente au contraire l'incidence de la maladie (Saitoh, Abiru et al. 2007).

Des expériences *in vitro* ont démontré qu'après activation, ces cellules sécrètent de l'IL-10 et sont capables de supprimer la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Rifa'i, Kawamoto et al. 2004). Ainsi, en absence d'IL-10, que ce soit à l'aide d'anticorps bloquant anti-IL-10 ou en utilisant des souris IL-10^{-/-}, ces cellules perdent leurs propriétés immunorégulatrices *in vitro* et sont moins efficaces *in vivo* (Endharti, Rifa'i et al. 2005). Des expériences bloquant les contacts cellulaires ont démontré que les molécules H-2k, H-2D, TCR $\alpha\beta$ et CD8 sont nécessaires aux mécanismes suppresseurs des lymphocytes T CD8⁺CD122⁺, contrairement à Qa-1, démontrant que ces cellules interagissent via le CMH de classe I avec le TCR $\alpha\beta$ afin d'acquérir leur pouvoir régulateur. De la même manière, il a été montré que ces lymphocytes T CD8⁺CD122⁺ nécessitent des molécules CD80, CD86 et CD28 mais pas CTLA4, ICOS et PD-1, démontrant l'importance du signal de costimulation CD28/B7 dans l'activation de ces lymphocytes T suppresseurs (Shi, Rifa'i et al. 2008). Les lymphocytes T CD8⁺CD122⁺ peuvent inhiber la prolifération de lymphocytes de souches syngéniques mais pas de lymphocytes provenant de souches allogéniques de souris *in vitro* (Rifa'i,

Shi et al. 2008). Ce phénomène pourrait être dû à la restriction du répertoire des ces lymphocytes T régulateurs.

h) Les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}

Après avoir rencontré leurs antigènes, les lymphocytes T perdent l'expression du CD45 pour adopter un phénotype mémoire. En fonction de l'espèce, on distingue plusieurs isoformes de CD45, caractérisées par les domaines extracellulaires: CD45RA pour l'humain, CD45RB chez la souris ou CD45RC chez le rat. En 1998, Yamaguchi *et al.* ont suggéré que l'infiltration de cellules CD4⁺CD45RC⁻ et CD8⁺CD45RC⁻, capables de sécréter des cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-10), pourrait prévenir le rejet d'allogreffe dans un modèle de TSD (Yamaguchi, Miyanari et al. 1998). En 2004, Xystrakis *et al.* ont montré l'existence chez le rat, dans un modèle de GVHD, de lymphocytes T CD8⁺ régulateurs identifiables par un phénotype CD45RC^{low} (Xystrakis, Cavailles et al. 2004). Ces lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} ne présentent pas de propriété cytotoxique, produisent les cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10, IL-13), expriment Foxp3, CTLA4 et GITR (Xystrakis, Dejean et al. 2004), et inhibent l'expansion des cellules effectrices CD4⁺ Th1. Dans cette étude, les auteurs montrent également que ces cellules nécessitent des contacts cellulaires directs pour leur effet suppresseur. L'importance de cette population a également été mise en avant dans un modèle expérimental d'uvéite auto-immune où la diminution de l'activité suppressive des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} est corrélée avec le développement de la maladie (Han, Shao et al. 2007).

Au laboratoire, nous avons démontré que dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L par CD40-Ig prévient le rejet aigu (mais pas le rejet chronique) via l'induction de lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonau, Hill et al. 2007). Les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} d'animaux tolérants sont capables de transférer cette tolérance, contrairement aux lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} naturels. Il a déjà été démontré que les interactions entre cellules dendritiques et lymphocytes T, en l'absence d'interaction CD40/CD40L, entraînent une la tolérisation des lymphocytes T CD8⁺ (Albert, Jegathesan et al. 2001; Grohmann, Fallarino et al. 2001; Martin, O'Sullivan et al. 2003). Dans le modèle de Guillonau *et al.*, les lymphocytes Tregs CD8⁺ induisent une suppression locale en sécrétant de l'IFN- γ qui induit la synthèse d'IDO par les cellules endothéliales du greffon (Figure 17)(Guillonau, Hill et al. 2007). L'enzyme IDO dégrade le tryptophane dans la voie kynurénine et peut induire l'apoptose des lymphocytes T ou leur anergie (Mellor and Munn 2004). En plus de Foxp3, IL-10, GITR précédemment décrits, ces cellules sont capables de surexprimer le TGF- β , l'IL-2, CD25 et CD28. La co-administration de CD40-Ig et d'un anticorps anti-CD28 dans ce modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat induit une survie indéfinie du greffon et l'absence de rejet chronique chez 60% des animaux (Guillonau, Seveno et al. 2007). Néanmoins, l'administration d'anti-CD28 abroge l'induction de lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes et, même si ces cellules sont CD28⁻, il est possible qu'elles soient générées à partir de cellules CD28⁺, et que l'utilisation d'un anti-CD28 abroge l'acquisition de leurs propriétés régulatrices. La caractérisation des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes induits par CD40-Ig constitue est un des sujets de cette thèse.

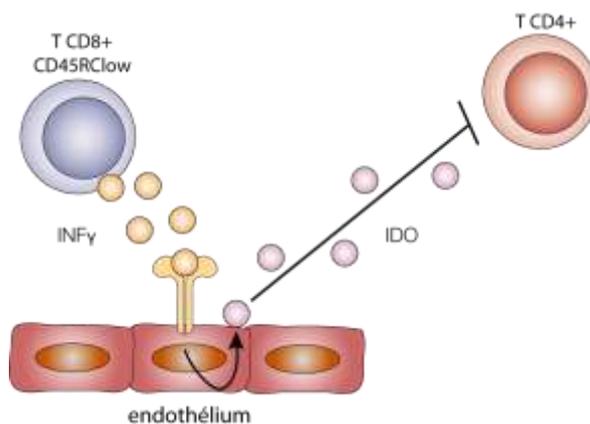


Figure 17. Mécanisme de suppression présumé des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} chez les rats traités par un adénovirus rat CD40-Ig

i) Les lymphocytes T CD8⁺CD11c⁺

CD137, un membre de la superfamille des récepteurs au TNF est exprimé par les lymphocytes T activés, et la liaison à son ligand CD137L fournit un signal de costimulation. L'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD137 agoniste supprime l'arthrite auto-immune dans un modèle murin via la génération de lymphocytes Tregs CD8⁺CD11c⁺ produisant de l'IFN- γ (Seo, Choi et al. 2004). Les auteurs ont reproduit ces résultats dans un modèle murin d'uvéorétinite en démontrant que les cellules dendritiques de ces souris inhibent les lymphocytes T CD4⁺ via la sécrétion de l'enzyme IDO. De plus, l'effet de l'anticorps anti-CD137 est aboli par un traitement anti-IFN- γ ou le 1-MT (inhibiteur d'IDO) (Choi, Asai et al. 2006). Les propriétés de ces lymphocytes T régulateurs semblent donc proches des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes induits par CD40-Ig.

Les autres types de lymphocytes T régulateurs

j) Les lymphocytes T CD3⁺CD4⁻CD8⁻

Les propriétés régulatrices des lymphocytes T CD3⁺CD4⁻CD8⁻ doubles négatifs (DN) ont été mises en évidence dans un modèle de greffe de peau chez la souris associée à un traitement TSD (Zhang, Yang et al. 2000). Elles ont également été identifiées chez l'Homme (Fischer, Voelkl et al. 2005). Ces cellules représentent 1 à 5% des lymphocytes périphériques chez l'Homme et 1 à 2% chez les rongeurs (Zhang, Yang et al. 2000). Les lymphocytes T DN requièrent une stimulation antigénique pour acquérir leur phénotype supresseur (Zhang, Yang et al. 2000) (Ford, Young et al. 2002; Young, Yang et al. 2002). Ces cellules n'expriment pas la molécule de costimulation CD28 et, après activation, possèdent un profil d'expression de cytokines particulier, constitué de l'IFN- γ et du TNF- α ainsi que de faibles quantités de TGF- β mais pas d'IL-2, IL-4, IL-10 ou IL-13 (Zhang, Yang et al. 2000). Elles peuvent être activées *in vitro* par des splénocytes allogéniques et prolifèrent en présence d'IL-2 et IL-4 (Khan, Penninger et al. 1999). Contrairement aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ces cellules ne sont pas sensibles à l'AICD *in vitro* et *in vivo* (Khan, Penninger et al. 1999;

Marra, Zhang et al. 2004). Néanmoins, en présence d'IL-10 *in vitro*, les lymphocytes T DN perdent cette capacité à résister à l'apoptose (Zhang, Stanford et al. 2002; Marra, Zhang et al. 2004), ce qui suggère que cette cytokine régule l'activité des lymphocytes T DN *in vivo*. Ces cellules sont capables d'acquiescer les alloantigènes couplés au CMH présents à la surface des CPA par un mécanisme de trogocytose (Zhang, Yang et al. 2000) (Ford McIntyre, Young et al. 2008). Cette propriété permet de définir l'identité de la cellule inhibée. En effet, ces cellules peuvent tuer directement les lymphocytes T avec qui elles rentrent en contact via une interaction Fas/FasL, démontré par le fait qu'un anticorps anti-FasL abroge la fonction inhibitrice des lymphocytes Treg (Zhang, Yang et al. 2000).

Les lymphocytes T DN sont capables d'inhiber une réaction lymphocytaire mixte (Matsuo, Herndon et al. 1997). En transplantation, les lymphocytes T DN sont capables de prolonger la survie d'allogreffe de peau et de cœur (Chen, Ford et al. 2003) chez la souris. Ces cellules peuvent inhiber le développement d'une réaction du greffon contre l'hôte (Young, DuTemple et al. 2003). L'existence d'une corrélation entre la fonction et la localisation de ces lymphocytes T DN a été démontrée : leur activité suppressive apparaît plus importante au sein du greffon que dans la rate, démontrant leur capacité régulatrice systémique au niveau du système lymphatique mais surtout local, au niveau du greffon. Ces cellules sont également capables d'inhiber le rejet de greffe de moelle osseuse médié par les cellules NK (He, Ma et al. 2007).

k) Les lymphocytes NKT

Les lymphocytes NKT représentent une sous-population de lymphocytes $T\alpha\beta$ exprimant des marqueurs des cellules NK comme le CD161 ou NKRP-1, et ayant un TCR monomorphe : $V\alpha 14J\alpha 281V\beta 8$ chez la souris et $V\alpha 24J\alpha QV\beta 11$ chez l'Homme (Kronenberg 2005). Ces lymphocytes NKT reconnaissent les cellules exprimant des antigènes du soi lipidiques sur les molécules de CMH de classe Ib CD1d (Bendelac, Rivera et al. 1997). Elles représentent moins de 0,1% des cellules lymphocytaires du sang périphérique chez l'Homme.

Les lymphocytes NKT jouent un rôle important dans le contrôle de nombreuses maladies auto-immunes (Hong, Wilson et al. 2001) en sécrétant des cytokines de type Th2 comme l'IL-4 et l'IL-10 après activation (Mitchell Kronenberg 2005). Elles peuvent également réguler les lymphocytes T $CD8^+$ via la sécrétion d'IL-13 (Terabe, Matsui et al. 2000). D'un autre côté, les cellules NKT peuvent avoir une activité anti-tumorale en sécrétant rapidement de l'IFN- γ (Mitchell Kronenberg 2005).

En transplantation, les lymphocytes NKT sont capables de prévenir la réaction du greffon contre l'hôte après une transplantation de moelle osseuse allogénique (Zeng, Lewis et al. 1999). Ces cellules sont également nécessaires à l'induction de la tolérance par blocage des voies de costimulation CD28/B7 et du corécepteur LFA-1/ICAM1 en allogreffe cardiaque chez la souris (Seino, Fukao et al. 2001). En effet, la tolérance n'a pu être obtenue chez des souris déficientes en lymphocytes NKT $V\alpha 14+$, alors que le transfert de ces cellules a permis de restaurer la tolérance. D'autres expériences ont mis en évidence l'importance de ces lymphocytes NKT dans des modèles de greffes de peau (Oh, Kim et al. 2005), de cornée (Sonoda, Taniguchi et al. 2002) ou de foie (Kiyomoto, Ito et al. 2005). Cependant, dans un modèle de greffe d'îlots dans le foie, il a été démontré que les lymphocytes NKT jouaient un rôle dans le rejet aigu via la production d'IFN- γ (Yasunami, Kojo et al. 2005; Toyofuku, Yasunami et al. 2006). Ces contradictions montrent l'importance de caractériser les mécanismes régulateurs des lymphocytes NKT avant de pouvoir les utiliser en thérapie.

l) Les lymphocytes $T\gamma\delta$

Chez l'Homme sain, 1-10 % des lymphocytes T du sang périphérique portent un TCR alternatif composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ . La majorité de ces cellules sont $CD4^-CD8^-$ « double négatives ». Comme les lymphocytes $T\alpha\beta$, les lymphocytes $T\gamma\delta$ activés peuvent disposer de différents mécanismes cytotoxiques (Fas/Fas-L, perforin/granzyme...) et sécréter des cytokines Th1 comme l'IFN- γ et le TNF- α (Garcia, Sieling et al. 1997; Wang, Kamath et al. 2001) ou Th2 comme l'IL-4 (Spinozzi, Agea et al. 1995). À la différence des lymphocytes $T\alpha\beta$, le répertoire $V\gamma$ et $V\delta$ est restreint et permet de définir différents sous-groupes de lymphocytes $T\gamma\delta$ reconnaissant chacun un motif défini (Holtmeier and Kabelitz 2005). Ces lymphocytes $T\gamma\delta$ se distinguent également des lymphocytes $T\alpha\beta$ par leur capacité à reconnaître les antigènes sur les CPA sans qu'ils ne soient présentés par les molécules classiques du CMH I ou II (Brenner, McLean et al.; Shin, El-Diwany et al. 2005). D'autre part, après activation, les cellules $T\gamma\delta$ augmentent leur expression du CMH de classe II et des

molécules de costimulation, leur permettant de développer des capacités de présentation (Lanzavecchia, Abrignani et al. 1988; Collins, Werling et al. 1998). D'un autre côté, ces cellules peuvent avoir des effets régulateurs. Ainsi, les souris $T\gamma\delta^{-/-}$ montrent une réponse immune accélérée dans des modèles non-infectieux (Peng, Madaio et al. 1996) et dans un modèle expérimental d'auto-immunité épidermale médié par les lymphocytes $T\alpha\beta$.

Les mécanismes utilisés par les lymphocytes $T\gamma\delta$ dans l'immunorégulation sont encore mal définis. Ces cellules peuvent réguler le système immunitaire en tuant directement les cellules effectrices ou les cellules présentatrices d'antigène via le système Fas/FasL. L'inhibition du TLR8 (Toll Like Receptor 8) des lymphocytes $T\gamma\delta$ par un siRNA inhibe leur propriété régulatrice *in vivo* et montre l'importance de la voie de signalisation liée au TLR8 dans ces lymphocytes $T\gamma\delta$ (Peng, Wang et al. 2007). Elles peuvent exprimer de l'IL-10 ou du TGF- β . Ces cellules expriment de forts taux de thymosin- β 4 (Tb4) un agent anti-inflammatoire (Girardi, Sherling et al. 2003). Ces cellules peuvent également produire le keratinocyte growth factor (KGF) pouvant réparer le tissu épithélial (Jameson, Ugarte et al. 2002), qui fournira une barrière physique à l'infiltration. Elles peuvent également induire l'expression de FasL sur les cellules épithéliales stressées via l'IFN- γ ; FasL, induisant l'apoptose des cellules infiltrant le tissu.

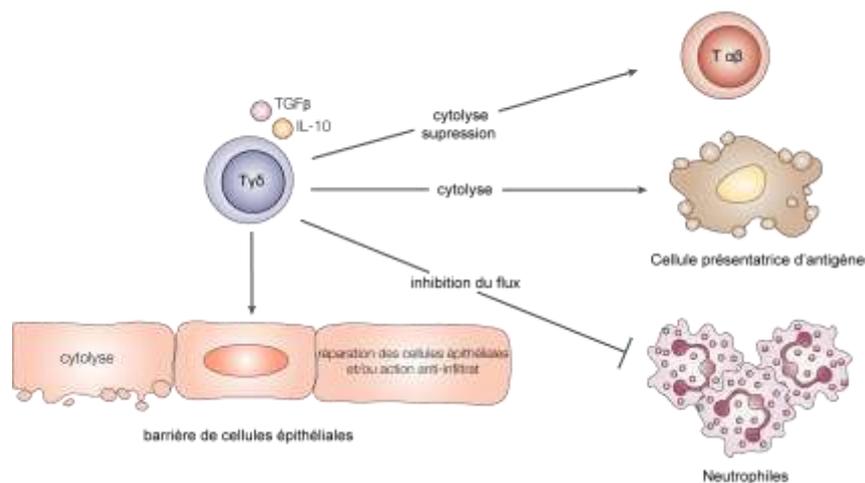


Figure 18. Mécanismes suppresseurs des lymphocytes $T\gamma\delta$

D'après (Hayday and Tigelaar 2003)

Des lymphocytes $T\gamma\delta$ activés *ex-vivo* sont capables de prévenir de façon significative le rejet d'une greffe de moelle sans induire de GVHD dans un modèle murin (Drobyski and Majewski 1997). De plus, cette capacité de prévenir le rejet d'allogreffe de moelle osseuse n'est pas affectée par l'absence des mécanismes cytotoxiques FasL ou perforine (Vodanovic-Jankovic and Drobyski 2006).. Ces lymphocytes jouent un rôle important dans la déviation immune associée à la chambre antérieure de l'œil après une allogreffe de cornée en facilitant la génération de lymphocytes Tregs via la sécrétion d'IL-10 (Ashour and Niederkorn 2006) et sont également capables de participer à la maintenance d'une allogreffe rénale chez l'Homme (Malan Borel, Racca et al. 2003).

Les lymphocytes T régulateurs utilisent de nombreux mécanismes pour réguler la fonction immunitaire. Parmi les différentes populations de Tregs, l'inhibition via des cytokines immuno-régulatrices telles que l'IL-10 ou le TGF- β semble constituer le mécanisme le plus transversal. L'IFN- γ joue un rôle plus complexe mais déterminant pour certaines populations. Les lymphocytes Tregs peuvent également tuer directement leur cible via FasL, la perforine, mais de nombreux mécanismes sont indirects et utilisent la privation métabolique, la destruction des cellules dendritiques, l'induction de la production d'IDO ou l'induction d'une barrière épithéliale afin de réduire l'infiltrat. Il faut également indiquer que certaines populations de lymphocytes Tregs semblent interagir entre elles. Certaines populations reconnaissent directement leur peptide sans qu'il soit présenté par une molécule du CMH, d'autres ne reconnaissent leur peptide que s'il est présenté par une molécule du CMH particulière. Cette liste n'est pas exhaustive et montre bien la richesse de la réponse immunitaire. De nombreuses études visent à induire des lymphocytes Tregs et à promouvoir leur expansion afin d'obtenir une tolérance vis-à-vis du greffon. Parmi les techniques disponibles pour analyser les mécanismes et promouvoir la tolérance à l'allogreffe, le transfert de gène est un outil remarquable.

5. Le transfert de gène

5.1. Présentation

Le transfert de gène permet d'apporter à la cellule un gène étranger codant pour une protéine déterminée. Ce principe simple possède de nombreuses applications :

	Approche	Application
A	Remplacer un gène déficient par l'ADN complémentaire correspondant fonctionnel	Maladie monogénique (mucoviscidose, myopathies...)
B	Introduction d'un gène conduisant à la mort (directe ou indirecte) d'une cellule malade	Cas des cellules cancéreuses insensibles à un médicament donné Utilisation d'une cellule effectrice que l'on veut pouvoir contrôler
C	Stimuler une réponse immunitaire	Immunothérapie des cellules cancéreuses
D	Ajouter un gène pour produire une protéine thérapeutique	Les cellules cibles vont sécréter la protéine d'intérêt thérapeutique. Application : Hémophilie, beta-thalassémie, anémie... Vaccination par immunisation génétique
E	Étudier la fonction d'un gène	Transgénèse
F	Gene farming	Production de molécules pharmaceutiques par des cellules/animaux

Tableau 2. Le transfert de gène: approches et applications

Les applications du transfert de gène en clinique (Section A-D du Tableau 2) sont du domaine de la thérapie génique qui peut être plus généralement abordée de deux manières : l'apport de gène comme médicament ou la réparation du gène déficient. Dans ce contexte, le transfert de gène peut se faire *in vivo* directement chez le patient ou *ex vivo* en apportant le gène à des cellules prélevées au

patient qui seront ensuite réinjectées. Depuis le premier essai clinique en 1989, plus de 1200 essais ont été approuvés (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). À l'origine, la thérapie génique s'adressait plutôt au traitement des maladies monogéniques héréditaires où la fonction d'un seul gène est en cause (mucoviscidose, hémophilie...) mais le concept s'est rapidement étendu aux maladies polygéniques (cancers, maladies neurodégénératives, maladies infectieuses, maladies auto-immunes) et aux maladies vasculaires et infectieuses. Aujourd'hui, plus de 66% des essais cliniques en cours concernent le traitement des cancers contre 8% pour les maladies monogénétiques (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>).

Le transfert de gène possède plusieurs avantages face à l'utilisation de protéines recombinantes thérapeutiques (protéothérapie). Tout d'abord, la thérapie génique permet d'éviter la production à grande échelle de ces protéines recombinantes, ce qui constitue un avantage financier majeur. Ces protéines recombinantes sont rapidement absorbées ou dégradées dans l'organisme et nécessitent des injections répétées à forte dose, contrairement au transfert de gène qui permet une couverture thérapeutique constante (Figure 19). De plus, si la protéine déficiente est intracellulaire, il est impossible d'administrer la protéine recombinante à l'intérieur de la cellule. La production du transgène peut être localisée, ce qui diminue les risques d'effets secondaires liés à la présence systémique de la protéine, dont l'immunisation. Théoriquement, l'administration unique du transgène et l'utilisation d'un système de régulation de son expression fait qu'il est mieux toléré par l'organisme que dans le cas d'une administration quotidienne ou pluriquotidienne comme c'est le cas actuellement pour l'insuline dans le traitement du diabète.

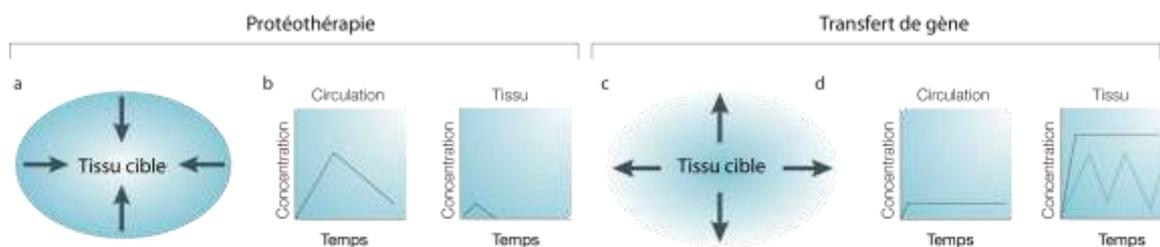


Figure 19. Différences pharmacologiques entre la protéothérapie et le transfert de gène

D'après (Chernajovsky, Gould et al. 2004)

a) De par son mode d'administration, la protéothérapie induit une concentration décroissante de protéines injectées entre le sang et l'organe cible. **b)** Ainsi, la forte concentration sanguine de l'agent thérapeutique après son administration diminue rapidement en raison de son absorption et sa dégradation. Le niveau résultant dans le tissu malade peut ne pas être suffisant pour un effet thérapeutique à long terme, la protéine doit être administré fréquemment et à forte concentration. **c)** Le transfert de gène permet d'obtenir une forte concentration locale par administration directe au niveau du tissu ciblé ou par des cellules manipulées *ex vivo* implantées localement. **d)** Les molécules thérapeutiques exprimées par les cellules modifiées sont concentrées localement. De plus, un système de régulation transcriptionnel peut être utilisé (en vert, sur le diagramme) pour contrôler de façon précise l'expression du gène.

Le transfert d'un gène au sein d'une cellule peut se faire soit en utilisant de l'ADN nu, soit en utilisant un vecteur (viral ou non viral). Mais avant de décrire les différentes techniques de transfert de gène, il est important de présenter les différentes étapes voies d'administration de l'ADN/vecteur.

5.2. Voies d'administration

5.2.1. Injection locale

L'administration locale dans le tissu cible permet de concentrer le vecteur/ADN et d'éviter sa dégradation (notamment par les nucléases du plasma pour l'ADN nu). La zone d'administration est bien ciblée, mais il est difficile de traiter une grande zone tissulaire sans effectuer de nombreuses injections ou utiliser de grands volumes. Cette technique est aisément utilisable pour les cellules facilement accessibles comme les cellules de la peau ou des muscles mais est plus complexe à mettre en place pour les cellules des organes comme le foie, le pancréas, la rate... De plus, la solution injectée ne se distribue pas toujours de manière homogène dans le tissu et certaines zones peuvent ne pas être transfectées. Les paramètres jouant sur l'efficacité de cette voie d'administration sont la vitesse, le volume, pression, la concentration en acides nucléiques et la composition de l'excipient (pH, osmoticité...).

5.2.2. Injection intraveineuse

Cette voie d'administration consiste à injecter le vecteur/ADN dans le réseau vasculaire. La solution injectée va alors circuler dans tout l'organisme, à l'exception des organes situés dans un compartiment isolé du système sanguin général comme le cerveau (barrière hémato-encéphalique) ou les yeux (barrière hémato-oculaire). Une seule injection permet d'atteindre la circulation générale, il n'est donc pas nécessaire d'utiliser la chirurgie pour atteindre les tissus internes et la distribution du vecteur/ADN est homogène au niveau systémique. D'un autre côté, il est difficile de cibler les cellules atteintes, ce qui peut poser des problèmes de toxicité pour les organes non ciblés. Dans le cas de l'ADN nu, une fois dans la circulation, celui-ci peut être rapidement dégradé (Mahato, Takakura et al. 1997). Dans certaines pathologies comme les ischémies, les cellules cibles sont mal irriguées et sont plus difficiles à atteindre. Le fait que la solution injectée soit diluée dans la circulation sanguine peut poser un problème car le vecteur/ADN va être dilué et perdre en efficacité. Le temps entre l'injection et la rencontre de la cellule cible est également un facteur essentiel et va dépendre du site d'injection. Comme dans le cas des injections locales, les paramètres influant l'efficacité sont la vitesse, la pression, le volume, la concentration et la composition de l'excipient.

Afin de réduire certains inconvénients de l'injection systémique, il est possible de pratiquer une injection systémique « locale », c'est-à-dire directement dans les vaisseaux afférents au tissu cible en posant un clamp sur les veines afférentes (Budker, Zhang et al. 1998). On réduit ainsi les problèmes liés au volume, à la latence entre le temps d'injection et la rencontre de la cellule cible.

5.2.3. Autres voies d'administrations

La voie orale : La solution contenant le vecteur/ADN peut être ingérée et va se retrouver dans l'estomac ou l'intestin. L'épithélium de l'intestin est un tissu bien vascularisé et va pouvoir sécréter la protéine d'intérêt dans la circulation. De plus, l'intestin partage plusieurs voies enzymatiques avec le

foie; la voie gastrointestinale semble donc appropriée pour les maladies liées à certains désordres métaboliques d'origine hépatique (Foreman, Wainwright et al. 1998; Rothman, Tseng et al. 2005).

La voie transdermale : La solution contenant l'ADN peut être appliquée sous forme de pommade et être résorbée par la peau pour passer dans le sang. Il est aussi possible d'appliquer un courant électrique de faible intensité pour faciliter la pénétration (iontophorèse). L'efficacité de ces systèmes transdermiques reste limitée dans le transfert de gène (Cemazar, Golzio et al. 2006).

La voie aérienne : La solution contenant le vecteur/ADN est inhalée pour pénétrer dans les poumons. La taille des gouttes inhalées détermine la profondeur atteignable dans les poumons (les petites gouttes se distribuent mieux). C'est la méthode de choix pour transférer un gène dans les cellules pulmonaires (Bellon, Calmard et al. 1996; Densmore 2006).

5.3. Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont des virus recombinants dérivés de virus sauvages rendus incapables de se répliquer et où une partie du génome a été remplacée par le transgène codant pour la molécule d'intérêt. L'efficacité du transfert de gène proprement dit dépend d'une part de l'interaction du virus avec les récepteurs cellulaires et d'autre part du devenir de l'ADN transféré dans la cellule. Le type de virus utilisé pour une stratégie donnée de transfert de gène est déterminé par le tropisme du virus, sa capacité à s'intégrer ou non dans le génome de l'hôte, la taille du transgène intégrable (insert), son immunogénicité et sa toxicité potentielle (tableau 3). Les vecteurs viraux utilisés en transfert de gène sont dérivés des rétrovirus (incluant les lentivirus), des adénovirus, des virus adéno-associés (AAV), ou des virus herpès simplex (HSV).

Type de virus		Taille de l'insert	Infection les cellules quiescentes	Intégration	Immunogénicité
Rétrovirus	MoMuLV	7-8 kb	-	+	+
	SIH/HIV	7-8 kb	+	+	+
Adénovirus		30 kb	+	-	++
AAV		4,6 kb	+	+/-	++
HSV		20-30 kb	+	-	++

Tableau 3. Types et caractéristiques des virus recombinants utilisés en transfert de gènes

MoMuLV : Moloney Murine Leukaemia Virus. SIH : Simian Immunodeficiency Virus

5.3.1. Les rétrovirus

a) Présentation

Il existe trois sous-groupes de rétrovirus : les oncorétrovirus (ex Moloney Murine Leukaemia Virus ou MoMLV), les lentivirus (ex : HIV) et les spumavirus. Le génome du provirus peut s'intégrer au génome de la cellule infectée de façon stable et sera transmis au génome des cellules filles. Ainsi, environ 1% du génome humain est constitué de séquences rétrovirales endogènes inscrites dans les cellules germinales et héritées (Nelson, Carnegie et al. 2003). De plus, les rétrovirus peuvent

incorporer des gènes modifiés dans la cellule et entraîner des transformations néoplasiques, interférer avec les fonctions cellulaires normales ou induire la mort. Les rétrovirus sont ainsi responsables de nombreuses maladies comme des leucémies, des tumeurs, des désordres neurologiques et le SIDA.

La capacité du rétrovirus à intégrer le génome de manière stable fait de ce virus un candidat très intéressant pour le transfert de gène. Un rétrovirus sauvage portant un gène marqueur a été le premier vecteur viral utilisé (Shimotohno and Temin 1982) (Tabin, Hoffmann et al. 1982). De plus, le sous-groupe des lentivirus à l'avantage de pouvoir cibler les cellules en phase G₀ du cycle cellulaire (Jowett, Planelles et al. 1995) (Lewis, Hensel et al. 1992). Cette propriété est très importante pour cibler les tissus constitués de cellules majoritairement quiescentes comme le foie, les muscles ou le cerveau.

La particule rétrovirale mesure 90-140nm et possède une bicouche lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte. Les glycoprotéines de l'enveloppe ENV sont constituées d'une sous-unité exposée à la surface du virion et d'une sous-unité transmembranaire ancrée dans l'enveloppe. Dans une particule rétrovirale mature, les polyprotéines GAG sont clivées par la protéase rétrovirale en protéine de la matrice, de la capside et de la nucléocapside (Figure 20a). Les protéines de la capside forment le cœur du virus où les deux brins de l'ARN génomique sont localisés. Le virus contient également la transcriptase reverse intégrée dans le gène POL (Figure 20b).

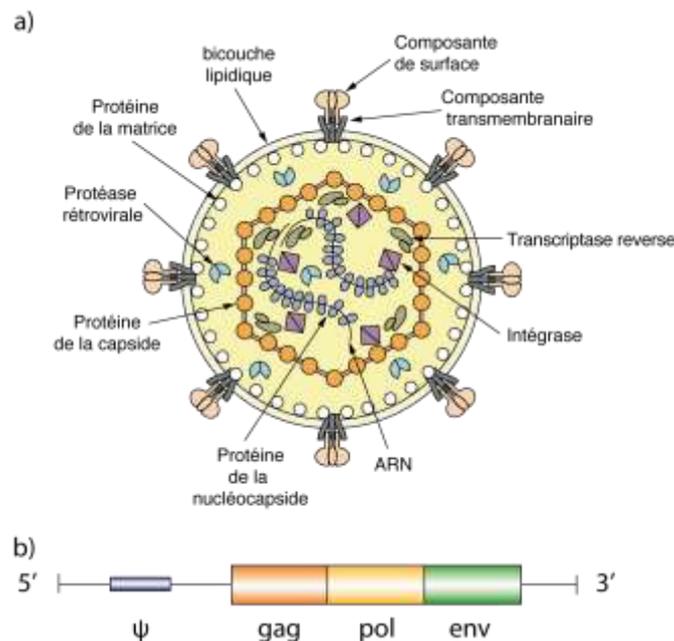


Figure 20. Structure générale d'un rétrovirus (a) et de son génome (b)

D'après (Voisset and Andrawiss 2000)

b) Le cycle de réplication du rétrovirus

Le cycle de réplication du rétrovirus (Figure 21) débute par la liaison spécifique des protéines situées à la surface du virus avec des récepteurs cellulaires de l'hôte. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique va permettre au cœur viral d'entrer dans la cellule infectée. L'ARN

génomique du virus va être rétro-transcrit en ADN double brin par la rétro-transcriptase virale. Pendant cette phase, les séquences uniques situées aux deux extrémités du génome sont dupliquées et placées aux extrémités de l'ADN nouvellement synthétisé, générant des séquences répétées relativement longues ou LTR (Long Terminal Repeat).

Après translocation nucléaire, l'ADN génomique viral va s'intégrer à l'ADN génomique cellulaire grâce à l'action des intégrases virales. La transcription de l'ADN génomique intégré est directement liée au promoteur viral et aux enhancers localisés en 5' LTR et en 3' LTR. Comme nous l'avons vu, les rétrovirus portent trois gènes majeurs qui encodent les protéines du cœur viral (gag), les enzymes transcriptase reverse et integrase (pol) et les protéines de l'enveloppe virale (env). La transcription et la traduction de l'ADN proviral sont assurées par la machinerie cellulaire. Le transcrit primaire porte toutes les informations génétiques virales et sera utilisé comme matrice pour les nouveaux virions mais aussi pour la production des protéines Gag et Pol. Un épissage alternatif est utilisé pour la synthèse des protéines Env.

L'assemblage des protéines et de l'ARN viral requiert l'interaction avec des séquences ARN spécifiques dits signaux d'emballage, dont certains sont obligatoires (ψ), et assurent que seuls les ARN viraux intègres seront emballés. Après l'assemblage des protéines et de l'ARN viral, les particules vont sortir de la membrane plasmique et mûrir en clivant les polyprotéines Gag par les protéases rétrovirales, subir des changements conformationnels, réorganiser les protéines du cœur viral. Pour la plupart des rétrovirus, la réplication virale n'endommage pas la cellule (Günzburg and Salmons 1999).

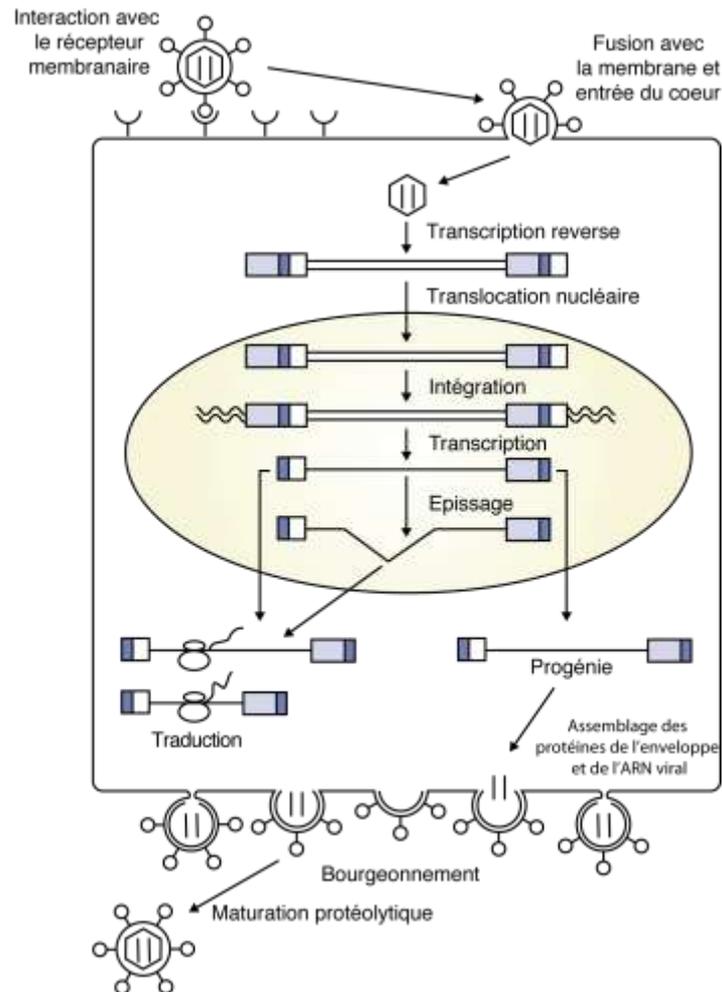


Figure 21. Cycle de réplication du rétrovirus

D'après (Coffin, Hughes et al. 1997)

Les oncorétrovirus ne peuvent infecter que les cellules en division car ils ont besoin de la dislocation de la membrane nucléaire opérée lors de la mitose pour intégrer le noyau. Cette propriété limite les types cellulaires pouvant être ciblés avec ce sous-groupe. Les lentivirus peuvent infecter les cellules se divisant peu ou quiescentes (Lewis, Hensel et al. 1992). En effet, ces virus possèdent des signaux de localisation nucléaire permettant l'entrée dans le noyau sans nécessiter la fragmentation de la membrane (Federico 1999). Cette propriété fait que les lentivirus reçoivent aujourd'hui beaucoup plus d'attention en tant que vecteur pour le transfert de gène que les oncorétrovirus.

c) Les vecteurs rétroviraux

- **production**

Afin d'utiliser les rétrovirus pour le transfert de gène, il est important d'altérer le cycle de vie du virus afin que celui-ci ne se réplique pas dans la cellule hôte. En remplaçant les gènes Gag, Pol et Env du génome rétroviral par un gène étranger, pouvant mesurer jusqu'à 8kb, le virus modifié peut toujours entrer dans la cellule et y insérer son génome, mais ne peut plus fabriquer de nouvelles particules virales. Les séquences LTR et ψ , indispensables à l'encapsidation, sont conservées. La

production de ces vecteurs est possible grâce à l'utilisation de cellules dites « productrices » contenant les gènes structuraux et fonctionnels dans des cassettes d'expression différentes. Le vecteur rétroviral contenant le gène d'intérêt est inséré dans la cellule productrice sous la forme d'un plasmide et va être empaqueté et relargué de la même manière que dans le cycle d'infection du virus sauvage. Les particules résultantes conservent la propriété d'infecter les cellules cibles mais ne sont pas capables de se répliquer. Ces particules peuvent être produites en grande quantité et stockées (McTaggart and Al-Rubeai 2002).

- **sécurité**

Afin d'améliorer la sécurité liée à l'utilisation de ces vecteurs rétroviraux, la phase de production a été optimisée. Le premier risque est la recombinaison entre l'ADN du vecteur et l'ADN des cellules productrices, conduisant à la production de particules virales capables de se répliquer. La première solution consiste à utiliser des plasmides séparés pour l'insertion des gènes Gag-Pol et Env (Figure 21). Dans ce cas, trois recombinaisons homologues sont nécessaires pour obtenir un virus compétent pour la réplication, et la sécurité est renforcée. Le risque d'obtenir des virus capables de réplication existe aussi *in vivo* où les cellules peuvent avoir été infectées par le rétrovirus sauvage. Afin d'éviter ce risque, des virus auto-inactivés ont été développés. Ces virus recombinants possèdent des LTR inactivés après intégration dans le génome de la cible, et empêche les LTR d'être empaqueté dans le cas d'une primo-infection et la contamination aux cellules voisines (Andreadis, Roth et al.). L'utilisation de vecteurs rétroviraux dépourvus de séquences rétrovirales codantes a été développée (Yu, Kim et al. 2000). Un autre risque possible est l'erreur dans la rétro-transcription (Kurian, Watson et al. 2000), induisant l'intégration d'un gène mutant. Comprendre les sites d'intégration des vecteurs viraux est également essentiel, car un site d'intégration préférentiel près des promoteurs peut augmenter le risque d'oncogénèse. Par exemple, la majorité des vecteurs basés sur les MuMLV s'intègrent à l'intérieur et près des régions de démarrage transcriptionnel ainsi que dans les îlots CpG (Xu, Montgomery et al. 2003). Les lentivirus ont un risque d'activation du promoteur plus faible lors de l'intégration comparé aux vecteurs MuLV, les rendant moins prompt à l'insertion mutagénique (Trono 2003).

- **Tropisme**

Le transfert du gène dans un autre type cellulaire que celui ciblé entraîne une perte d'efficacité du transfert de gène, une perte de particules virales et peut induire des effets secondaires *in vivo*. Les gènes Env, contenus dans le plasmide isolé à l'intérieur de la cellule productrice déterminent le tropisme du vecteur et peuvent être manipulés pour modifier le tropisme d'un grand nombre de type viraux. Ce procédé est appelé pseudotypage (Figure 22). Par exemple, la glycoprotéine VSV-G (vesicular stomatitis virus – glycoprotéine) permet une infection efficace des cellules humaines et possède une moindre sensibilité au complément. Elle permet également de concentrer le virus par centrifugation afin de produire des stocks de particules virales avec un titre plus important (Burns, Friedmann et al. 1993).

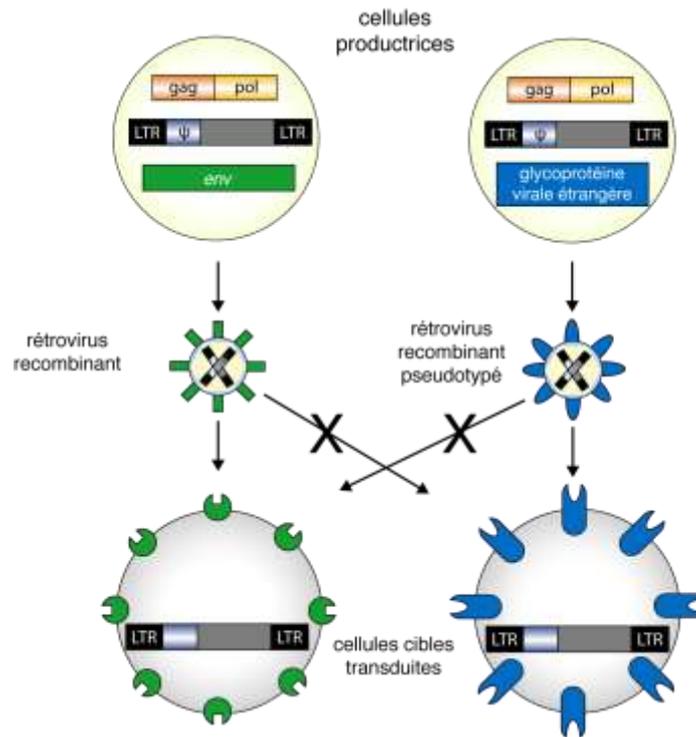


Figure 22. Production et pseudotypage des rétrovirus

D'après (Sanders 2002)

5.3.2. Les adénovirus

a) Présentation

Les adénovirus ont été découverts en 1953 (Rowe, Huebner et al. 1953) dans des cultures de tissus humains adénoïdes (amygdales pharyngées). Depuis, plus de 50 sérotypes différents classifiés en sous-groupes allant de A à G. Les virus des sous-groupes A et B sont potentiellement oncogéniques chez le rongeur nouveau-né. Les virus utilisés en transfert de gène appartiennent au groupe C non oncogénique, pouvant entraîner des maladies respiratoires bénignes chez l'homme et comptent pour 5-15% dans les causes de pharyngite (Strauss 1984). Une fois la cellule hôte infectée, l'ADN de l'adénovirus ne s'intègre pas et reste épisomique, évitant les risques liés à l'intégration mutagénique. L'inconvénient principal de ce type de virus est que sa forte immunogénicité (Sumida, Truitt et al. 2004) limite la durée d'expression du transgène et la possibilité d'une réintroduction.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brins non enveloppés et à capsidie icosaédrique de 80-90nm de diamètre. La capsidie est composée de 252 capsomères : 12 pentons aux sommets de l'icosaèdre et 240 hexons situés sur les arêtes et les faces. Chaque penton porte une fibre glycoprotéique, terminée par une protéine sphérique de 4 nm de diamètre. Le génome des virions mesure 26-40 kb (Figure 25) (Campos and Barry 2007).

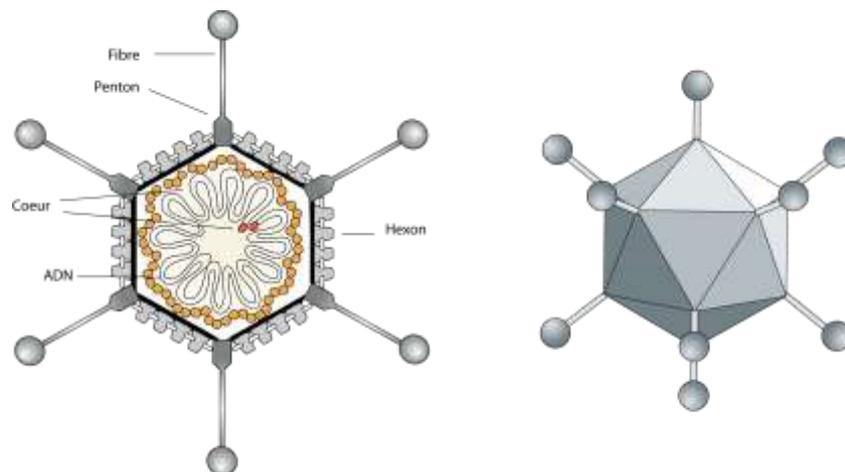


Figure 23. Structure d'un adénovirus

Source : <http://dsfoster.googlepages.com/themolecularbiology>.

b) Le cycle répliatif de l'adénovirus

Le cycle de répliation de l'adénovirus débute par l'attachement du bouton de la fibre au récepteur à coxsackie et adénovirus (CAR) situé à la surface de la cellule cible (Bergelson, Cunningham et al. 1997). Le virion peut être internalisé par endocytose grâce à un système dépendant des clathrines ou par des cavéoles/radeaux lipidiques. La voie des clathrines est la plus étudiée et fait intervenir des puits revêtus de clathrine pour internaliser la particule virale dans des vésicules qui vont rentrer dans la voie endosomale. Les motifs RGD (arginine-glycine-acide aspartique) des pentons vont interagir avec certaines intégrines pour faciliter l'endocytose médiée par

la clathrine (Li, Brown et al. 2001) (Salone, Martina et al. 2003) (Wickham, Mathias et al. 1993). L'environnement du compartiment endosomal va s'acidifier et stimuler de nombreux changements conformationnels chez le virus (dont le largage des fibres et des pentons) aboutissant à l'échappement par lyse des endosomes (endosomolyse) vers le cytoplasme. Là, le virion va interagir avec la dyneine, et se déplacer le long des microtubules vers le centre d'organisation des microtubules (MTOC), situé près du noyau de la cellule hôte (Bailey, Crystal et al. 2003). Le facteur d'export membranaire 1 (CRM1) va permettre le transfert vers le complexe de pore nucléaire (NPC) où le virion va s'accrocher, se désassembler et libérer son génome dans le noyau.

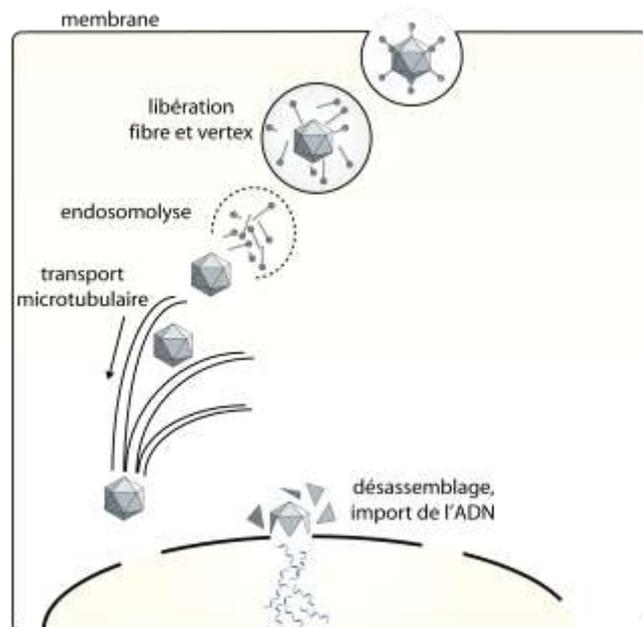


Figure 24. Entrée d'un adénovirus dans sa cellule cible

D'après (Campos and Barry 2007)

Le génome de l'adénovirus (Figure 25) est constitué d'ADN double brin portant à chacune de ses extrémités des régions terminales répétées (ITR) indispensables pour la réplication du virus. Le génome adénoviral est organisé en quatre régions précoces (E1-E4) et cinq régions tardives correspondant à des épissages alternatifs (L1-L5). Les gènes précoces sont exprimés avant l'initiation de la synthèse de l'ADN viral. Après l'entrée du génome viral dans le noyau, la région E1 va être transcrite par les facteurs de transcriptions cellulaires pour donner les protéines E1a et E1b directement impliquées dans l'activation des régions précoces restantes (E2, E3, E4). De plus la protéine E1A va forcer la cellule hôte à rentrer en phase S et la protéine E1B va empêcher l'apoptose. La région E2 code pour des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN virale : E2a, une protéine de liaison à l'ADN simple brin, et E2b, l'ADN polymérase virale. La région E3 est composée d'une série d'unités transcriptionnelles impliquées dans l'évasion aux mécanismes humains dédiés à l'élimination des cellules infectées, et favorise la lyse cellulaire ainsi que la libération des nouvelles particules virales. Le produit de la région E4 est impliqué dans la régulation de l'expression des protéines virales et cellulaires, la réplication de l'ADN viral, l'accumulation tardive d'ARNm viral et la synthèse protéique, et à l'inhibition de la synthèse protéique de la cellule hôte. L'expression de ces

gènes précoces va aboutir à la réplication de l'ADN (environ 8 heures après l'infection) et à l'activation des gènes tardifs sous le contrôle du promoteur tardif majeur (MLP). Le regroupement de plusieurs gènes sous le contrôle de cet unique promoteur va permettre l'expression simultanée des protéines tardives. Ces régions tardives vont coder pour les protéines structurales du virion comme le cœur, la capside et les fibres. La séquence d'encapsidation ψ va permettre l'association de l'ADN viral avec la capside immature nouvellement formée. La capside va subir des étapes de maturation aboutissant à la lyse de la cellule et à l'échappement des virions (Campos and Barry 2007).

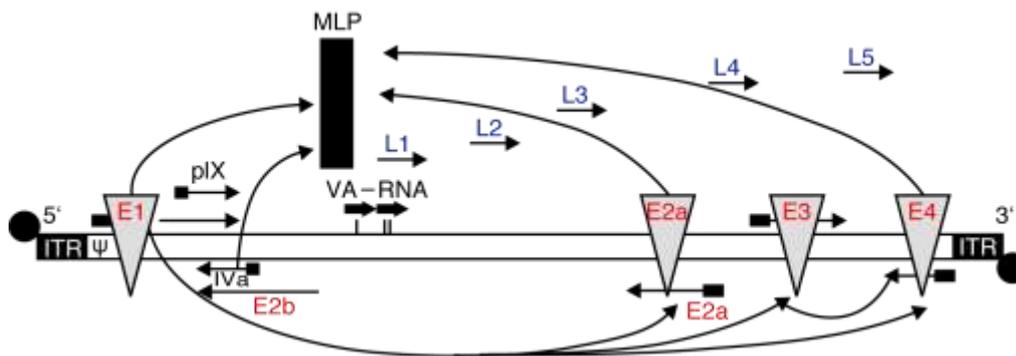


Figure 25. Organisation du génome adénoviral

(Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations, 1999, Sheila Connelly)

Le génome adénoviral est représenté par deux lignes parallèles, et les facteurs de transcription par un rectangle. Les flèches droites indiquent le sens de la transcription. Les flèches incurvées représentent les voies de transactivation. Les unités de transcription mineures, pIX, Iva et VA-RNA (I-III) sont figurées. Les régions terminales répétées (ITR) et les protéines terminales nécessaires à la réplication virale sont indiquées (rond).

c) Les vecteurs adénoviraux

- **sécurité et production**

Pour être utilisé pour le transfert de gène, le génome des vecteurs adénoviraux a été modifié afin d'empêcher le développement des fonctions liées à la réplication et à l'expression des gènes viraux. La première génération de vecteurs adénoviraux était déficiente pour le gène E1 qui représente le point de départ de la transcription des gènes précoces. Le plasmide codant pour le vecteur portant le transgène est transfecté dans une lignée cellulaire permissive contenant le gène E1 (ex : la lignée cellulaire 293). Dans la cellule productrice, la recombinaison homologue entre la cellule productrice et le génome viral déficient va aboutir à la génération du vecteur adénoviral recombinant. Néanmoins, bien que cette génération de vecteurs adénoviraux produise de faibles quantités d'antigènes viraux dans la cellule transduite, les gènes viraux restent toxiques pour la cellule hôte et induisent une réponse immunitaire contre les antigènes viraux. Cette réponse immunitaire va aboutir à la destruction de la cellule transduite, et limiter l'efficacité du transfert de gène (McConnell and Imperiale 2004). En cas de réadministration du vecteur adénoviral, celui-ci sera rapidement éliminé par le système immunitaire, et ne pourra transduire les cellules cibles.

Afin de circonvier aux problèmes immunogéniques de ces vecteurs adénoviraux, les vecteurs « gutless » ou « helper dépendants » ont été développés. Le génome de ces vecteurs est

dépourvu de séquences virales à l'exception des éléments nécessaires à la réplication et à l'encapsidation (Amalfitano 1999). Les gènes manquants seront fournis soit par un autre adénovirus, dit « helper », déficient pour E1, soit par un plasmide portant les gènes manquants. La production du vecteur se fera en transfectant l'ADN du vecteur gutless dans des cellules 293, et en infectant ces cellules par le mutant E1(-) qui exprimera les gènes structurels manquants. L'élimination des antigènes adénoviraux dans les cellules cibles permet d'éviter les problèmes associés à l'expression des gènes viraux et facilite l'expression épisomique prolongée du transgène. De plus, en éliminant les gènes viraux, ces vecteurs ont un insert plus important d'environ 35kb, permettant l'expression d'un transgène plus important ou l'inclusion d'éléments régulateurs (Palmer and Ng 2005).

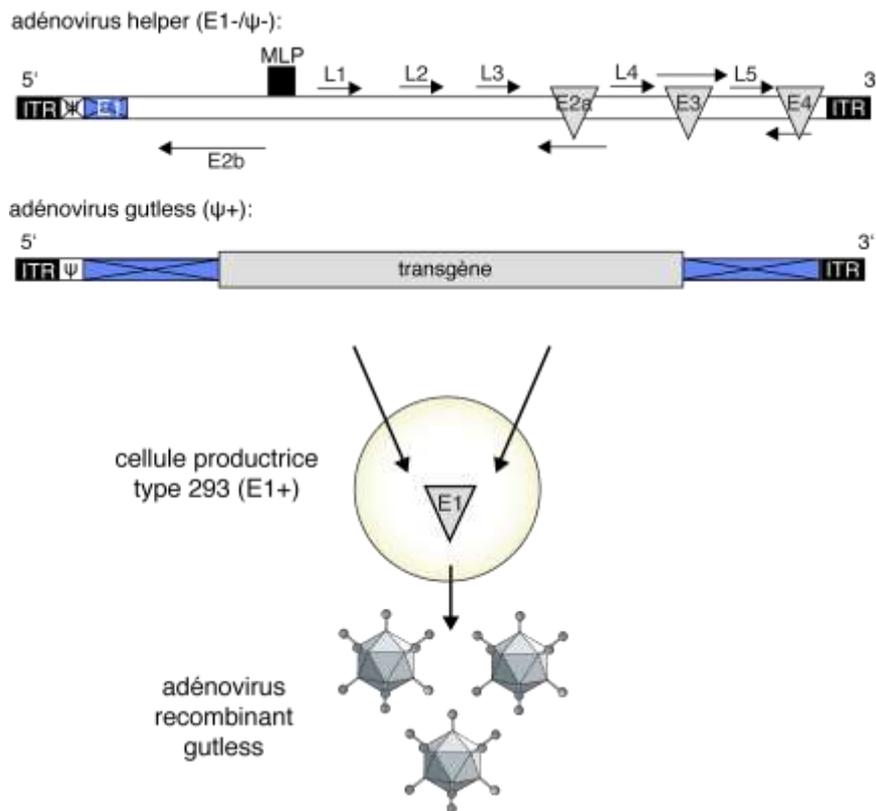


Figure 26. Production d'adénovirus gutless

Source : <http://www2.oakland.edu/biology/chaudhry/pics/vectorsII.pdf>

Tropisme

groupe	Sérotyp	Tropisme
A	12, 18, 31	Intestinal
B1	3, 7, 16, 21, 50	Respiratoire, oculaire
B2	11, 14, 34, 35	Rénal, oculaire
C	1, 2, 5, 6	Respiratoire
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19p, 19a, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Intestinal, oculaire
E	4	Respiratoire, oculaire
F	40, 41	Intestinal

Tableau 4. Adénovirus humains, sous-groupes et tropismes.

Plusieurs stratégies sont étudiées pour augmenter l'efficacité des vecteurs adénoviraux à transduire des cellules et tissus spécifiques (Figure 27). La modification génétique de la capsid représente l'approche la plus directe. Les premiers travaux ont montré que des petits peptides peuvent être greffés sur la surface exposée du bouton de la fibre, la boucle contenant le motif RGD de la base penton, et la région hypervariable de l'hexon (Wickham, Segal et al. 1996) (Dmitriev, Krasnykh et al. 1998). Par la suite d'autres sites ont été découverts, permettant l'insertion de domaines protéiques plus importants et plus complexes.

Cette approche directe reste limitée par la taille et la difficulté que rencontre la protéine exposée à se replier correctement (Magnusson, Hong et al. 2002). Une solution envisagée est l'utilisation de protéines de fusion bi-fonctionnelles constituées d'un domaine de liaison à la capsid fusionné avec un ligand cellulaire. Néanmoins, l'interaction de ces adaptateurs avec la capsid utilise des interactions protéine-protéine non covalentes trop faibles pour être efficaces *in vivo*.

Une autre approche consiste à modifier chimiquement la capsid (par exemple avec du polyéthylène glycol ou PEG) afin d'exposer le ligand voulu. Cette technique peut aussi être utilisée pour masquer le tropisme naturel du vecteur et cette technique de déciblage à donner des résultats intéressants *in vivo* (Wortmann, Vihringer et al. 2008).

Finalement, une dernière stratégie consiste à échanger les fibres avec celles d'un autre pseudotype (Havenga, Lemckert et al. 2002). Le principal problème de cette stratégie est que l'encapsidation des fibres chimériques est relativement inefficace comparée aux fibres sauvages et doit être optimisée.

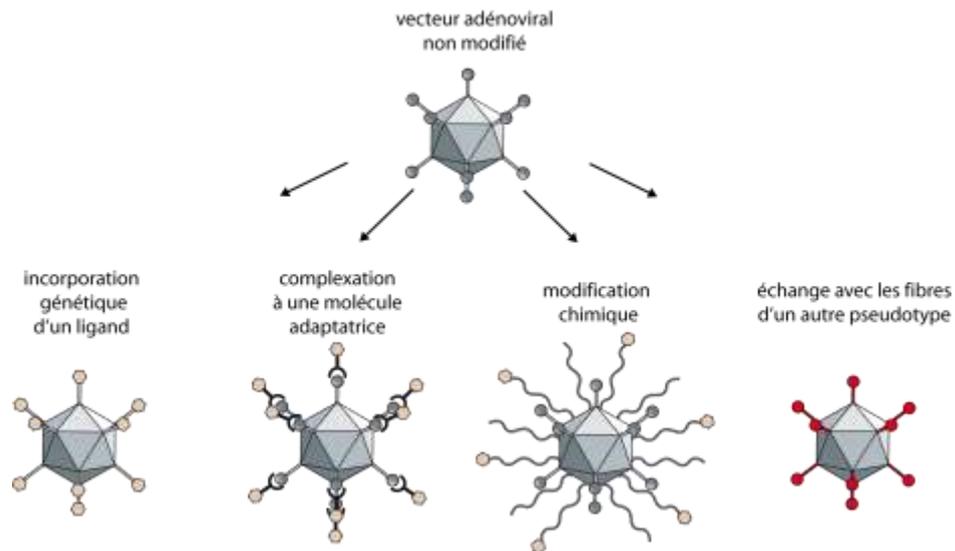


Figure 27. Stratégies générales permettant de modifier le tropisme des vecteurs adénoviraux afin de cibler les récepteurs des cellules d'intérêt.

D'après (Campos and Barry 2007)

5.3.3 Les Adeno-Associated Virus (AAV)

a) Présentation

Le virus humain adéno-associé est un virus à ADN simple brin découvert en 1965 comme contaminant d'une préparation adénoviral. L'AAV est un des plus petits virus connus avec une capsidie icosaédrique non enveloppé et mesure environ 22 nm de diamètre. En raison de la nécessité d'une co-infection virale (AAV + virus helper) pour produire une infection efficace, les sérotypes AAV ont été attribués à une nouvelle sous-famille des *parvoviridae*, les *dependovirus*. De multiples sérotypes d' AAV existent incluant les sérotypes humains 1, 2, 3, 5 et 8, simien de sérotype 5, ainsi que les AAV bovins, canins et aviaires. Malgré la forte séroprévalence de l'AAV chez l'homme (environ 80% de la population mondiale est séropositive pour l'AAV2), ce virus n'a pas été lié à une maladie. De plus, des études ont démontré le rôle anti-tumoral de l'AAV dans des cultures tissulaires et chez l'animal (Khleif, Myers et al. 1991) (Hermonat 1991).

Le génome de l'AAV2 (Figure 28) comporte à ses extrémités des régions inverses répétées ITR. Entre ces deux ITR se trouvent deux gènes viraux : rep encode les protéines indispensables à la réplication, et cap encode les protéines structurelles de la capsidie.

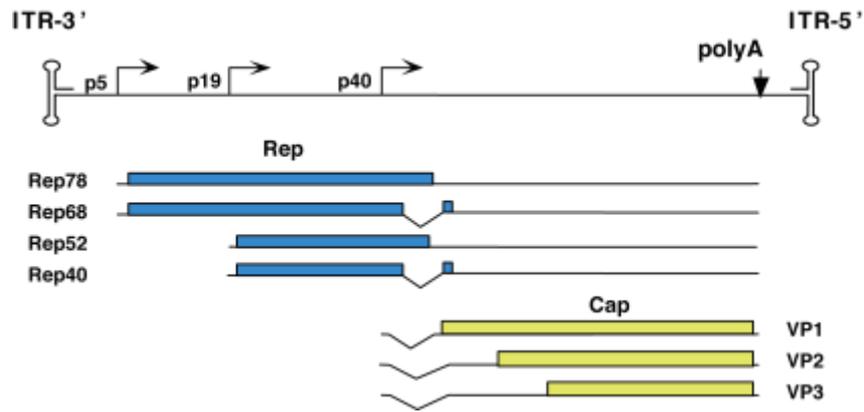


Figure 28. Organisation du génome de l'AAV

D'après (Flotte and Carter 2001)

La transcription du gène rep est contrôlée par deux promoteurs, p5 et p19. En utilisant ces deux promoteurs et des épissages alternatifs, quatre protéines rep sont produites, nommées suivant leur poids moléculaire : Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Rep 78 et Rep 68 (1) interagissent avec une séquence (rrs) contenue dans chaque ITR, (2) possèdent une activité hélicase pour l'ADN et (3) une activité endonucléase pour les ITR durant la réplication ADN et le sauvetage, (4) interagissent avec les séquences rrs de l'ADN du site préférentiel d'intégration du chromosome 19, et (5) possèdent des fonctions transcriptionnelles répressives et activatrices. Les trois premières fonctions sont essentielles au cycle réplcatif. La liaison aux séquences rrs du chromosome 19 est importante dans la phase de latence du cycle et la régulation de la transcription est nécessaire pour supprimer l'expression des gènes viraux durant la phase de latence et pour l'activer durant la phase de réplication. Rep 78 et Rep 68 peuvent également moduler la transcription de promoteurs hétérologues d'autres virus et gènes cellulaires. Les protéines Rep52 et Rep40 sont nécessaires pour accumuler des copies d'ADN simples brins durant l'infection.

Les gènes cap transcrits par le promoteur p40 produisent trois protéines : VP1, VP2 et VP3. Ces trois protéines résultent d'un épissage alternatif et sont identiques pour la région VP3 mais différents pour la région amino-terminale. VP3 représente 84% des protéines de la capsid mais les trois protéines sont nécessaires à l'assemblage.

b) Cycle réplcatif

Le cycle du virus sauvage commence au moment où l'AAV interagit avec son récepteur sur la surface cellulaire, l'héparan sulfate proteoglycan (HSPG) pour l'AAV2, pour l'attachement à la membrane cellulaire (Figure 29). De plus, des récepteurs à l'intégrine ($\alpha\beta5$) et au facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) semblent également intervenir dans l'internalisation. L'AAV va ensuite pouvoir entrer dans la cellule via la voie endosomale dépendant de la dynamine. Après acidification de l'endosome, les particules virales sont relarguées dans le cytoplasme et rapidement transportées au noyau, via les microtubules et les microfilaments, avant d'entrer dans le noyau. Le virion va alors se démanteler et libérer son ADN simple brin qui va s'intégrer au niveau du site AAVS1 du chromosome 19 (Kotin, Siniscalco et al. 1990). Le processus d'intégration est encore mal défini, mais les protéines Rep apparaissent comme des composants indispensables, avec la protéine Rep 78 servant de ligase entre les ADN cellulaire et viral (Smith and Kotin 2000) (Surosky, Urabe et al. 1997).

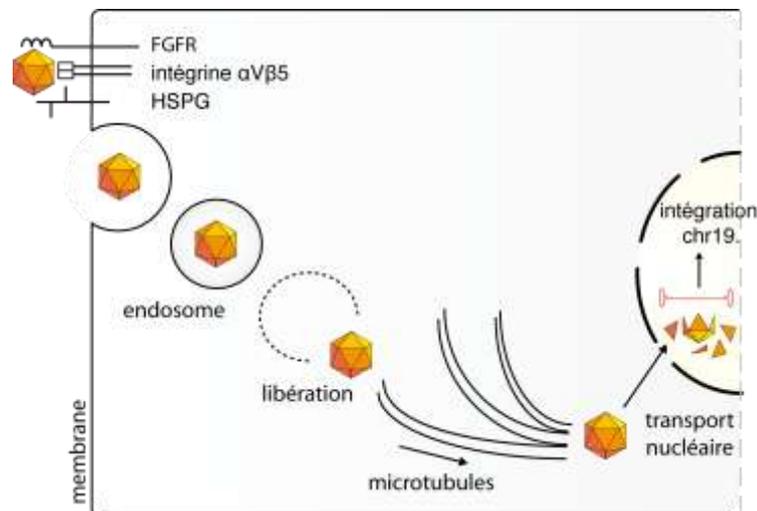


Figure 29. Entrée de l'AAV2 dans la cellule cible

D'après (Ozawa 2007)

Le cycle de vie de l'AAV peut ensuite se diviser en deux phases, suivant la présence ou non du virus helper: la phase de latence et la phase de réplication (Figure 30). En l'absence de virus helper, l'infection des cellules par l'AAV conduit à une phase de latence caractérisée par l'absence d'expression des gènes rep et cap et l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. En présence d'un virus helper (adénovirus, herpesvirus), la phase productive va pouvoir être initiée. Cette phase est caractérisée par l'expression des gènes de l'AAV, la réplication du génome et son encapsidation au niveau nucléaire. Les virions néoformés sont libérés dans le milieu extérieur après lyse cellulaire provoquée par le virus helper.

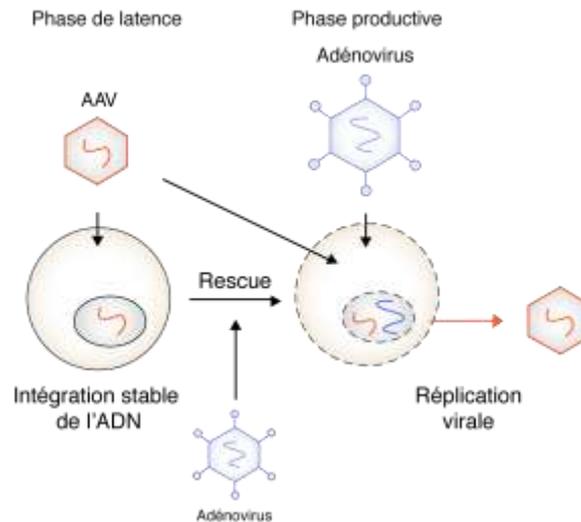


Figure 30. La phase de latence et la phase productive du cycle de vie de l'AAV

D'après (Flotte and Carter 2001)

La phase de latence prend donc place lorsque l'AAV infecte une cellule en absence de virus helper (Figure 31). Durant cette phase, ses trois promoteurs (p5, p19 et p40) sont réprimés par la fixation des protéines Rep 78 et 68 sur le site RBS (Rep Binding Site) du p5. La répression des gènes de l'AAV est également renforcée par les facteurs cellulaires ZF5 (Cathomen, Stracker et al. 2001) et YY1 (Ying Yang 1) (Shi, Seto et al. 1991).

L'adénovirus est le mieux caractérisé des virus helper et va produire les gènes précoces E1A, E1B, E2A et E4. Les produits des gènes E1B et E4 semblent former un complexe qui va favoriser la stabilité des transcrits de l'adénovirus et de l'AAV, et permettre leur accumulation dans le cytoplasme de la cellule infectée. La protéine E1A va transactiver le promoteur p5 (Chang, Shi et al. 1989) en favorisant la fixation du facteur cellulaire MLTF. Les protéines E2A et VAI régulent l'expression des gènes de la capsidie en augmentant le niveau des messagers des protéines structurales et en favorisant leur traduction.

Les promoteurs p19 et p40 sont ensuite transactivés par les protéines Rep 68 et Rep 78. Le promoteur p19 est transactivé par les facteurs cellulaires cAAP (cellular AAV activating protein) et SP1 (Pereira and Muzyczka 1997). Les protéines Rep vont alors reconnaître les sites RBS des ITR, entraînant la coupure au niveau du site trs adjacent, c'est l'étape de mobilisation, ou "rescue". Le génome peut alors être répliqué. La réplication va aboutir à la formation de deux ADN simple brin, pouvant soit subir un nouveau cycle de réplication, soit être encapsidé. La capsidie de l'AAV forme une particule icosaédrique constituée des protéines VP1, VP2 et VP3 dont l'expression est sous la dépendance du promoteur p40.

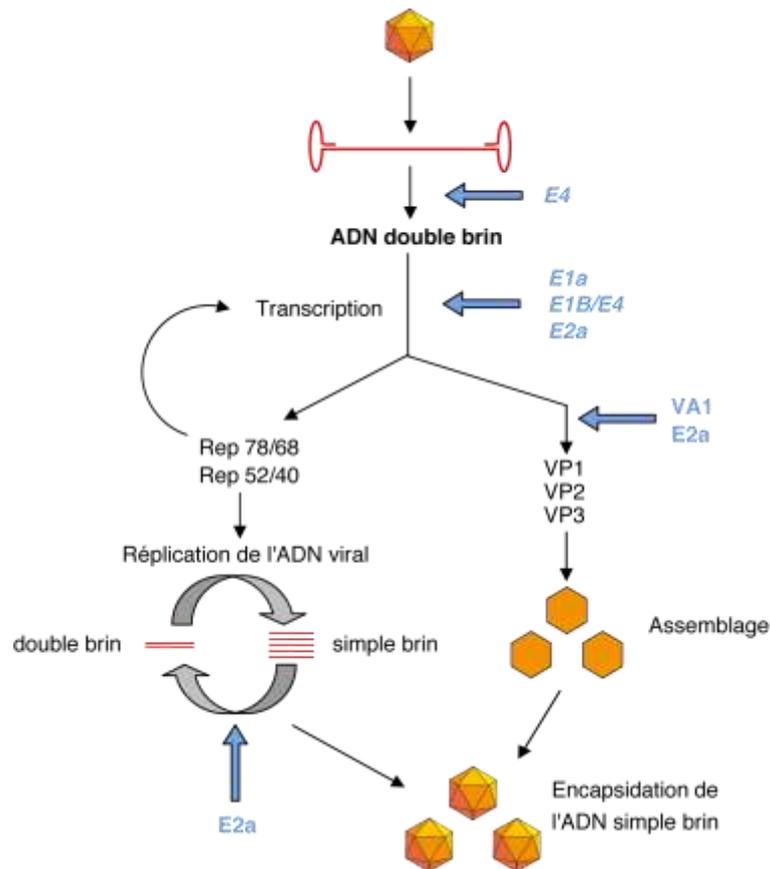


Figure 31. Cycle réplcatif de l'AAV2

D'après (Salvetti, Oräve et al. 1998). Les flèches en bleu indiquent les protéines adénovirales ayant un effet helper.

c) Les vecteurs AAV

- **sécurité / design**

Les AAVr (AAV recombinants) ont fait l'objet de nombreuses études du fait de l'absence d'expression de gènes viraux en absence de virus helper et de leur nature non-pathogénique. Leur principal défaut vient du fait qu'un AAVr non modifié infectant une cellule préalablement infectée par un virus helper rentrera dans sa phase productive, va lyser la cellule cible et générer des particules virales AAVr. Une autre caractéristique des AAVr est que l'ITR contient en cis les éléments nécessaires à la réplication et à l'encapsidation, ce qui fait de l'AAVr un excellent candidat pour la réalisation de vecteurs « gutless ». Classiquement, le génome des vecteurs viraux est obtenu en remplaçant les gènes *rep* et *cap* par la cassette d'expression du transgène, les seules séquences virales conservées sont les ITR (Figure 32). Les fonctions complémentaires seront alors apportées par un plasmide comportant les gènes *rep* et *cap*. En transfectant le plasmide AAVr et *rep-cap* dans une cellule permissive et en présence du virus helper, le génome de l'AAV recombinant va rentrer dans un cycle lytique de production où les ADN simples brins de l'AAVr seront encapsidés pour former des particules virales recombinantes.

L'adénovirus est le plus couramment utilisé pour fournir les fonctions helper aux AAVr. Les particules adénovirales nouvellement formées sont éliminées des productions d'AAVr en utilisant les propriétés physiques des deux virus, comme l'inactivation par la chaleur ou l'utilisation d'un gradient de chlorure de césium. La découverte des gènes responsables des fonctions helper (E1A, E1B, E2A, E4 et VA) a permis d'éviter l'utilisation d'adénovirus pour la production de rAAV en co-transfectant la cellule productrice (E1A+ et E1B+) avec un plasmide contenant les gènes E2A, E4 et VA. Cette technique de triple infection (plasmide transgène + plasmide rep-cap + plasmide adéno) permet de produire des AAVr exempts d'adénovirus. De plus, les rendements de production sont au moins aussi bons, sinon meilleurs que ceux obtenus en employant un virus helper. Ceci est dû au fait que les plasmides adénoviraux sont déficients pour les gènes de réplication et d'encapsidation, il n'y a donc pas de compétition pour le produit des gènes adénoviraux entre l'adénovirus et l'AAVr. Dans un autre protocole, le plasmide rep-cap et le plasmide helper sont remplacés par un seul plasmide dit « pDG » (AAV-Helper & Packaging vectors) (Figure 32). Le promoteur fort p5 des Rep 78/68 est remplacé dans le plasmide pDG par le promoteur LTR du MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), afin d'éviter la production d'AAVr capables de se répliquer résultant d'une recombinaison homologe entre les deux plasmides (Flotte and Carter 2001).

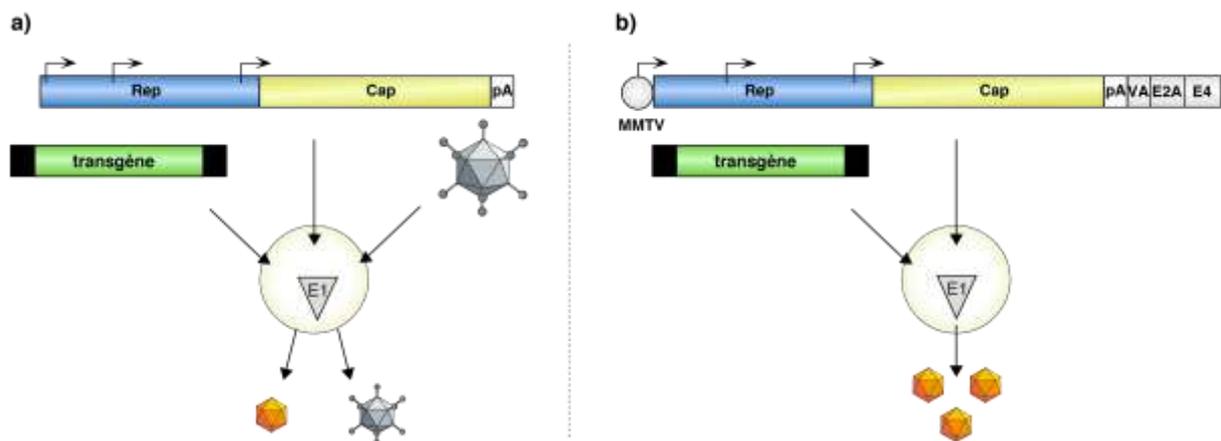


Figure 32. a) Méthode classique de production d'AAVr utilisant un virus helper et b) Méthode utilisant un plasmide portant les gènes du virus helper

D'après (Flotte and Carter 2001)

- **Tropisme**

Sérotype	Tropisme
AAV8, AAV9	Foie
AAV1, AAV7, AAV6, AAV8, AAV9	Mmuscle squelettique
AAV5, AAV1, AAV4	Système nerveux central
AAV5, AAV4	Epithélium pigmenté de la rétineil
AAV5	Cellules photoréceptrices
AAV9	Poumons
AAV8	Coeur
AAV8	Pancréas
AAV2	Rein

Tableau 5. Tropisme des différents sérotypes d'AAV

D'après (Wu, Asokan et al. 2006)

De nombreuses études ont porté sur l'altération du tropisme des AAVr afin d'améliorer la transduction ou la spécificité de ces vecteurs pour les tissus cibles. Pour modifier le tropisme d'un AAV, il est possible de modifier les gènes codant pour la capsidie ou d'échanger des domaines protéiques spécifiques d'un sérotype avec des régions similaires portées par un autre sérotype. Les vecteurs chimériques peuvent potentiellement améliorer la transduction dans un tissu cible en portant les domaines protéiques responsables de l'interaction avec les récepteurs membranaires, du trafic nucléaire, et du démantèlement de la particule virale à l'intérieur du tissu. Néanmoins, l'échange simple d'un seul domaine n'est pas toujours suffisant pour modifier le tropisme des vecteurs. Ainsi les recherches visant à définir les régions de la capsidie responsables des tropismes cellulaires sont très actives.

Une autre approche consiste à utiliser un mélange de protéines de la capsidie entière provenant de deux sérotypes en utilisant plusieurs plasmides helper lors de la production de l'AAV recombinant. Cette technique permet de générer des particules d'AAV mosaïques possédant les propriétés des deux sérotypes. Cette approche semble inadéquate pour obtenir des particules spécifiques d'un type cellulaire donné, et augmente le risque d'être neutralisé par les anticorps neutralisant un des sérotypes. De plus, le contrôle précis et la reproductibilité de la stœchiométrie des protéines de la capsidie protéique reste difficile.

Une autre technique pour obtenir des vecteurs viraux plus efficaces se base sur l'évolution virale, c'est-à-dire l'utilisation de méthodes de mutation-sélection pour obtenir de nouvelles générations de virus. Ainsi, de manière aléatoire, des variants AAV sont générés, et certains d'entre eux vont posséder des capacités supérieures aux AAV sauvages : meilleure capacité à résister aux anticorps neutralisants, transport tissulaire et infection de cellules préalablement résistantes. Cette technique est également dénommée « évolution dirigée ». (Wu, Asokan et al. 2006)

- **Intégration du vecteur AAV**

Une fois dans le noyau, l'AAV doit devenir double brin pour être transcrit. Chez l'AAV sauvage, durant la phase lytique, la synthèse du deuxième brin prend place en utilisant la boucle de l'ITR comme amorce. La forme répliquative du génome viral issu de cette opération existe sous forme monomérique ou dimérique. Plusieurs études ont démontré que la quantité de vecteur simple brin diminue avec le temps, devenant double brin ou subissant une dégradation (Wang, Xie et al. 2007). En ce qui concerne l'AAVr, les études suggèrent que son génome se trouve à l'état de concatémère (Snyder, Spratt et al. 1997) (Xiao, Li et al. 1996), de manière similaire à l'AAV sauvage (Figure 33). Le mécanisme par lequel l'AAVr acquiert ce deuxième brin n'est pas encore complètement compris. Les premières études sur ce sujet décrivent la synthèse du deuxième brin comme une étape limitante à la transduction de l'AAV2r (Fisher, Gao et al. 1996) (Ferrari, Samulski et al. 1996). Des études plus récentes suggèrent que le génome double brin pourrait être créé par hybridation avec un génome simple brin complémentaire (Nakai, Storm et al. 2000).

En raison de l'absence du gène codant pour les protéines Rep, les vecteurs AAV recombinants ne peuvent s'intégrer au niveau du site spécifique AAVS1 du chromosome 19 de la cellule cible. La persistance du génome de l'AAV recombinant *in vivo* est connue (Fisher, Jooss et al. 1997; Miao, Snyder et al. 1998). Des études ont démontré que le génome de l'AAVr pouvait persister sous forme épisomique un an après l'injection de vecteurs dans le foie (Song, Embury et al. 2001) (Nakai, Yant et al. 2001). Les cellules qui ne se divisent pas sont donc transduites de manière plus stable. Néanmoins, l'intégration du génome AAVr dans la cellule hôte reste possible, bien que beaucoup moins probable. Cette intégration prend souvent place dans ou près des gènes (Miller, Rutledge et al. 2002) (Nakai, Montini et al. 2003), et peut être associée à une mutation de l'hôte. Ainsi, des souris traitées au niveau néonatal avec un AAV2r ont développé des hépato-carcinomes (Donsante, Miller et al. 2007). L'intégration des AAVr dépend des cassures doubles brins au niveau chromosomique, car il a été observé que l'intégration se passe préférentiellement au niveau de ces cassures (Miller, Petek et al. 2004).

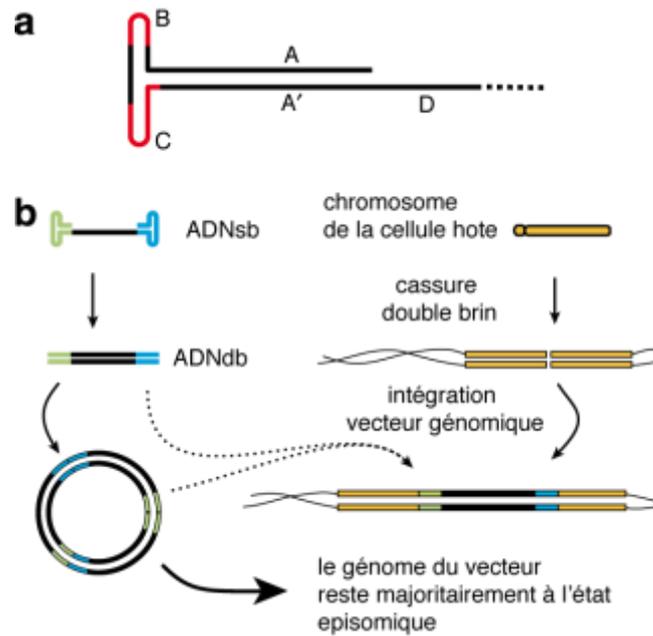


Figure 33. Devenir du génome de l'AAVr

D'après (Schultz and Chamberlain 2008)

a) Structure de l'ITR dans le génome simple brin de l'AAVr. **b)** L'AAVr simple brin devient double brin par synthèse d'ADN et/ou hybridation. L'AAVr se concatémérise, et persiste à l'état épisomique. De rares événements d'intégration peuvent se produire, probablement au niveau des cassures doubles brins du chromosome.

La faible taille du transgène intégrable à la construction de l'AAVr (5kb) est une limite importante de ce type de vecteur viral. Une solution étudiée est la division du gène dans plusieurs AAVr : les concatémères formés par les recombinaisons intermoléculaires (Duan, Sharma et al. 1998), et l'administration de deux vecteurs portant chacun une moitié du gène, conduit à la concatémérisation et permet l'expression du gène entier par « trans-splicing » (Yan, Zhang et al. 2000).

5.3.4) Herpes Simplex Virus

a) Présentation

Les Herpes simplex virus sont des virus à ADN icosaédres possédant une enveloppe faisant partie de la famille des Herpesviridae. Cette famille est pathogène chez l'homme (infection herpétique, varicelle, zona, cancer...). Il existe deux types de Herpes Simplex Virus : l'HSV-1 et HSV-2. Ces virus ont un tropisme pour la peau, les muqueuses et le système nerveux. Structuellement, la particule virale est composée d'un cœur portant l'ADN viral, les téguments (comprenant des protéines impliquées dans l'initiation précoce de la réplication virale VP16 et vhs) assurent la liaison entre les protéines de la capsidie et les glycoprotéines virales ancrées dans l'enveloppe extérieure (Figure 34).

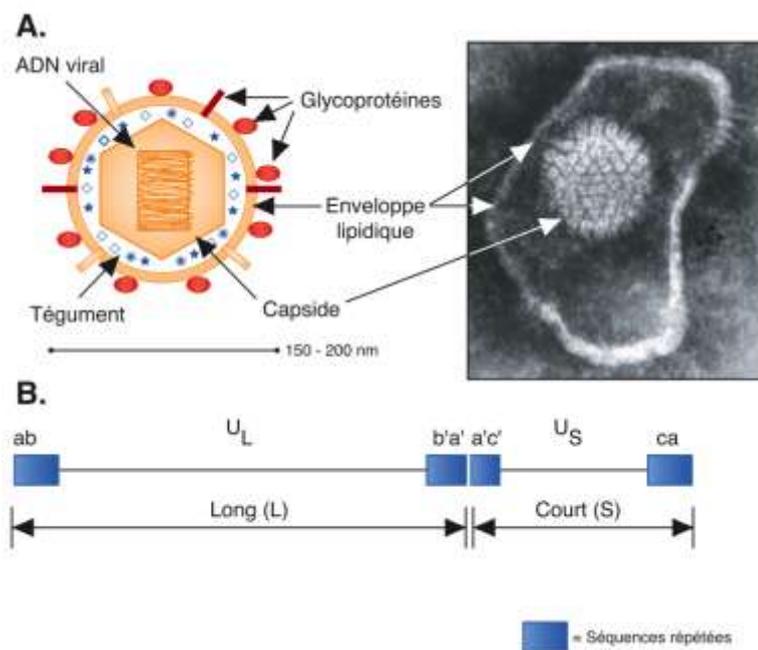


Figure 34. Structure de l'HSV et de son génome

(<http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/82a602b4-16f2-4422-a5a0-a948ee214cd8/ch02.html>)

Le génome des souches de HSV (152-155 kbp) est constitué de deux segments désignés L (long) et S (short). Chacun de ces segments est composé d'une séquence unique (UL ou US) flanquée par de larges séquences répétées inversées (SRI). Les SRI situées aux extrémités du segment UL sont désignées ab et b'a', alors que celles du segment US sont nommées a'c' et ca. Le génome du VHS comprend trois origines de réplifications : OriL est retrouvée en une seule copie dans le segment UL, alors que oriS, située dans une séquence répétée du segment US, est présente en deux copies.

b) Cycle réplcatif

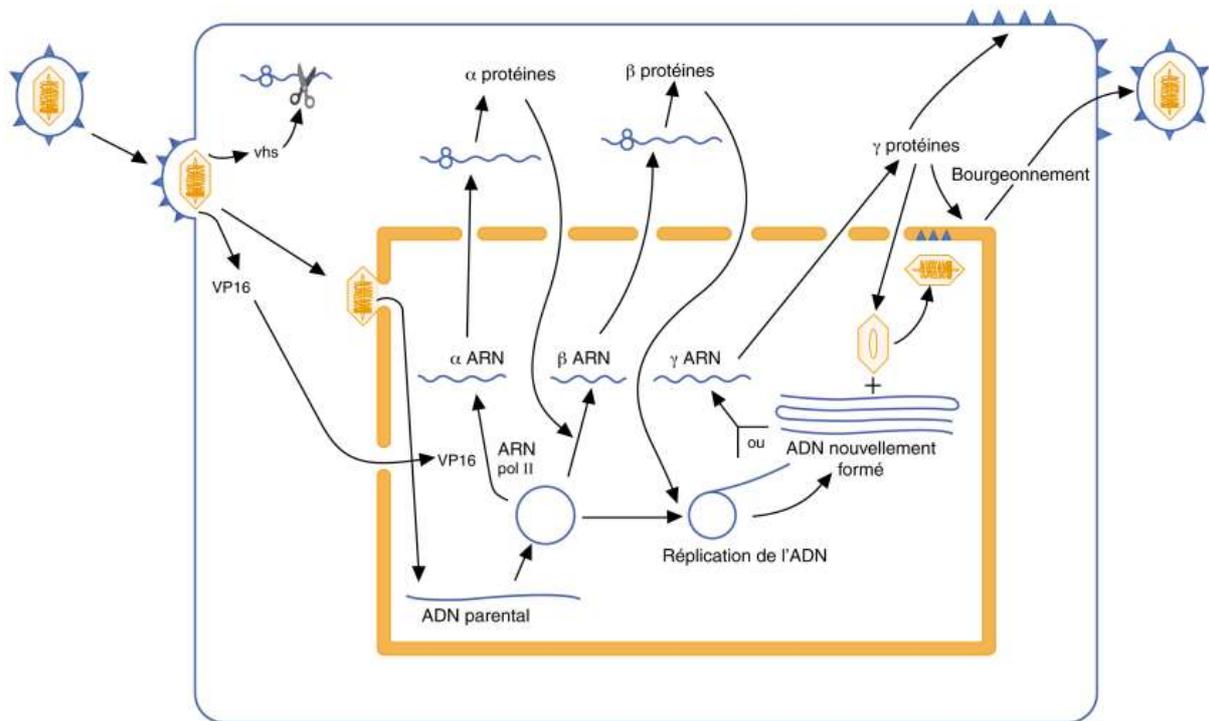


Figure 35. Cycle de réplcation de HSV

D'après (Roizman & Knipe 2001)

L'infection débute par l'attachement des glycoprotéines de l'enveloppe aux récepteurs herpétiques de l'entrée virale (Hve), le virus fusionne ensuite son enveloppe avec la membrane cellulaire. La nucléocapside et certaines protéines du tégment (VP16, VP1-2) sont transportées dans le noyau via les microtubules, alors que d'autres protéines du tégment (vhs, US11) demeurent dans le cytoplasme de la cellule. Les gènes du HVS sont classés en trois groupes selon leur apparition dans le temps : 1) les gènes α précoces 2) les gènes β précoces et 3) les gènes γ tardifs.

Les gènes α sont transcrits très tôt après l'infection à l'aide de l'ARN polymérase II de la cellule infectée. L'expression des gènes α est indépendante des enzymes virales, étant stimulée par le facteur stimulateur VP16, une des protéines composant le tégment du virus. VP16 va se lier à d'autres facteurs régulateurs (ex Oct-1 et HCF) et activer la transcription des gènes α . Une autre protéine du tégment, Vhs, dégrade rapidement l'ARNm suite à l'infection, bloquant ainsi l'induction des gènes cellulaires. Des six protéines α , cinq sont impliquées dans le cycle réplcatif (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et US1.5), et modifient plusieurs fonctions clés de la cellule hôte. Une autre protéine (ICP47) bloque la présentation des antigènes à la surface des cellules infectées. Le produit des gènes α va assurer la transcription des gènes β codant pour des protéines impliquées dans la réplcation de l'ADN viral. Certaines protéines virales α et β entraînent également l'expression des gènes γ , codant majoritairement pour des protéines structurales. Les protéines synthétisées sont alors assemblées pour former la capsidie et le tégment du virion. Les nucléocapsides bourgeonnent ensuite de la

membrane nucléaire interne, acquièrent une enveloppe et certaines protéines du tégument. Les virus sont ensuite déplacés à la surface de la cellule par un transport vésiculaire.

c) Les vecteurs HSV

Les virus herpes simplex possèdent plusieurs propriétés intéressantes pour le transfert de gène. D'abord ce type de virus possède un génome très important, ce qui permet de délivrer jusqu'à 150Kb d'ADN dans l'environnement nucléaire de la cellule. Cet ADN reste épisomique et ne va pas intégrer le chromosome de la cellule hôte. Parmi les 80 gènes que constitue le génome du virus, environ la moitié ne sont pas nécessaires pour la réplication du virus et peuvent être supprimés, sans déranger la production virale, mais reste nécessaire pour l'expression totale du phénotype virulent *in vivo*. Enfin, le HSV possède un excellent tropisme pour le système nerveux. Trois différents types de vecteurs peuvent être dérivés suivant ces différentes propriétés : les vecteurs non réplicatifs, les vecteurs réplicatifs et les vecteurs amplicons.

- **Les vecteurs non réplicatifs**

Les virus herpes simplex recombinant non réplicatifs sont des vecteurs viraux où les gènes essentiels pour la réplication virale sont mutés ou délétés. Les gènes précoces ICP4 et ICP27 sont essentiels pour la réplication et la délétion d'un ou des deux gènes nécessite l'utilisation de lignées cellulaires complémentaires capables de fournir en *trans* la protéine virale délétée. La première génération de vecteurs HSV non réplicatifs étaient délétés en ICP4 (DeLuca, McCarthy et al. 1985). Bien que ces vecteurs montrent une pathogénicité réduite et peuvent être utilisés pour transfecter transitoirement des gènes reporters dans le cerveau, ils restent cytotoxiques pour les neurones en culture. Cette cytotoxicité résiduelle résulterait de l'expression des gènes précoces. L'utilisation de lignées cellulaires complémentaires exprimant ICP4 et ICP27 a permis la construction d'une deuxième génération de mutants défectifs (Marconi, Simonato et al. 1999). Ces mutants montrent une cytotoxicité substantiellement réduite pour les neurones en culture. La délétion des cinq gènes précoces (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47) prévient la toxicité, permet une infection efficace et le génome viral persiste dans les cellules pendant une longue période (Kaplitt, Kwong et al. 1994). Cependant ces vecteurs poussent faiblement en culture et expriment le transgène à des niveaux faibles en absence du transactivateur ICP0 (Samaniego, Wu et al. 1997) .

- **Les vecteurs réplicatifs**

L'utilisation de vecteurs non réplicatifs limite l'efficacité du transfert. L'utilisation de vecteurs réplicatifs permet la réplication des gènes initialement délivrés dans un faible nombre de cellules. Les virus formés dans ces cellules vont être transférés dans les cellules voisines, avec la propagation de l'infection, et augmente significativement l'efficacité du transfert de gène (Mullen and Tanabe 2002). L'utilisation de vecteurs réplicatifs pose des problèmes inhérents à la nature du virus : pathogénicité, mutabilité, dissémination incontrôlée. Il est important de modifier/déléter les gènes du HSV pour créer un mutant avec des capacités réduites à se répliquer dans les cellules non quiescentes, mais qui peut se répliquer dans les cellules tumorales ou les cellules en division. Plusieurs gènes de l'HSV qui ne sont pas essentiels en culture et participent à la virulence *in vivo*. Parmi eux, les gènes de la

thymidine kinase (TK), la ribonucleotide reductase (RR), le virion-host shut off (vhs) et la protéine ICP34.5 ont été très étudiés. La TK est impliquée dans l'optimisation du métabolisme de l'acide nucléique. RR est indispensable à la synthèse de l'ADN viral pendant la réplication dans les neurones en convertissant les rNTPs en dNTPs. Vhs déstabilise l'ARN cellulaire et viral, aboutissant à l'accumulation de gènes précoces durant la phase lytique. ICP34.5 est essentiel à la pathogénicité du virus en empêchant l'arrêt de la transduction qui prend place dans les cellules infectées par un mécanisme antiviral empêchant la réplication. ICP34.5 est également impliqué dans le packaging et l'évasion des virions des cellules infectées de manière type cellulaire dépendant. Les vecteurs HSV ont été testés comme vaccin viral, comme virus oncolytique et comme vecteur pour délivrer des transgènes au système nerveux (Argnani, Lufino et al. 2005).

- **Les vecteurs amplicons**

Les vecteurs amplicons (Kwong and Frenkel 1984) sont des particules HSV-1 identiques au type sauvage au niveau structurel, immunologique et tropisme, mais qui portent un plasmide ADN sous forme de concatémère, nommé le plasmide amplicon, à la place du génome viral. Le plasmide amplicon est un plasmide standard *escherichia coli* portant une origine de réplication et un signal d'emballage de HSV-1 en plus du transgène. L'intérêt majeur des vecteurs amplicons est qu'ils ne portent aucun gène viral et ne synthétisent donc aucune protéine virale. Ces vecteurs ne sont donc pas toxiques pour l'organisme. L'absence de virion permet de substituer la quasi totalité des 153 kbp du génome viral par l'ADN étranger. Aucun autre vecteur viral ne permet de transférer une si grande quantité d'ADN dans le noyau. L'absence des gènes viraux réduit les risques de réactivation, complémentation ou de recombinaison avec les virus HSV latents. D'un autre côté, il est plus difficile d'obtenir des amplicons en grande quantité comparé aux vecteurs recombinants non réplicatifs. Il est aujourd'hui impossible de transduire des cellules quiescentes et en division avec des virions. Ces amplicons sont utilisés dans un contexte neurobiologique, mais aussi dans des myoblastes, des myotubes (Wang 2006), des cardiomyocytes (Ferrera, Cuchet et al. 2005), des hépatocytes (Muller, Saydam et al. 2005) et des cellules dendritiques (Willis, Bowers et al. 2001) et des lignées cellulaires dérivées de cancers murins et humains.

5.3.5) Les limites du transfert de gène

a) Intégration du vecteur

Comme nous l'avons vu précédemment, les vecteurs viraux capables de s'intégrer au génome de la cellule hôte (rétrovirus, lentivirus) le font de manière aléatoire ou quasi-aléatoire dans la cellule cible. Cette intégration comporte plusieurs désavantages. 1) Plusieurs copies du transgène peuvent s'intégrer dans le génome et provoquer une mutation. Cette mutation peut avoir plusieurs conséquences chez l'organisme telle la mort cellulaire ou, plus grave, la formation de cellules malignes, comme il l'a été décrit chez l'Homme (Hacein-Bey-Abina, von Kalle et al. 2003). Le choix du type de vecteur utilisé peut s'avérer déterminant, ainsi l'utilisation de vecteurs non intégratifs tels les Adéno, HSV et AAVr permet d'éviter ce problème. 2) L'intégration aléatoire du transgène peut également avoir des conséquences sur la stabilité de son expression (allant de l'absence d'expression à la surexpression du transgène). Il est difficile de contourner ces effets, car même l'inclusion du promoteur propre du gène peut être supplanté par la chromatine environnante de la cellule hôte.

b) Les promoteurs inducibles

Pour pouvoir contrôler l'expression du transgène, les techniques de transfert de gène nécessitent un système de régulation. Cette approche pourrait permettre d'éviter les effets secondaires liés à une expression trop importante, ou de permettre l'arrêt de l'expression du transgène lorsque l'effet désiré est atteint. Les trois principaux systèmes inducibles sont les systèmes régulés par la tétracycline, les stéroïdes (ex : le tamoxifène) et la rapamycine.

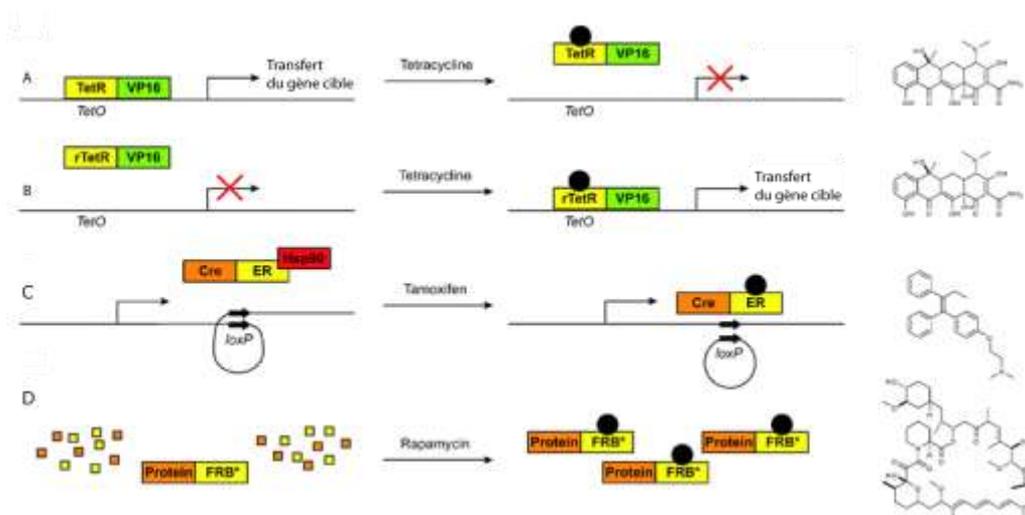


Figure 36. Les systèmes d'expression inducibles

D'après (Shestopalov and Chen 2008)
A-B) le système Tétracycline C) le système Tamoxifène (stéroïdes) D) le système Rapamycine.

A) Dans le système TetOff, la protéine chimérique tTa est composée du répresseur de la protéine tétracycline TetR et du transactivateur viral VP16. En absence de la tétracycline, la protéine tTA se fixe au TRE,

qui est fusionné avec un promoteur minimal CMV, et permet l'expression du transgène. En présence de la tétracycline, la protéine tTA ne peut interagir avec le TRE, et l'expression du transgène est observée.

B) Dans le système TetOn, le transactivateur rtTA est muté et ne fixe le TRE qu'en présence de la tétracycline, ce qui va permettre l'expression du transgène. En absence de la tétracycline, le rtTA se détache de l'ADN et aucune expression du transgène n'est observée.

C) La recombinaise Cre catalyse la recombinaison entre les séquences loxP. La séquence d'ADN flanquée par les sites loxP est excisée. La fusion de Cre avec le récepteur aux œstrogènes muté ne fixant que l'agoniste synthétique 4-hydroxytamoxifen et non l'œstrogène endogène permet de réguler ce système.

D) Une protéine fusionnée avec le domaine de fixation de la rapamycine se dégrade rapidement, et cette dégradation peut être interrompue par ajout de la Rapamycin ou de son analogue 20-méthylallyl-rapamycin.

Ces systèmes ont été utilisés *in vivo* chez les rongeurs, mais seuls les systèmes tétracycline et rapamycine ont été utilisés dans des modèles de grands animaux (Le Guiner, Stieger et al. 2007). Alors que dans les modèles murins, ces deux systèmes ont permis une régulation stable du transgène, les grands animaux développent une réponse immune médiée contre les protéines impliquées dans ces systèmes de régulation.

c) La réponse immune dirigée contre le transgène

Le problème de la réponse immune dirigée contre le transgène exogène est rencontré dans de nombreux modèles *in vivo*. De manière similaire à la protéothérapie, la réponse humorale joue un rôle prépondérant en l'absence d'une immunité dirigée directement contre le vecteur. Par exemple, l'administration intramusculaire du facteur IX humain (FIXh) (Fields, Kowalczyk et al. 2000) a induit la production d'anticorps dépendant des lymphocytes Th, d'isotype IgG1 mais aussi IgG2, en absence d'une réponse cellulaire. D'autres études ont montrées que l'administration du FIXh par adénovirus, a activé des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du FIXh, induisant la destruction des cellules musculaires transduites avec le FIXh et la génération d'anticorps spécifiques du transgène (Dai, Schwarz et al. 1995) (Kay, Landen et al. 1994). Le risque de l'apparition d'une réponse immune contre le transgène dépend de nombreux facteurs comme le type et la dose du vecteur, la cassette d'expression, la spécificité tissulaire du promoteur, le type et le niveau d'expression du transgène, la voie d'administration, le type de cellules transduites.

Pour éviter cette réponse immune, plusieurs aspects doivent être améliorés: 1) Utiliser des vecteurs moins immunogéniques. 2) Utiliser une cassette d'expression sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un type tissulaire et limiter l'expression aux cellules cibles et non aux CPA. 3) Utiliser un transgène moins immunogénique par le biais de mutations des épitopes immunogéniques 4) Produire une quantité suffisante du transgène afin d'induire une tolérance. Les méthodes d'immunomodulation utilisées en transplantation sont couramment utilisées en transfert de gène.

Les stratégies immunosuppressives visant à éliminer ou réduire les populations lymphocytaires en utilisant le Tacrolimus (cible la différenciation et la prolifération des lymphocytes T), la ciclosporine A (bloque les signaux liés au TCR), la Rapamycine (inhibe mTOR, cf Figure 8), le MMF (anti prolifératif B et T) ont donnés des résultats encourageants, pouvant induire l'expression du

transgène pendant plusieurs années (Arruda, Stedman et al. 2005). Cependant, de la même manière qu'en transplantation, l'administration de ces immunosuppresseurs possède des effets secondaires importants comme l'augmentation de la susceptibilité aux infections, le développement de cancers... Ainsi, de manière similaire à ce qui se passe en transplantation, l'induction d'une véritable tolérance pour le transgène est une étape importante du transfert de gène *in vivo*.

5.4. Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non viraux sont peu immunogènes, permettent donc des administrations répétées, la cassette d'expression n'a pas de limite théorique. De plus ils ont un coût de production moindre.

5.4.1. L'ADN nu

En 1990, Wolff et al. ont montré qu'un ADN nu injecté directement dans le muscle permet une expression efficace et pendant plusieurs mois du transgène par les fibres musculaires (Wolff, Malone et al. 1990). La molécule d'ADN proprement dite ne provoque pas de réponses immunitaires spécifiques, mais la présence sur les plasmides de séquences bactériennes riches en motifs CpG non méthylés favorise *in vivo* les réponses inflammatoires et immunitaires (Krieg 1999). L'ADN nu possède une faible efficacité de transfection qui est généralement limitée au site d'injection du plasmide. Les niveaux d'expression obtenus restent trop faibles pour obtenir un effet thérapeutique pour des applications autres que vaccinales. L'utilisation systémique est aussi problématique car l'ADN nu plasmidique est rapidement dégradé par les nucléases (Mahato 1999) et à une demi-vie très courte (Mahato, Takakura et al. 1997). La nécessité d'améliorer cette technique a conduit au développement de divers types de vecteurs synthétiques.

5.4.2. Les vecteurs synthétiques

Les deux types de vecteurs synthétiques les plus développés sont les lipides cationiques et les polymères cationiques formant des complexes avec l'ADN chargé négativement par interactions électrostatiques. Ces complexes favorisent le transfert de l'ADN à l'intérieur de la cellule, mais les mécanismes sont encore mal connus. Les deux principales hypothèses impliquent soit la voie de l'endocytose (Zhou and Huang 1994), soit la fusion du complexe avec la membrane plasmique suivie de la libération de l'ADN dans le cytoplasme (Felgner, Gadek et al. 1987).

a) Les polymères cationiques

Les polymères cationiques sont des molécules riches en groupements protonés à pH physiologique, ce qui permet une association à l'ADN par des interactions électrostatiques multiples. Les complexes formés favorisent l'interaction avec la membrane plasmique notamment par l'interaction avec les protéoglycanes présents sur la face externe de la membrane (Mislick and Baldeschieler 1996). La pénétration des complexes se fait par endocytose non spécifique (Godbey, Wu et al. 1999). Les lipides cationiques sont faiblement protonés à pH neutre, et dans les vésicules endosomales, où le pH diminue, la protonisation des complexes polyamines s'effectue, induisant un influx d'ions Cl⁻ dans la vésicule, et donc une entrée d'eau, l'éclatement de la vésicule et la libération des complexes dans le cytoplasme (Thomas and Klibanov 2003). Le polyplexe (polymère cationique) est ensuite transloqué dans le noyau où il libère l'ADN qui sera traduit.

b) Les dendrimères

Les dendrimères sont des structures proches des polymères cationiques mais présentant de nombreux branchements. Ils peuvent interagir avec l'ADN par interaction de charges pour former des complexes stables (Kukowska-Latallo, Bielinska et al. 1996). La condensation confère à l'ADN une résistance à la digestion par les nucléases sans empêcher la transcription du gène (Chiou, Tangco et al. 1994).

c) Les lipides cationiques

Les lipides cationiques sont des molécules monomériques amphiphiles comportant 3 parties : une tête polaire chargée positivement permettant la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes et un domaine de liaison séparant les deux éléments. Tout comme les polymères cationiques, les lipides cationiques interagissent spontanément avec les charges négatives de l'ADN qui est alors condensé (Felgner, Gadek et al. 1987). L'efficacité du transfert dépend du rapport de charge ADN/charges positives du lipide; lorsque ce rapport est proche de 1, les charges sont neutralisées et les complexes s'agrègent, ce qui défavorise la transfection *in vivo*. La charge nette positive du lipoplexe (complexe lipidique cationique) va favoriser le rapprochement avec la membrane plasmique et l'endocytose (Wrobel and Collins 1995). Il semblerait que les endosomes contenant les lipoplexes fusionnent entre eux pour former de larges vésicules. L'ADN doit ensuite gagner une position intranucléaire où il se dissocie du lipide cationique. Les lipoplexes possèdent cependant une certaine toxicité vis-à-vis des cellules cibles du transfert de gènes dépendant du rapport de charges électriques entre le lipide et l'ADN, le type de lipide utilisé et la dose administrée (Crook, McLachlan et al. 1996).

6. Le transfert de gène en allo-transplantation

6.1. Atténuation des conséquences néfastes de l'ischémie-reperfusion du greffon

Les problèmes induits par l'ischémie-reperfusion du greffon sont une cause non immunologique importante de la perte précoce de l'organe greffé. Elle induit la formation des espèces réactives dérivées de l'oxygène par les cellules endothéliales endommagées, pouvant induire la mort cellulaire à l'intérieur du greffon, et favoriser le rejet aigu ou chronique en activant les cytokines et les molécules d'adhésion qui vont recruter les leucocytes.

La superoxyde dismutase est capable de neutraliser les radicaux libres de l'oxygène en convertissant le superoxyde en hydrogène peroxyde. Ce dernier est secondairement soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase soit transformé en eau par des peroxidase. Chez la souris, le transfert du gène codant pour la superoxyde dismutase dans le foie a permis de réduire les dommages liés à l'ischémie-reperfusion en inhibant l'activation oxydation dépendante de NFκ-b et AP1, qui sont des facteurs de transcription communs aux voies de signalisation répondant au stress oxydatif (Zwacka, Zhou et al. 1998).

L'apoptose joue un rôle important dans l'altération de l'organe et le rejet et la surexpression de gènes anti-apoptotiques dans l'allogreffe peut prévenir l'apoptose liée à l'ischémie/reperfusion. Le transfert de Bcl2 dans le foie d'une souris à l'aide d'un adénovirus recombinant avant le prélèvement diminue significativement les dommages des hépatocytes et le nombre de cellules en apoptose (Bilbao, Contreras et al. 1999). Le transfert d'un autre gène anti-apoptotique par vecteur adénoviral, bcl-xl, permet de protéger le cœur dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat (Huang, Ito et al. 2003). Les interactions Fas/FasL sont impliquées dans la voie de l'apoptose et sont capables d'éliminer les lymphocytes T activés. Le transfert de FasL induit l'apoptose chez les lymphocytes alloréactifs portant Fas et le transfert du gène FasL par un adénovirus est capable de promouvoir la survie d'un greffon rénal (Swenson, Ke et al. 1998), d'un greffon hépatique (Adachi, Fujino et al. 2006) chez le rat, d'un greffon cardiaque chez la souris (Zuraff-Perryman, Duke et al. 2002) ou d'une greffe de chondrocytes chez le cochon (Xie, Wang et al. 2008). Néanmoins, une étude a montré que l'expression de FasL dans les îlots de Langherans chez la souris accélère le rejet de la greffe par les neutrophiles (Kang, Schneider et al. 1997). A20 inhibe l'activation de NF-κB et la surexpression de cette molécule dans des îlots pancréatiques de rat avant la greffe permet de protéger les cellules de l'apoptose et donc de préserver la masse des cellules bêta ainsi que leur fonction (Grey, Longo et al. 2003).

Les protéines de choc thermique (HSP) sont physiologiquement surexprimées en réponse à l'ischémie/reperfusion. Dans des cœurs de rats, la transfection du gène HSP-70 à l'aide d'un liposome a été associée avec l'atténuation des dommages liés à l'ischémie/reperfusion (Jayakumar, Suzuki et al. 2001). De la même manière, le transfert du gène HSP70 à l'aide d'un adénovirus diminue l'ischémie/reperfusion en autogreffe pulmonaire chez le rat (Hiratsuka, Mora et al. 1999) et, en

utilisant un liposome, améliore la viabilité du greffon rénal préservé à froid (Kita, Kobayashi et al. 2003).

L'hème oxygénase (HO) dégrade l'hème en biliverdine, libérant du monoxyde de carbone (CO) et du fer. La biliverdine est ensuite convertie en bilirubine par la biliverdine réductase. HO-1 possède des propriétés cytoprotectrices liées aux produits de dégradation : en faible quantité, le CO possède des capacités vasodilatatrices, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires alors que les pigments biliaires (bilirubine et biliverdine) possèdent des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Le transfert du gène HO-1 a montré des capacités protectrices sur le greffon chez le rat dans des modèles de greffe de rein (Blydt-Hansen, Katori et al. 2003), de cœur (Tsui, Wu et al. 2003), d'îlots pancréatiques (Li, Li et al. 2006) et d'aortes (Du, Chang et al. 2007).

6.2. Le blocage de la costimulation

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitres 3.1.1.b et 3.2.2.), l'administration systémique de CTLA4-Ig ou de CD40-Ig est capable d'induire la survie à long terme de la greffe. L'expression locale de CTLA4-Ig a été testée en utilisant un vecteur adénoviral dans un modèle de greffe hépatique chez le rat et a induit une survie indéfinie du receveur liée à l'induction d'une tolérance spécifique au donneur (Olthoff, Judge et al. 1998). Cette méthode a également permis de prolonger la survie du greffon dans des modèles allogreffe cornéenne (Gong, Pleyer et al. 2006), d'îlots de pancréas (Laumonier, Potiron et al. 2003), cardiaque (Guang-Lin, Hayashi et al. 1998). La perfusion *ex vivo* d'un cœur de rat avec un adénovirus codant pour CTLA4-Ig est capable d'induire une survie indéfinie du greffon chez le receveur (Yang, Rostami et al. 1999). Néanmoins, l'expression locale de CTLA4-Ig dans le greffon d'îlots de Langherans n'est pas suffisante pour induire une survie indéfinie, et l'expression systémique semble plus efficace pour induire une survie à long terme du greffon (Laumonier, Potiron et al. 2003; Potiron, Chagneau et al. 2005).

Notre équipe a démontré que l'injection d'un adénovirus codant pour CD40-Ig dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat induit une survie indéfinie du greffon et l'induction de lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} capables de transférer cette tolérance (Guillonnet, Hill et al. 2007). L'adénovirus codant pour CD40-Ig est également capable d'améliorer la survie dans des modèles de greffe hépatique (Chang, Liu et al. 2002), d'îlots de pancréas en allo et xenotransplantation (Potiron, Chagneau et al. 2005; Rehman, Bertera et al. 2007). Cette stratégie protège également des conséquences néfastes de l'ischémie/reperfusion dans un modèle hépatique chez le rat (Ke, Shen et al. 2004). L'utilisation d'un anti-ICOS (chapitre 3.1.2.) en association avec l'adénovirus CD40-Ig induit une diminution significative des lésions de rejet chronique (Guillonnet, Aubry et al. 2005). Néanmoins l'expression seule de ICOS-Ig à l'aide d'un adénovirus n'est pas suffisante pour prévenir le rejet d'allogreffe dans un modèle de transplantation de cornée chez le rat (Fabian, Gong et al. 2007). L'utilisation d'un adénovirus codant pour PD-L1.Ig (chapitre 3.1.3.) prolonge la survie du greffon dans un modèle de greffe cardiaque chez le rat (Dudler, Li et al. 2006).

6.3. Inhibition des molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion favorisent le contact des lymphocytes T avec les CPA et permettent l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium. La transfection d'un cœur de rat avec un oligodeoxynucleotide antisens de ICAM-1 en combinaison avec un anticorps anti-LFA-1, prévient le rejet d'allogreffe chez les rongeurs (Poston, Mann et al. 1999). L'administration d'un adénovirus codant pour sICAM-Ig prolonge significativement la survie d'îlots de pancréas dans un modèle d'allogreffe murin lorsqu'ils sont injectés de manière systémique mais pas lorsqu'ils sont injectés *ex vivo*, l'examen des îlots montre la présence d'un infiltrat mononucléé suggérant que l'infiltrat lymphocytaire T alloréactif n'a pas été altéré (Barrou, Bertry-Coussot et al. 2002).

6.4. Les cytokines pro-inflammatoires et immunomodulatrices

TNF- α et IL-1 agissent de concert pour activer les lymphocytes T et les cellules vasculaires et déclencher l'inflammation. Cibler le récepteur du TNF- α à l'aide d'un adénovirus TNFRp55-Ig diminue l'inflammation en allogreffe cardiaque (Ritter, Schroder et al. 2000) et favorise la survie des îlots pancréatiques dans un modèle d'allogreffe chez la souris (Yoshizumi, Yonemitsu et al. 2006). Le transfert d'un TNF- α antisens prolonge la survie dans un modèle de greffe hépatique (Yoshizumi, Yonemitsu et al. 2006) chez le rongeur. De plus, l'administration d'un cocktail d'adénovirus codant pour TNFRp55-Ig, IL-12p40 et vIL-10 *ex vivo* dans un rein de rat améliore la fonction du greffon alors que l'injection d'un adénovirus codant pour l'IFN- γ accélère l'inflammation et le rejet chronique (Yang, Reutzel-Selke et al. 2003). IL-1b est un médiateur important de l'inflammation du greffon, et son inhibition par le transfert du gène codant IL-1R2-Ig via un adénovirus atténue le rejet d'allogreffe cardiaque chez le rat (Simeoni, Dudler et al. 2007).

IL-17 et IL-18 sont des molécules pro-inflammatoires inductibles par l'IFN- γ et font partie de la réponse Th17 et Th1. L'utilisation d'un adénovirus codant pour une protéine liant l'IL-18, IL-18BP-Ig, améliore légèrement la survie du greffon dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Dudler, Simeoni et al. 2007). De la même manière, le transfert du gène codant pour la forme soluble du récepteur à l'IL-17, la protéine IL-17R-Ig, prolonge la survie d'une greffe cardiaque chez le rat (Li, Simeoni et al. 2006). L'inhibition des cytokines pro-inflammatoires semble donc ralentir le rejet mais ne permet pas de l'abroger.

Le transfert du gène codant pour l'IL-10 par différentes techniques (ADN nu, rétrovirus, HSV, adénovirus, lipoplexe) prolonge significativement la survie du greffon dans des modèles d'allogreffe cardiaque chez le rongeur et le lapin (Qin, Chavin et al. 1995; Qin, Chavin et al. 1996; Brauner, Nonoyama et al. 1997; DeBruyne, Li et al. 1998) ainsi que dans un modèle de greffe de peau en transduisant les lymphocytes T CD4⁺ (Miyamoto, Kaneko et al. 2005) mais n'améliore pas le rejet de greffe dans un modèle d'allogreffe pulmonaire chez le rat (Okada, Zuo et al. 2006). De plus, le transfert du gène IL-4 n'a eu aucun effet significatif dans un modèle d'allogreffe cardiaque (David, Chetrit et al. 2000) et de greffe de cornée chez le mouton (Klebe, Coster et al. 2005). L'injection

systemique ou locale d'un adénovirus codant pour IL-13 atténue les dommages liés au rejet aigu en allogreffe rénale chez le rat (Ke, Shen et al. 2003) et cet effet semble lié à HO-1 et ses propriétés anti-oxydantes. TGF- β est capable de supprimer les lymphocytes T, les lymphocytes B, les neutrophiles, et les cytokines ayant des fonctions pro-inflammatoires. Le transfert du gène TGF- β prolonge la survie en allogreffe cardiaque et hépatique chez la souris (Qin, Chavin et al. 1995; Drazan, Olthoff et al. 1996; Qin, Ding et al. 1996). Néanmoins, TGF- β peut induire la fibrose et semble jouer un rôle dans le rejet chronique. IL-12 est une molécule de la réponse Th1 donc la forme active est un hétérodimère de 70kDa (IL-12p70) formée des sous-unités IL-12p40 et IL-12p35. Il a été démontré que la sur-expression de IL-12p40 bloque l'activité d'IL-12p70 par compétition avec le récepteur de l'IL-12, et réduit donc les réponses Th1 médiés par l'IL-12 (Gillesen, Carvajal et al. 1995). Le transfert du gène IL12p40 n'a pas d'effet sur la prolongation de la survie du greffon en greffe de cornée chez le rat (Ritter, Yang et al. 2007) mais semble efficace chez le mouton (Klebe, Coster et al. 2005).

6.5. Inhibition des chimiokines

Comme nous l'avons vu, les chimiokines sont des molécules sécrétées durant l'inflammation qui permettent le recrutement des lymphocytes ainsi que les leucocytes et jouent un rôle important dans le rejet d'allogreffe (Hancock, Gao et al. 2000). Certains virus sont capables de produire des homologues des cytokines qui inhibent le recrutement des leucocytes, permettant aux virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte. vMIP-II et MC148 sont deux homologues des cytokines encodées par HSV8 et ayant des propriétés antagonistes pour divers récepteurs aux chimiokines. Le transfert du gène codant pour un de ces homologues prolonge significativement la survie dans un modèle de greffe cardiaque chez la souris en diminuant le nombre de lymphocytes cytotoxiques infiltrant le greffon et en inhibant la production d'anticorps. L'utilisation d'un lentivirus ou d'un adénovirus codant pour RANTES (ccl5) muté prolonge légèrement la survie du greffon cardiaque chez le rat et diminue l'inflammation (Vassalli, Simeoni et al. 2006) (Fleury, Li et al. 2006). L'utilisation d'un MCP1 (ccl2) muté dans le même modèle a permis d'obtenir des résultats similaires mais l'utilisation combinée des mutants de MCP1 et RANTES n'a pas d'effet synergique (Fleury, Li et al. 2006). De même que pour les inhibiteurs des cytokines pro-inflammatoires, cette approche améliore la survie du greffon de manière limitée, ce qui est probablement dû à la redondance des voies de signalisation des chimiokines. Néanmoins, les souris déficientes en CCR1 et CCR5 (qui lie RANTES et d'autres chimiokines) ne rejettent pas l'allogreffe cardiaque (Gao, Topham et al. 2000) (Poston, Mann et al. 1999), et l'absence de résultats dans les modèles mentionnés précédemment suggère que l'expression des transgènes n'est pas optimale.

6.6. Prévention du rejet chronique

L'oxide nitrique (NO) est un inhibiteur endogène de la formation des lésions vasculaires. Le transfert du gène codant pour la NO synthase dans l'endothélium de l'artère carotide d'un rat diminue significativement les lésions liées à l'acte chirurgical et la formation de la neointima (von der Leyen, Gibbons et al. 1995). Dans un modèle d'allogreffe aortique chez le rat, l'induction de NO par un

adénovirus codant pour la NO synthase supprime le développement de l'athérosclérose chez les animaux traités ou non à la ciclosporine A (Shears, Kawaharada et al. 1997).

L'apoptose joue également un rôle clé dans le rejet chronique et l'activation de la voie Fas/FasL déclenchée par l'activation des macrophages, induit la mort des cellules vasculaires. Le transfert du gène Fas soluble réduit significativement les lésions arteriopathiques dans un modèle d'allogreffe aortique (Wang, Dong et al. 2002). Des résultats similaires ont été obtenus par le transfert du gène HO-1 en allogreffe cardiaque et aortique (Hancock, Buelow et al. 1998) (Bouche, Chauveau et al. 2002). De plus, l'inhibition spécifique du gène anti-apoptotique Bcl-x à l'aide d'un oligonucléotide anti-sens, prévient la prolifération des cellules musculaires lisses (responsables de l'augmentation de l'intima) et réduit les lésions coronaires en allogreffe chez la souris (Suzuki, Isobe et al. 2000) montrant le rôle protecteur de l'apoptose dans ces mécanismes de prolifération observés dans le rejet chronique.

L'activateur du plasminogène tissulaire (tPA), un facteur fibrinolytique jouant un rôle dans la réparation tissulaire, est sous-exprimé durant le rejet chronique. Le transfert du gène tPA par des liposomes cationiques atténue les lésions athéromateuses en allogreffe cardiaque chez le lapin.

Le facteur de transcription E2F joue un rôle central dans la régulation de multiples gènes du cycle cellulaire capable de favoriser la prolifération des cellules musculaires lisses dans des greffes d'artères coronaires. La transfection *ex vivo* du cœur du donneur avec l'ADN double brin ayant une affinité pour E2F prévient la formation de la neointima jusqu'à 8 semaines chez la souris et le primate (Kawauchi, Suzuki et al. 2000). L'inhibition de la voie de signalisation ERK (extracellular signal-regulated kinase) joue également un rôle important dans la phase effectrice du rejet chronique et l'utilisation d'un oligodeoxynucleotide ERK1/2 antisens est capable d'atténuer l'athérosclérose dans le greffon dans un modèle de greffe d'aorte chez le rat, en inhibant l'infiltrat inflammatoire (Dong, Gong et al. 2006). Il faut également souligner que si le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L par un adénovirus codant pour CD40-Ig prolonge indéfiniment la survie du greffon cardiaque chez le rat sans éviter le rejet chronique (Guillonnet, Hill et al. 2007), l'association d'un traitement anti-CD28 induit une survie à long terme du greffon et l'absence de lésions de rejet chronique chez 60% des animaux (Guillonnet, Seveno et al. 2007).

6.7. Le chimérisme hématopoïétique

La compatibilité CMH en transplantation a été démontrée comme étant bénéfique à la survie du greffon (Rosengard, Ojikutu et al. 1992; Cho, Cecka et al. 1994). Cette compatibilité CMH reste difficile à obtenir en clinique et le transfert d'un ou plusieurs gènes du CMH pourrait permettre d'abroger cette difficulté. Sykes et al. ont démontré que la transduction de la moelle osseuse du receveur avec un gène du CMH du donneur induit une tolérance à l'antigène du CMH correspondant (Sykes, Sachs et al. 1993). La transduction rétrovirale d'un gène du CMH I et la transplantation de la moelle transduite dans une souris irradiée de manière létale prolonge significativement la survie d'une greffe de peau (Bagley et al. 2002). De manière similaire, l'infusion de moelle osseuse transduite par

un rétroviral codant pour le CMH II du donneur chez le porcelet améliore la survie d'une greffe rénale réalisée plusieurs mois après (Sonntag, Emery et al. 2001).

Une moelle osseuse fortement transduite va induire une tolérance centrale par délétion clonale où les lymphocytes T réactifs contre le donneur sont supprimés. Une moelle osseuse plus faiblement transduite peut générer des lymphocytes T régulateurs qui vont induire une tolérance périphérique, et prolonger la survie de l'allogreffe exprimant le CMH du donneur plus d'autres antigènes exprimés par le greffon par un phénomène appelé « suppression liée » (Chen, Cobbold et al. 1996) (Wong, Morris et al. 1997). Les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle important dans la tolérance par chimérisme hématopoïétique et une meilleure compréhension de ces mécanismes est importante.

Cette méthode peut être améliorée par le traitement de la moelle transduite avec un inhibiteur de CD26 tel que la Diprotin A, qui augmente la domiciliation de la greffe. Ainsi, chez la souris, la reconstitution de la moelle du receveur avec une moelle osseuse transduite avec le gène du CMH du donneur après traitement à la Diprotin A améliore la survie d'une greffe de peau (Christopherson, Hangoc et al. 2004). Zangh et al. ont démontré que les vecteurs lentiviraux, capables de transduire les cellules quiescentes, sont plus efficaces que les vecteurs rétroviraux, utilisés dans les premières études, pour obtenir un chimérisme suffisamment long et l'obtention d'une greffe de moelle osseuse exprimant le transgène à long terme (Zhang, Cai et al. 2005). Ces études nécessitent l'ablation du système immunitaire du donneur pour permettre la greffe de la moelle osseuse transduite mais il reste possible d'induire une survie permanente de l'allogreffe sans irradier le receveur en utilisant des anticorps anti-CD4 préalablement à la greffe de moelle osseuse transduite avec un gène du CMH (Wong, Billing et al. 2003).

effet	Gene	Activité Biologique	Vecteur	Modèle	
Atténuation ischémie-reperfusion (chapitre 6.1)	Superoxyde dismutase	Anti-oxydant	ad	Foie (souris)	
	kalikreine	Anti-oxydant	Voir publi	Rein (rat)	
	Bcl2	Anti-apoptotique	ad	Foie (souris)	
	Bcl-xl	Anti-apoptotique	ad	cœur (rat)	
	FasL	Apoptose des T activés	Ad, plasmide, ?	Rein (rat), Foie (rat), cœur (souris), chondrocyte (cochon)	
(chapitre 6.1)	A20	Inhibition NFkB	ad	Ilots (rat)	
	HSP-70	Anti-oxydant	Liposome, ad	Cœur (rat), poumon (rat), rein (rat)	
Blocage costimulation (chapitre 6.2)	CTLA4lg	Blocage CD28/B7	Ad, hydrodynamique	Foie (rat), cornée (rat), ilots (rat), cœur (rat)	
	CD40-Ig	Blocage CD40/CD40L	Ad	Foie (rat), ilots (rat), cœur (rat)	
Inhibition molécules d'adhésion (chapitre 6.3)	PD-L1lg	Blocage PD/PD-L	Ad	Cœur (rat)	
	sICAM-Ig	Blocage ICAM	Ad	Ilots (souris)	
Inhibition des cytokines pro-inflammatoires (chapitre 6.4)	TNFR-Ig	Inibition TNF α	Ad	Cœur (Rat), ilots (souris)	
	TNF α antisens	Inibition TNF α	ADN antisens	Foie	
	IL-1-R2-Ig	Inhibition IL1b	Ad	Cœur (rat)	
	IL-18BP-Ig	Inhibition IL-18	Ad	Cœur (rat)	
	IL-17R-Ig	Inhibition IL-17	Ad	Cœur (souris)	
Cytokine immuno-modulatrices (chapitre 6.5)	IL-10	immunomodulatrice	ADN, retro, HSV, adeno, lipoplexe	Cœur (rat, lapin), peau	
	IL-13	Lié à HO-1	ad	Rein	
	TGFb	Supprime LT, LB, neutro, cytokines pro-I	ADN, retro, adeno	Cœur (souris), foie (souris)	
Inhibition des chimiokines (chapitre 6.6)	IL12p40	Inhibe IL-12	Ad	Cornée (mouton)	
	vMIP-II, MC148	Inhibe CCR et CXCR	ADN	Cœur (souris)	
	RANTES muté	Inhibe CCR5	Ad, lenti	Cœur (rat)	
Atténuation du rejet chronique (chapitre 6.7)	MCP1	Inhibe CCR2	Ad	Cœur (rat)	
	NO	Inhibiteur vasculaires	lésions	Ad	Aorte (rat)
	Fas soluble	Anti-apoptotique		Ad	Aorte (rat)
	HO-1	Anti-apoptotique		Ad	Cœur (souris), aorte (rat)
	Bcl-x antisens	Pro-apoptose, prolifération musculaires lisses	prévient cellules	ADN antisens	Coeur (souris)
	tPA	Atténuation athéromateuse	lésions	Liposomes cationiques	Cœur (lapin)
	E2F decoy	Prévention neo-intima		ADN double brin	Coeur (souris), Coeur (primate)
Chimérisme hématopoïétique (chapitre 6.8)	ERK1/2 antisens	Inhibition phase effectrice	ADN antisens	Aorte (rat),	
	CMHI, CMH II	chimérisme	Retro, lenti	x	

Tableau 6. Liste non exhaustive des différentes études utilisant le transfert de gène dans des modèles expérimentaux de transplantation (cf texte)

**Caractérisation de lymphocytes T régulateurs
CD8⁺CD45RC^{low} induits par un adénovirus CD40-Ig dans un
modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat**

Matériels et méthodes

1. Modèle animal

1.1. Les souches de rat utilisées

Dans notre modèle d'allogreffe cardiaque, nous utilisons des souches de rats congéniques de fond génétique Lewis. Les donneurs et les receveurs sont des rats mâles adultes âgés de 8 à 12 semaines qui diffèrent par l'ensemble du CMH (classe I, classe II et classe I like). Chez le rat, les antigènes d'histocompatibilité sont codés au niveau du locus RT1 du chromosome 20 qui comprend les régions A, B, C, D, E et H. Dans notre modèle, le donneur est d'haplotype RT1^u (Lewis 1W) et le receveur est d'haplotype RT1^a (Lewis 1A). (CERJ, Le Genest St. Isle, France).

1.2. La greffe cardiaque

La transplantation cardiaque est réalisée selon la technique décrite en 1969 par Ono et Lindsey (Ono and Lindsey 1969). Brièvement, le greffon cardiaque est prélevé sur le donneur sous anesthésie (isoflurane/oxygène) après ligature des veines caves inférieures et supérieures ainsi que des veines pulmonaires. Le greffon est extensivement lavé avec du sérum physiologique hépariné, puis conservé à 4°C dans ce milieu jusqu'à la greffe. Il est ensuite placé en position hétérotopique intra-abdominale et transversale chez le receveur. Le greffon est revascularisé par des anastomoses termino-latérales entre l'aorte du greffon et l'aorte abdominale du receveur et entre la veine pulmonaire du donneur et la veine cave inférieure du receveur. La durée de la greffe est d'environ 30 à 40 minutes et est réalisée par le personnel technique du laboratoire. La position du greffon permet de surveiller facilement son fonctionnement par simple palpation à travers la paroi abdominale. Une échelle arbitraire de battements (de 0 à +++) définit l'état du greffon et le rejet est déterminé par la cessation des battements confirmée après laparotomie .

1.3. Technique d'injection

Sous poste de sécurité microbiologique, le virus est dilué dans une solution de lactate de Ringer stérile (volume final 150 µl) puis injecté en quatre points de l'apex du greffon cardiaque pour une injection intra-myocardique ou dans la veine porte pour une injection intra-portale. Les battements du cœur sont contrôlés avant la suture de la paroi abdominale. Tous les animaux sont placés dans des modules à air filtré et en pièce dépressurisée à accès réglementé avec sas d'entrée (A2).

L'adénovirus de sérotype 5 d'origine humaine a été choisi comme vecteur. Le génome de ce vecteur est délété pour les régions précoces du cycle de réplication virale E1 et E3, ce qui permet d'insérer des séquences exogènes allant jusqu'à 7 kb. L'adénovirus CD40-Ig (AdCD40-Ig) code pour une molécule recombinante CD40 de souris couplée au fragment Fc de l'IgG1 humaine, placées sous le contrôle d'un promoteur cytomégalovirus (CMV). AdCD40-Ig nous a été fourni par le Pr. Löwenstein et la production a été faite à l'INSERM UMR649 dirigée par le Dr. Moullier à Nantes. Seule la région charnière (hinge) et les domaines CH2 et CH3 de la chaîne lourde de l'IgG1 sont présents. La présence de la région charnière permet la formation de dimère.

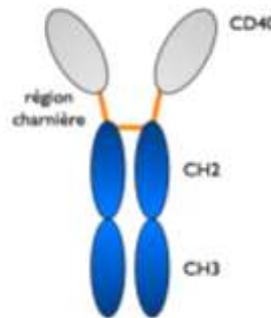


Figure 37. Représentation schématique de la protéine recombinante CD40-Ig

En bleu, le fragment Fc composé des domaines constants CH2 et CH3, et la région charnière de la chaîne lourde de l'IgG1 humaine. Les homodimères sont reliés entre eux par des ponts disulfures. En gris, la partie extracellulaire du CD40.

La présence du fragment Fc permet d'augmenter le poids moléculaire de la protéine CD40 et confère une durée de vie plus longue. Les IgG ne sont pas éliminées par le rein et sont recyclées dans la circulation via les récepteurs FcRn présents sur les cellules endothéliales (Salvetti, Oràve et al. 1998).

3. Tri cellulaire

3.1. Isolation des lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ et $CD4^+CD25^-$

Après isolation par lyse hypotonique, les splénocytes sont déplétés de plusieurs sous-populations leucocytaires, les macrophages, lymphocytes B, les lymphocytes T $CD4^+$ et les NK en utilisant un tri négatif avec des anticorps anti-CD11b/c (OX42), anti-CD45R (His24), anti-CD4 (W3/25), anti-CD161 (NKR-PA1, 3.2.3), suivis d'une incubation avec des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-IgG de souris. On obtient ainsi une population enrichie en lymphocytes T $CD8^+$. Les cellules sont ensuite marquées avec les anticorps monoclonaux anti-CD8a (OX8, PE) et anti-CD45RC (OX22, FITC). Les lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ sont triés à l'aide d'un FACS Aria (BD). La pureté des populations cellulaires est systématiquement supérieure à 98%. 2-4,5 millions de lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ sont obtenus par rate.

Alternativement, pour obtenir des cellules T CD8⁺CD45RC^{low} et les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ du même animal, les splénocytes sont déplétés des mêmes sous-populations leucocytaires à l'exception des CD4⁺. Les cellules sont ensuite marquées avec les anticorps monoclonaux anti-CD3 (G4.18, FITC), anti-CD8a (OX8, PE), anti-CD45RC (OX22, biotynilé), anti-CD25 (OX39, APC). L'anticorps biotynilé est visualisé à l'aide de la streptavidine-PerCP-Cy7.

3.2. Isolation des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Pour isoler les pDC, la rate est digérée avec la collagénase D avant d'extraire les splénocytes qui sont déplétés de plusieurs sous-populations lymphocytaires à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-TCR (R7/3), anti-chaîne kappa (OX12), anti-CD8 (OX8), anti-CD45RA (OX33). Les cellules sont ensuite marquées avec les anticorps monoclonaux anti-CD4 (OX35, Alexa 647), anti-CD45R (His24, PE), anti-TCR (R7/3, Alexa 488). Les pDC TCR⁻CD4⁺CD45R⁺ sont triées.

4. Puces à ADN et PCR quantitative

4.1. Principes des puces à ADN

La technologie des puces à ADN est basée sur le principe d'hybridation développé par Southern (Southern 1974). Ce principe stipule que deux fragments d'acides nucléiques complémentaires peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'action de la chaleur et de la concentration saline du milieu. En pratique, il s'agit de déposer sur une surface de quelques centimètres carrés des fragments synthétiques d'ADN (sondes) espacés de quelques micromètres et représentatifs de chacun des gènes étudiés. Ce micro-dispositif est ensuite mis au contact des acides nucléiques à analyser au cours de l'étape d'hybridation. Ces acides nucléiques, appelés cibles, correspondent aux ARN messagers (ARNm) ou aux ADNc qui ont été préalablement couplés à un marqueur fluorescent ou chemoluminescent. Ce contact entre cibles et sondes conduit à la formation d'hybrides quantifiés grâce à la lecture des signaux fluorescents ou chemiluminescents. Depuis leur apparition, les puces à ADN suscitent un intérêt croissant, comme l'atteste l'explosion du nombre de publications qui leur sont relatives (Figure 38).

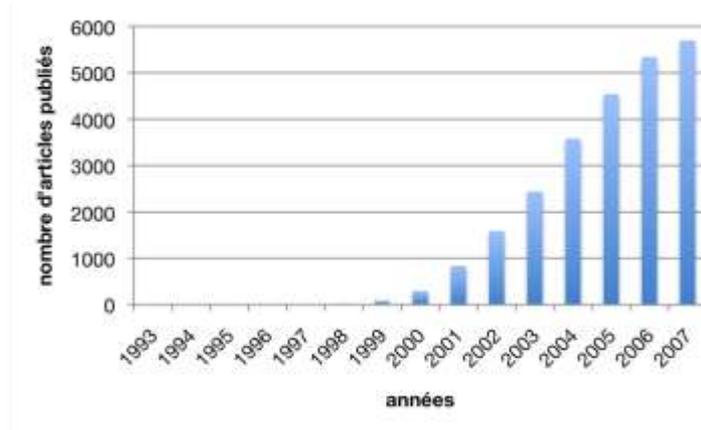


Figure 38. Nombre de publications concernant les puces à ADN de 1993 à 2007 (Medline)

Classiquement, l'étude du niveau d'expression des gènes est basée sur la détermination des variations de niveau d'expression entre deux conditions différentes. Il s'agit donc d'une mesure différentielle de l'expression des gènes. Dans notre cas, les cibles sont marquées à la digoxigénine. Elles sont ensuite mélangées et hybridées sur la puce (Figure 39). Après hybridation, la digoxigénine est révélée à l'aide d'un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline. A l'aide d'un substrat chimiluminescent, la mesure de la lumière produite permet de calculer l'expression de chaque gène dans une condition donnée. Finalement, la mesure de l'expression de ce gène dans une autre condition permet d'obtenir le rapport des intensités et l'expression différentielle de ce gène entre deux conditions données. Contrairement aux technologies utilisant des fluorochromes, la chimiluminescence ne nécessite pas d'excitation et permet de réduire le bruit de fond, ce qui améliore les valeurs signal/bruit et permet une détection plus sensible.

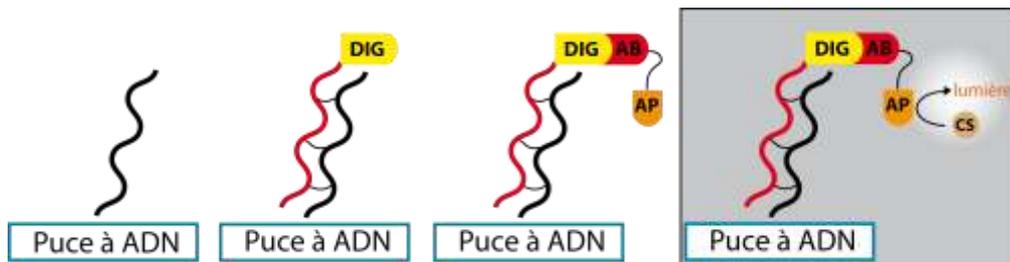


Figure 39. Hybridation et révélation des puces Applied Biosystems

DIG : Digoxigenin ; AB : anticorps anti-digoxigenin ; AP : Phosphatase Alkaline ; CS : substrat chimiluminescent.

4.2. Application à la caractérisation de lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}

L'ARN des lymphocytes T CD8⁺ CD45RC^{low} triés à partir d'animaux naïfs et tolérants CD40-Ig (environs J100) est extrait en utilisant la méthode au Trizol. La qualité et la quantité de l'ARN sont systématiquement déterminées en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) et le bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). Les puces à ADN « Rat Genome Survey Microarray » (Applied Biosystems) sont utilisées pour analyser le transcriptome des lymphocytes T CD8⁺ CD45RC^{low}. Ces puces contiennent 26 857 sondes de 60 nucléotides, ce qui représente 27 088 gènes et couvre 43 508 transcrits. 3400 spots sont utilisés comme contrôle afin de couvrir l'ensemble des variations obtenues suite au processus d'hybridation. Les cRNA marqués à la digoxigénine UTP sont générés et amplifiés à partir de 0.5 µg d'ARN total pour chaque échantillon en utilisant un kit (Applied Biosystems NanoAmp chemiluminescent reverse transcriptase-*in vitro* transcription (RT-IVT)). La détection par chemiluminescence, l'acquisition et l'analyse de l'image sont réalisées en utilisant l'analyseur Applied Biosystems 1700 Chemiluminescence Microarray Analyzer.

Le logiciel Genespring (Agilent Technologies) est utilisé pour extraire les valeurs des signaux et des ratios signal/bruit (S/N). Une normalisation inter-puces en fonction des groupes d'échantillons manipulés simultanément est réalisée au 50e percentile en utilisant les gènes dont le signal est considéré comme fiable. Une normalisation entre gène est ensuite réalisée entre tous les échantillons en utilisant la médiane des signaux mesurés. Un script basé sur un t-test ($p=0.02$) réalisé par rapport à la médiane d'expression des gènes entre les différents échantillons permet d'éliminer les gènes dont les différences ne sont pas significatives (Figure 40). Les gènes sont ensuite classés par un graphique en "volcan" (Figure 41). Le taux de variation de l'expression des gènes (Fold Change FC) correspond au ratio entre l'intensité du signal du gène obtenu chez des rats tolérants sur l'intensité du signal de ce même gène obtenu chez les rats naïfs. Le FC est calculé pour chaque gène remplissant les critères de significativité, soit $p<0.05$ et un $FC>2$. Les informations sont traitées sur le site www.pantherdb.org. Les gènes sont identifiés en utilisant le logiciel Panther Protein Classification System Probe ID et classés selon leur voie de signalisation, leur fonction moléculaire et leur processus biologique.

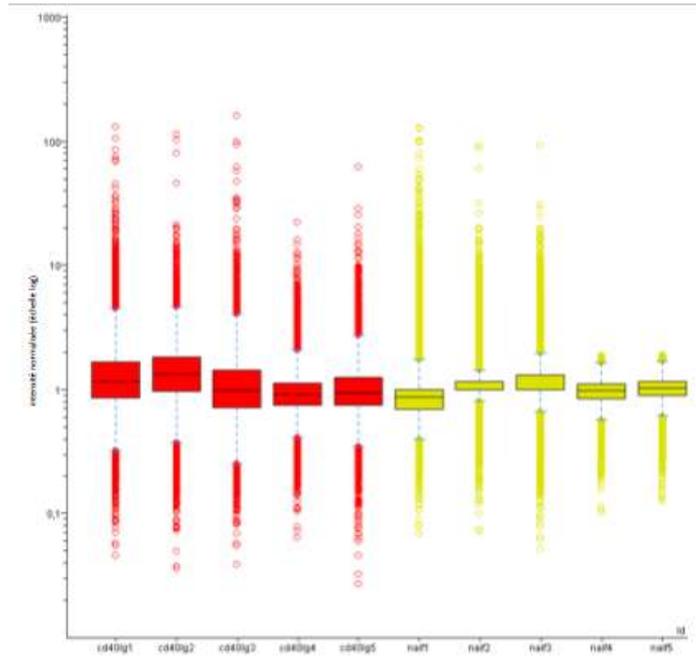


Figure 40. Représentation normalisée de la répartition des 14195 gènes ayant passé le 1er filtre pour chaque puce

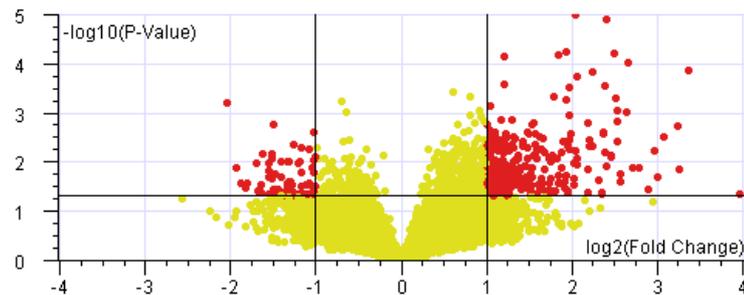


Figure 41. Graphique en "volcan" des 14195 gènes

Abscisse : Fold Change FC. Ordonnée : p du t-test. En rouge : gènes différentiellement exprimés, avec $p < 0.05$ et un $FC > 2$.

4.3. Confirmation par PCR quantitative

La confirmation des résultats obtenus par l'analyse des puces à ARN est effectuée par PCR quantitative. En raison de la faible quantité d'ARN obtenue à partir des cellules CD8+CD45RClow (0,6–2 ug), l'ARN a été amplifié linéairement à l'aide du kit « SuperScript RNA amplification system » (Invitrogen). L'ARN amplifié (ARNa) est rétro-transcrit à l'aide du kit MMLV Reverse-Transcriptase (Invitrogen) et quantifié par PCR quantitative par l'ABI PRISM 77000 Sequence Detection System en utilisant le SYBR Green master mix 2. Les amorces de PCR sont conçues à l'aide du logiciel Oligo 4.0-S (Molecular Biology Insights, Inc). Le calcul de l'efficacité des amorces est réalisé à partir de la pente de la régression linéaire expérimentale obtenue par dilution d'un échantillon contrôle (efficacité = $e^{-1/\text{pente}}$). L'HPRT est utilisée comme contrôle endogène pour normaliser l'expression des gènes d'intérêts, ce qui permet de normaliser l'expression du gène d'intérêt (gi) par l'HPRT endogène en appliquant la formule: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = (Ct_{gi} - Ct_{HPRT})_{\text{échantillon}} - (Ct_{gi} - Ct_{HPRT})_{\text{échantillon de référence}}$ (Livak

and Schmittgen 2001). Cette formule suppose que les amorces ont une efficacité égale à 100%. Dans les faits, nous avons sélectionné les amorces présentant une efficacité supérieure à 85% car nous utilisons la PCR quantitative pour comparer l'expression relative d'un gène entre deux états (CD8 Treg non traité Vs tolérant) plutôt que pour effectuer une quantification absolue de l'expression d'un gène dans une condition donnée. Un test de Mann et Whitney unilatéral est réalisé pour déterminer la significativité du différentiel d'expression, un $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

gene	amorce 1	amorce 2
AnnexinA1	ACCCTTCCTTCAATCCGTCC	GCCAAAACAACCTCCTCCAG
asb2	CCTGCTTTTCTGCCTGTATG	TTCTGCCTTCTCCTTGATGACA
bcl2a1	TCCAGAGTGCTACAGAGAGTTGCT	CCATTCTGCTGTATCCATTCTCC
blnk	CGATTCTAAGCAGCCGTACACA	TGACTCACAGCCAGAACACGA
ccl4	TTCCCAACTCAGATCAGCACAAC	GCCACAAGCAGGAGGAGAGAG
CCL5	GCATCCCTCA CCGTCATCCT	TAGTCATCT CCAAATAGTT GAT
CCR2	GCCACCACACCGTATGACTATG	AGCAGGAAGAGCAGGTCAGAGA
ccr5	CCGAATCCTAAGGCATCATATCA	TGTCTCCTCCTCCAGTAAACCT
CD137L	GCTTGGTGTGCTGCTCCTG	TGTGCCAGTTCAGAGTCGTGTTAC
cd1d	AAAGCCTGTGTGGGTGATGTG	AGCGTCTCCTTTTCTGATGATAT
cd74	CAAACCTGTGAGCCCGATG	CCTCCAGTCCAGACCATTTCAT
Cd83_pred	TCAGAGAGTGGCAACGAGAGG	GAAAACGACCAGAGAGAAGAGCA
CD86	ACAGCAAAAAGACACCCACGG	CTTGTTTCATTCTGAGCCTCCTC
cd94	TGATCCACACCGTTCTTTACAAA	CAAAACCTCCCAAAGCAACTATCAA
cd96	TGTATGCTCTGCCTGTTCTG	TATAGTCTTGGTGCCTGTTGGAT
Cdkn1a	GCCAAGATGGTGCCTCGG	CGGAGACAGGGAAGGGACC
CEACAM6 (predicted)	ACCTCAGGCAATAACCGCAT	CCAATAACAGCAGCAGCAC
cflar	TAGGGTGTGCTGATGGAGATT	ATCTTGCTTCTGGCTGGACTG
Col4a1	GATGTTCAAGAAGCCACGC	GGTGTGTAGTTACGCAAATCCC
cxcl10	CCAAGTGTGCTGTCTGTTCTC	CATTGTTCTTTTTCATTGTGGCA
cxcr3	TGCCACCCATTGCCAGTAC	CACCACCACCACCACCT
cystatin7	TCCTCGCCAGATTAACCGTATT	TATTGCTGCTATCATTGTCCCTG
DAPK(predicted)	GCTGTACCAAGGAAACGCT	TCCCACAAAAGCAACCAAAAA
dup2	CTGTGGAATCTTGCCCTACCT	GAAGCCGATAGCCTCCTGG
eomes	GTCTGCCTCTGCCCTTCTGA	CCCTTCCATAGTCCAGACGCC
Faim2	CTGCTGGTGACCTTGGCTG	TGGAAACTGAAGATGGTGACTGA
fas-ligand	GCTCCTCCAGGGTCAGTTTTT	ATTCCAACCAGAGCCACCAG
fasIR	TCGGTTCAGCCACAAGAG	CACAAACTGCGGATTCCAA
fgf18	TGATGTGAGTCGGAAGCAGC	TCTCAATGAACACGCACTCCTT
fgf9	CCTGGTCAGCATTCTGGTG	CCGTTTAGTCTGGTCCCTTCT
fgl2	CAAGAACACAACCAGCAAATCC	CCCAGCCAAAATCTCGTTCAA
galectin3	CACAGTGAAGCCCAACGCAA	TGACCGCAACCTTGAAGTGG
glutaredoxin	TCTGTTGCTGGTTTCTGCC	GGACTTCTGTGGTTGTGGGA
gprc5a	TGCTCTTCTTGATGGTGTGAC	CATCTCAACTGGGTAATCGGTG
granz-c	TGCCATGTGAAGCCAGG	GATCCATCAGTTTTCCCGTAGG
granzK	TGGAGGGAGAGAAGTACAGCC	CTCAGGTGAAGCAGTTGGACA
granzM	CGCTGGTCCCTGCTGCT	TGTTTAATGGCTTGCTTGATGTAGA
icam1	ACCCTGGAGATGGAGAAGACCT	CAGAGCAAAAAGAAGCGTCGTT
ifit2	GAGAGAGAAGGTGGTGATTTTGC	AGATTGAGGAGTGGCTGGTAAAC
IFNg	TGGATGCTATGGAAGGAAAGA	GATTCTGGTGACAGCTGGTG
igh-1a	GTCTTCATCTTCCCGCCAAA	AACTCCTTGCCGCTCATCC
IL12Rb1	CCAGGGACCAGCAAGCACAT	GAGCAAAGCAGCACCACAGGA
il12Rb2	CATCGCTATCATCGTGGTGG	TTGTCTGCCTACTGGGATCATTT
IL18R1	GCATGAAGACAGGAACGAGACAA	CACAAAATCACCACGCACACTG
itgb1	TGCCAACCAAGTGACATAGAGAA	TTCATCAGATCCGTCCAAGA

itgb7	GCCACCAATAAGGAGCGACT	TCCACGGAGAGAGAAGCCAT
Ly49i1/ly49s5/rLy49,9s7	CAACAATACAGAAATCACTCAAGGG	CTCCTCAGGCTTCACTTGGTTC
ly49i4/s3	CCAAAATATGACTGAGCAAGAGGT	TTACCATCAGAACGGAGCAGAG
mafa/klrg1	CCGACCCTGTGTTTCCTACCT	AGTGGCTCCCGTTCCTCATC
MUC4	TGCCCGTATTCAATGCCAC	CTGTCCCGTTGATTTGCCA
myadm	CTGCCTGTCTCTTCCATCA	GACTGCCACACACCATTCCA
Nedd9	TGACATCCCTCCAACCAGCA	CCGAGAGCCTTTAGCATCCG
nkg2a	GGAATGACTGAGATGGAATGGC	TGGTTGGCTTTTGTGCTATGA
NKG2C/klrc2	ACAAAGAAAACCCAGTCGCAGC	CAAACCAGATGATGCCAGGAT
NKG7	CCCATCCCTGTCTGCTCCTG	CCAAACATCCTGCTGACCCTG
NR1D1	CGGTCTACGGCAAGGCAAC	CGCACCATCAGCACCTCAA
oas1	TCAAGGGCAAGTCAGACGC	GAAGCACATCAAACCTCCACCTC
ocil/clec2d	TAGCACGATTTGACACCGAGGA	ACCAAGGACACAAAACCTACAGGCA
poliovirus receptor	TGGCTATGAAGGCAACTGGTAC	CTTTGGCGGCAGAATCTCA
prnp/CD230	GCTAGTCAGGGCTTTGTTTTGG	AGGCGGGAGGCTGTTTTTC
ramp3	GCGTGGAATCATCTCTTGCT	ACCTTGCCTGCCCTCTCTG
Rora	AAAATGTAGTGACTGGCGTAGCTT	AGCAGCATAAATACCTCCCGAC
RT1-Ba	CATGAATTTGATGGTGACGAGG	GTGGAAGGAATGGTCAGGGTT
RT1-Bb	TGGTTGTGCTGATGGTGCTG	CTCCGTCTCCTCGTAGTTGTGTC
RT1-Da	TCAATGTCACCTGGCTTCGG	TTTAGTTTCTGGGAGGAGGGTTTT
RT1-DMb	CCCAGCATCTTCAGGACACC	CTCACCTCAGAAAACACCCGA
S100A11	CGAGTCCCTGATTGCTGTTTTTC	GCTTCTTCATCATGCGGTCCG
s100a4	CAGGCAACGAGGGTGACAA	GCCCAACACTTCATCTGAGGA
S100A6	CAAGCACACCCTGAGCAAGA	ATCTCTGCCTTCCCATTTTATTTTC
sema3g	CCAGCCTGAGGGTGAAGAAGT	CAGTGTGGAGTAAGGGTGCGA
slamf7	TGACAGTGCCAACCTCTCCAT	GCCTTTTCCTTTCCGGTATCCA
socs1	TCCGCTCCCCTCTGATTACC	AGTTCGCTGGCGACTGTC
syntaxin11	CACTAGGCTGAGGGAGAGGG	CCGTGATGCTGAGTGCTATGTA
TGFbR	GCTGCGTCTGGAAGGCTCA	TTGTCGTGGAAGGCTGTGATG
Tiam1	ATCAATAACCGTGCCGCTG	CTCGCCAAGGTCCACAGG
Tieg	TGGGTTAGATGACGAGAAGTGCT	GCTGGTCTCAAGTATAAATGGCAA
tmem23	AATGGGCAGCGGCTCTTAG	AGGACAGTGCCTAAAGAAAGGC
tnfa	CTTATCTACTCCCAGTTCTCTCAA	GAGACTCCTCCCAGGTACATGG
traf1	CTTGAGCAGAGGGTGGTGG	CTTCTTGCCTGAGCCATCCC

Tableau 7. Séquences des amorces utilisées pour la confirmation des résultats obtenus par les puces à ADN

4.4. Extraction et PCR sur les greffons

Les gènes dont l'expression différentielle a été confirmée par PCR quantitative ont été analysés par PCR quantitative au niveau de greffons de rats tolérants ayant reçus une greffe allocardiaque et une injection d'adénovirus CD40-Ig (>3 mois) et de greffon de rats ayant reçu une greffe syngénique (> 3 mois). 100mg du tissu est broyé et l'ARN extrait en utilisant la méthode au Trizol. L'ARN est traité à la Turbo DNase (Agilent technologies), rétro-transcrit et quantifié par qPCR comme décrit précédemment. Un test de Mann et Whitney bilatéral est réalisé pour déterminer la significativité du différentiel d'expression du gène entre les greffons tolérants et syngéniques. Plusieurs autres amorces ont été utilisées, un $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

ccl2	CCACTCACCTGCTGCTACTCAT	TTCTGATCTCACTTGGTTCTGGTC
ccl7	CAACCAGATGGGACCAATTCA	CAGAAAGGACAAGGGTGAGGAA
ccl3	ACCACTGCCCTTGCTGTTCT	CAGGTCTCTTTGGGGTCAGC
cxcl9	CACTGTGGAGTTCGAGGAACC	CGCTTGTTGGTAAAGTGGTCTC
cxcl11	GAGATGAACAGGACGGGCAT	GCCTTCAGGGTAACAATCACTTC
IDO-1	ATCCAGACACCTTTTTCCACG	CAGCAGATCCTTCACCAACG
IL23p19	GGACTCGGACATCTTCACAGG	GGAACGGAGAAGAGAACGCT
IL12p40	TCATCAGGGACATCAAAACC	CGAGGAACGCACCTTTCTG
IL12p35	TGATGATGACCCTGTGCCTT	GCATGGAGCAGGATACAGAGC

Tableau 8. Séquences des amorces complémentaires utilisées dans notre étude

5. mise au point d'un test de suppression *in vitro*

Il est difficile d'analyser les fonctions de nos molécules *in vivo* chez le rat (délai de la réponse, peu d'anticorps disponibles, difficulté d'obtenir des rat KO...). Il est donc important d'avoir un modèle *in vitro* pour pouvoir analyser les fonctions potentielles des molécules mises en avant par l'analyse des puces. Dans ce dessein, un test *in vitro* capable de reproduire les mécanismes suppressifs mis en jeu par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} a été mis au point.

Ce test est une réaction lymphocytaire mixte où les cellules répondeuses sont des lymphocytes T CD4⁺ extraits d'un receveur de la greffe (Lewis 1A) marquées au CFSE et où les cellules stimulantes sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) extraites de la même souche que le donneur (Lewis 1W). Les cellules dendritiques vont présenter les antigènes du donneur au lymphocyte T CD4⁺ du receveur qui va s'activer et proliférer. Lorsque l'on ajoute les lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low} (Lewis 1A). La prolifération des lymphocytes T CD4⁺ est inhibée (données non montrées)

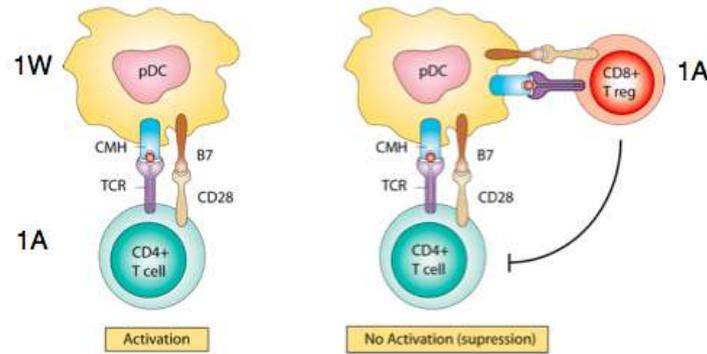


Figure 42. Test de suppression *in vitro*

L'utilisation d'un système de transwell permet de cultiver les cellules en évitant les contacts cellulaires entre elles, mais en ménageant l'effet des protéines qu'elles peuvent sécréter. Le transwell est composé d'une chambre supérieure et d'une chambre inférieure. Dans la chambre inférieure sont cultivées les cellules T CD4⁺ de la souche du receveur (1A) qui vont proliférer au contact des pDC de la souche du donneur (1W). En ajoutant les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'un animal tolérant ou naïf dans la chambre supérieure, les lymphocytes T CD4⁺ prolifèrent normalement. Si on ajoute des pDC du donneur à la chambre supérieure, on observe une diminution de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ situés dans la chambre inférieure (données non montrées). Cette expérience nous apprend deux choses. Premièrement, la suppression médiée par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} sur les lymphocytes T CD4⁺ est indépendante du contact entre ces deux types cellulaires. Deuxièmement, il est indispensable que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} rentrent en contact avec les pDC allogéniques pour induire le mécanisme suppressif.

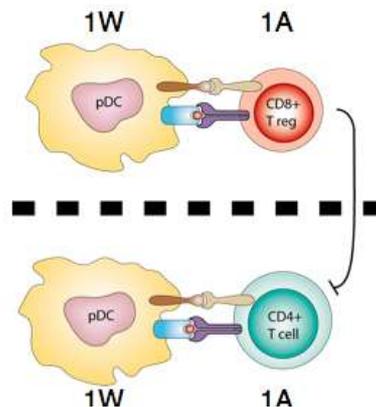


Figure 43. Test de suppression en transwell.

Ce test permet de tester les effets du blocage des molécules mis en évidence par les puces à ADN. D'abord au niveau des molécules potentiellement inhibitrices, et ensuite au niveau des molécules potentiellement impliquées au niveau de l'interaction des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} avec les pDC du donneur.

Resultats

1. Introduction

La régulation des cellules alloréactives par les lymphocytes T régulateurs est un des mécanismes pouvant induire la tolérance en transplantation, c'est-à-dire l'acceptation du greffon en absence d'immunosuppression chronique. Depuis la redécouverte du concept de lymphocyte T régulateur par *Sakaguchi* (ref), la caractérisation des lymphocytes Treg est devenu l'objet de nombreuses études. Plusieurs types de lymphocytes T régulateurs ont émergé dont certains lymphocytes T CD8⁺ (TCD8⁺CD28⁻, TCD8⁺CD122⁺, TCD8⁺αα...cf introduction). Récemment, une nouvelle population de lymphocytes T CD8⁺ régulateurs naturels a été mise en évidence chez le rongeur, les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}FoxP3⁺ (Xystrakis, Dejean et al. 2004).

Notre équipe a décrit que l'injection d'un adénovirus codant pour CD40-Ig génère des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45(RC)^{low} capables d'induire une tolérance indéfinie du greffon dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat en incompatibilité CMH totale. L'injection des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'un animal tolérant à un receveur de la même souche permet le transfert de cette tolérance, contrairement aux lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} isolés d'un animal naïf. Le transfert de cette tolérance peut s'effectuer de manière itérative via ces lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes. L'induction de la tolérance passe par la production d'Interféron gamma, une cytokine possédant des propriétés pro inflammatoires mais nécessaire à l'induction de la tolérance aux alloantigènes dans plusieurs autres modèles (Sawitzki, Kingsley et al. 2005) (Konieczny, Dai et al. 1998). De plus, Le blocage de l'IFN-γ *in vivo* à l'aide d'un anticorps bloquant empêche l'induction de la tolérance. Les animaux « long surviveurs » présentent une augmentation des transcrits de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme dégradant le tryptophane en kynurénine et dont l'activité peut entraîner l'apoptose et l'anergie des lymphocytes T (Mellor and Munn 2004). Le blocage d'IDO *in vivo* par le 1-MT (1-méthyl-tryptophane) inhibe l'induction de la tolérance médiée par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}. IDO peut être produit par plusieurs types cellulaires et l'interféron gamma en est le stimulus principal (ref). Dans notre modèle, IDO est exprimé par les cellules endothéliales via l'interféron produit par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}. Théoriquement, la production d'IFN-γ et d'IDO devrait induire l'inhibition non spécifique des réponses immunes concomitantes ; néanmoins l'induction de la tolérance par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} est spécifique de l'alloantigène, ce qui suggère l'activation de mécanismes complémentaires permettant la spécificité antigénique de cette tolérance.

Une manière d'analyser les mécanismes mis en jeu par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes induits par l'adénovirus CD40-Ig est d'analyser leur transcriptome à l'aide de puces à ADN. Le profil d'expression des ARN extraits des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} isolées de 5 animaux tolérants (J>120 post greffe) a été comparé avec celui des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} non tolérogènes isolés de la rate de 5 animaux non greffés mais d'âge comparable en utilisant des puces à ADN pangénomiques.

Sur les 27088 gènes présents sur la puce et analysés par le logiciel Genespring, 349 sont différentiellement exprimés entre les deux situations biologiques ($p < 0,05$) avec un Fold Change > 2 . Parmi ces 349 gènes, 286 sont surexprimés dans les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ d'animaux tolérants, et 63 gènes sont sous-exprimés dans les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ d'animaux naïfs.

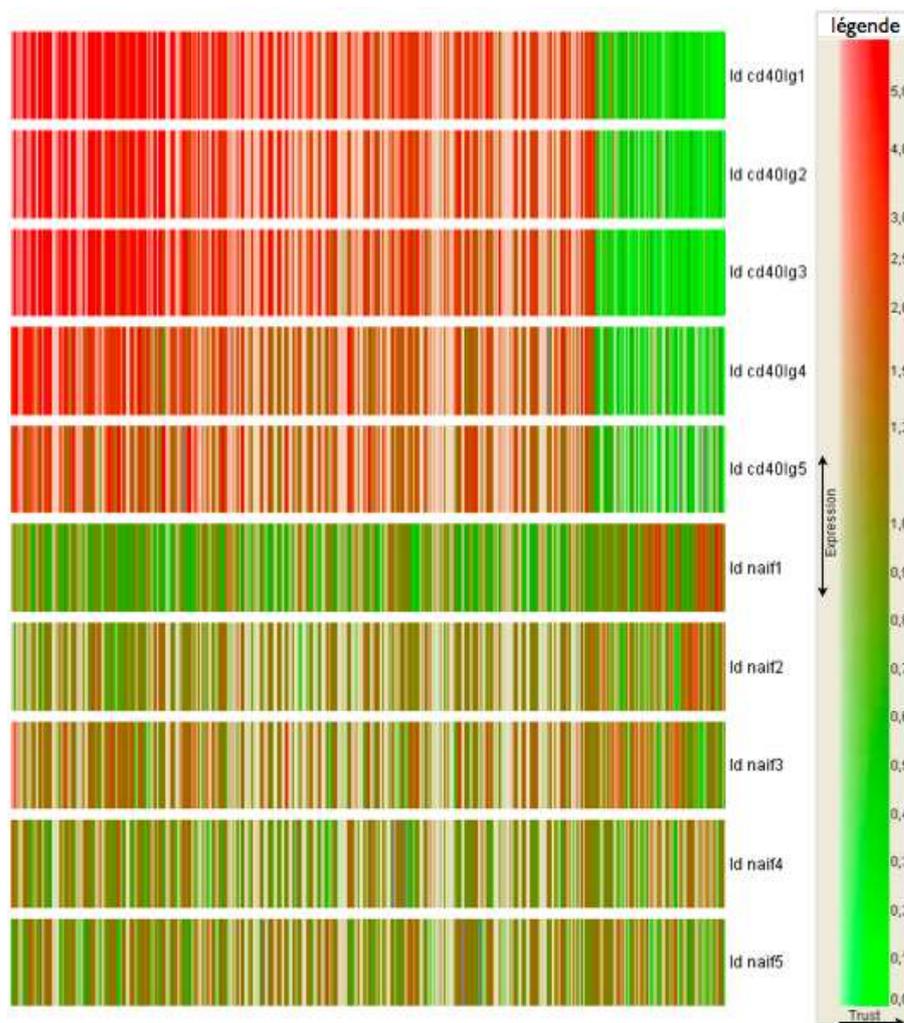


Figure 44. Représentation de l'expression des 349 gènes différentiellement exprimés sur les puces réalisées à partir de lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ extraits d'animaux traités au CD40-Ig et non traités.

Le système de classification du logiciel Panther (Applied Biosystems) nous a permis de faire un premier classement de ces gènes 349 gènes différentiellement exprimés selon leur fonction biologique.

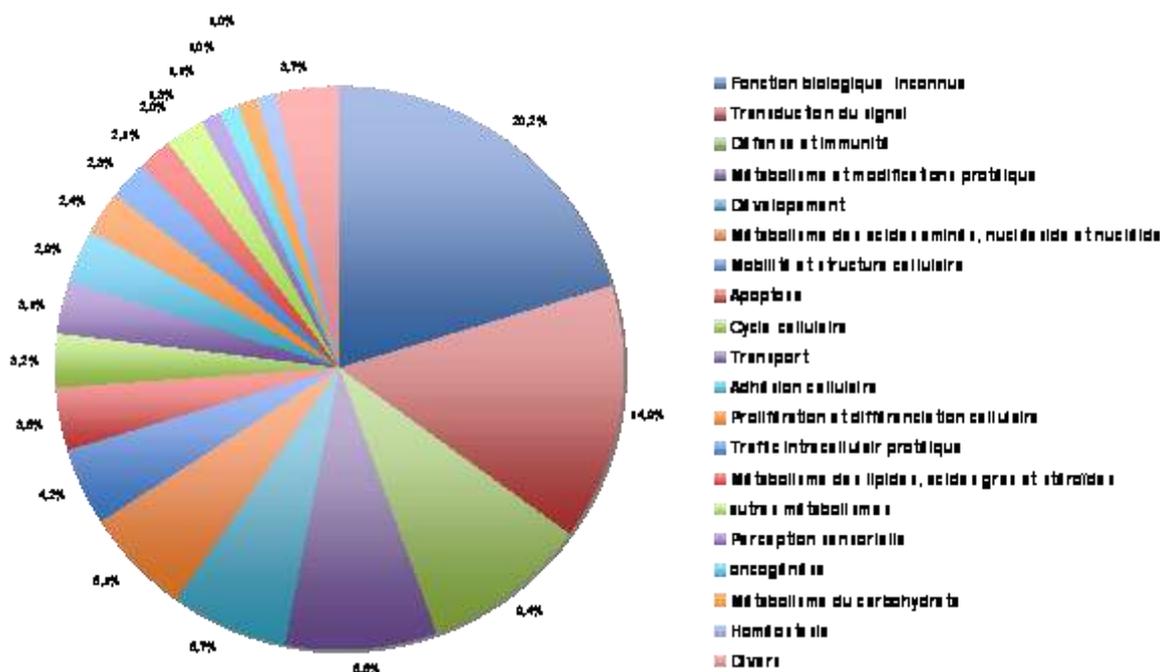


Figure 45. Diagramme présentant les gènes différentiellement exprimés entre les cellules CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'animaux naïfs et tolérants en fonction de leur fonction biologique

Avec cette base, et en utilisant le logiciel Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>) associé à une recherche bibliographique, 80 gènes différentiellement exprimés ont été identifiés comme ayant des fonctions liées au système immunitaire. En utilisant l'ADNc extrait de cellules CD8⁺CD45RC^{low} provenant d'animaux tolérants et d'animaux naïfs (dont 4 analysés sur les puces) l'expression différentielle de ces gènes a été confirmée par PCR quantitative. Les couples de primers correspondants à ces 80 gènes ont été conçus et leur efficacité testée. Parmi les 80 gènes testés en PCR quantitative, 51 sont différentiellement exprimés avec un $p < 0.05$. Ces gènes sont liés à la présentation de l'antigène, à la cytotoxicité, à l'activation et la prolifération cellulaire, aux chimiokines et cytokines, l'IFN- γ , à l'adhésion, aux cellules NK, et à la costimulation.

2. La présentation de l'antigène

Plusieurs gènes impliqués dans la présentation de l'antigène sont différenciellement surexprimés dans les lymphocytes CD8⁺CD45RC^{low}. Les chaînes α et β des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité nouvellement synthétisées sont transportées vers les membranes du réticulum endoplasmique. Là, une chaîne α et une chaîne β s'associent à une chaîne invariante. Une des fonctions de la chaîne invariante est d'assurer le transfert des molécules de classe II aux vésicules d'endocytose, où elles se lient au peptide. Ces vésicules contiennent des protéases qui vont cliver spécifiquement à la chaîne invariante pour ne laisser qu'un fragment appelé CLIP (Class II-associated Invariant-chain-Peptide) occupant le site de fixation du peptide dans la molécule de classe II. L'enlèvement du fragment CLIP et la fixation du peptide sont facilités par l'interaction des molécules de classe II avec une glycoprotéine de la vésicule membranaire, appelée CMH-DM. Après avoir perdu son fragment CLIP, la molécule de classe II lie rapidement son peptide et est transférée à la surface cellulaire par des vésicules. La chaîne invariante est produite en excès par rapport aux molécules CMH II et une partie de cet excès va atteindre la membrane cellulaire et est nommée CD74.

Parmi les gènes différenciellement exprimés, les chaînes alpha et bêta du CMH-IIB, la chaîne alpha du CMH-IID, la chaîne bêta du CMH-IIDM et la chaîne invariante du CMH-II sont surexprimés dans les CD8⁺CD45RC^{low} provenant des animaux tolérants.

Nom	CMH-IIBa	CMH-IIBb	CMH-IIDa	CMH-IIDMb	Chaîne invariable CMHII
Fold Change Puce	7,892	3,324	15,62	5,094	5,937

Tableau 9. Gènes impliqués dans la présentation de l'antigène et surexprimés par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} des animaux tolérants

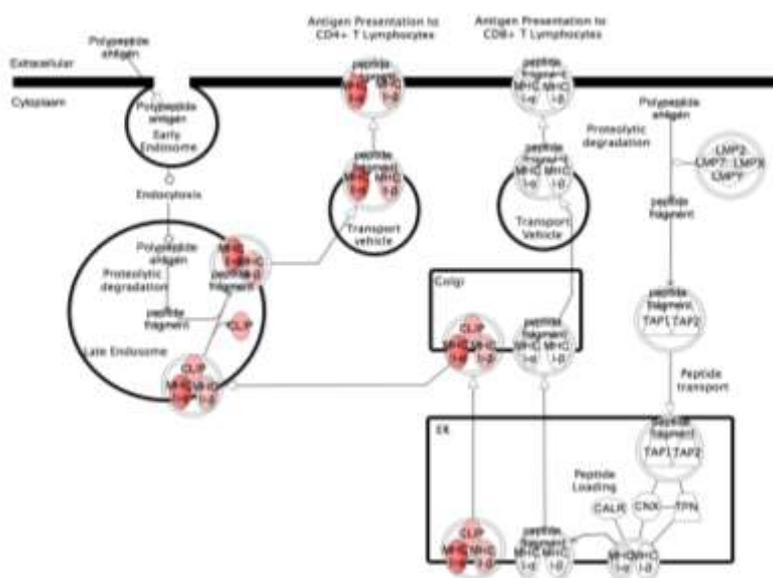


Figure 46. Représentation obtenue à partir du logiciel Ingenuity des différentes molécules impliquées dans la présentation de l'antigène et surexprimés sur les CD8⁺CD45RC^{low} des animaux tolérants

Les molécules impliquées sont représentées en rouge. Plus le Fold Change est important, plus la molécule est représentée foncée.

Ces résultats ont été confirmés en PCR quantitative :

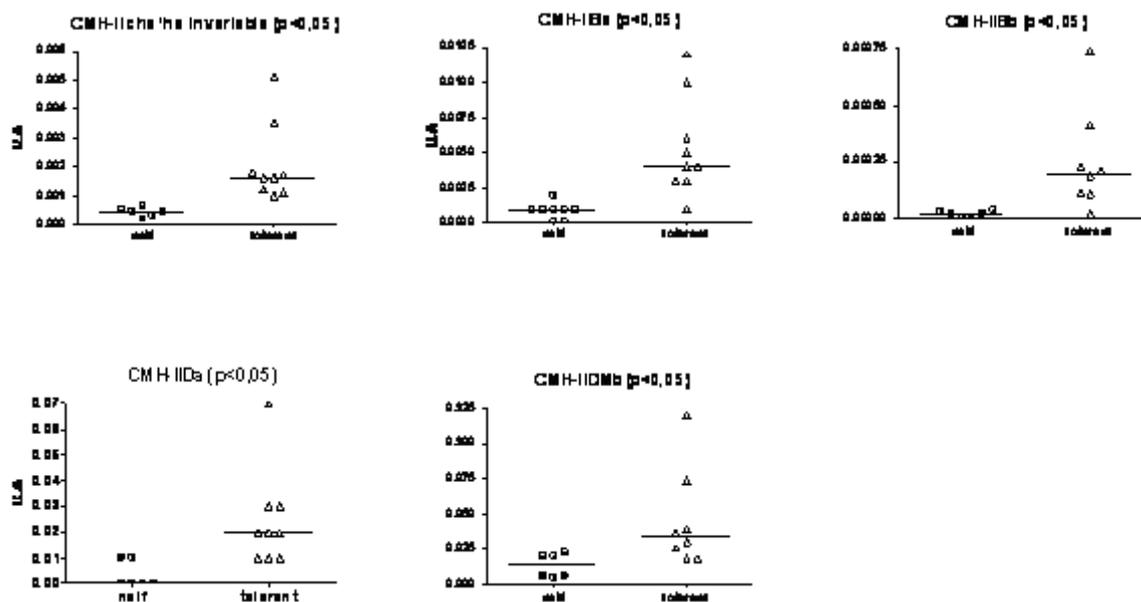


Figure 47. Expression relative des différents gènes impliqués dans la présentation de l'antigène et analysés par PCR quantitative dans les cellules CD8⁺CD45RC^{low} des animaux tolérants et les animaux naïfs

Les études de cytométrie de flux sur les cellules CD8⁺CD45RC^{low} indiquent une surexpression du CMH de classe II B au niveau protéique à la surface des CD8⁺CD45RC^{low} provenant d'animaux tolérants. Ces résultats semblent indiquer que les cellules CD8⁺CD45RC^{low}CMH-II⁺ sont les cellules tolérogènes et sont en cours d'évaluation de fonctionnement.

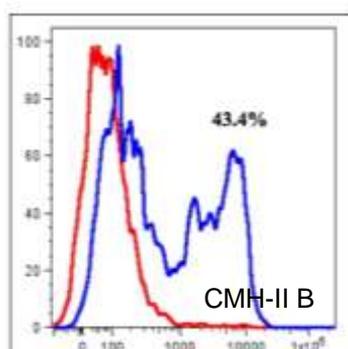


Figure 48. Expression du CMH-II B analysée par cytométrie de flux sur les lymphocytes CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'animaux naïfs et tolérants.

(Bleu) et les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} (Rouge)

3. Cytotoxicité

L'analyse des puces à ADN a montré que plusieurs gènes liés à la cytotoxicité sont surexprimés par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}. La Syntaxine 11 (FC : 4,1) est exprimée par les cellules NK et les lymphocytes T activés et est impliquée dans la génération de la mort cellulaire (Arneson, Brickshawana et al. 2007). Fas/Fas-ligand (FC : 2,4/ 10,3). Les granzymes C et K (FC : 4,1 et 5,8). La cystatine 7 (FC : 2,49) est un inhibiteur de la Cathepsin C, qui régule diverses fonctions immunes (Hamilton, Colbert et al. 2008) comme la maturation des progranzymes en granzymes (Zavasnik-Bergant and Turk 2006) la protéine kinase associée à la mort par apoptose dapk (FC : 2,2) sont également surexprimés par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'animaux tolérants. La surexpression de ces gènes a été confirmée par PCR quantitative.

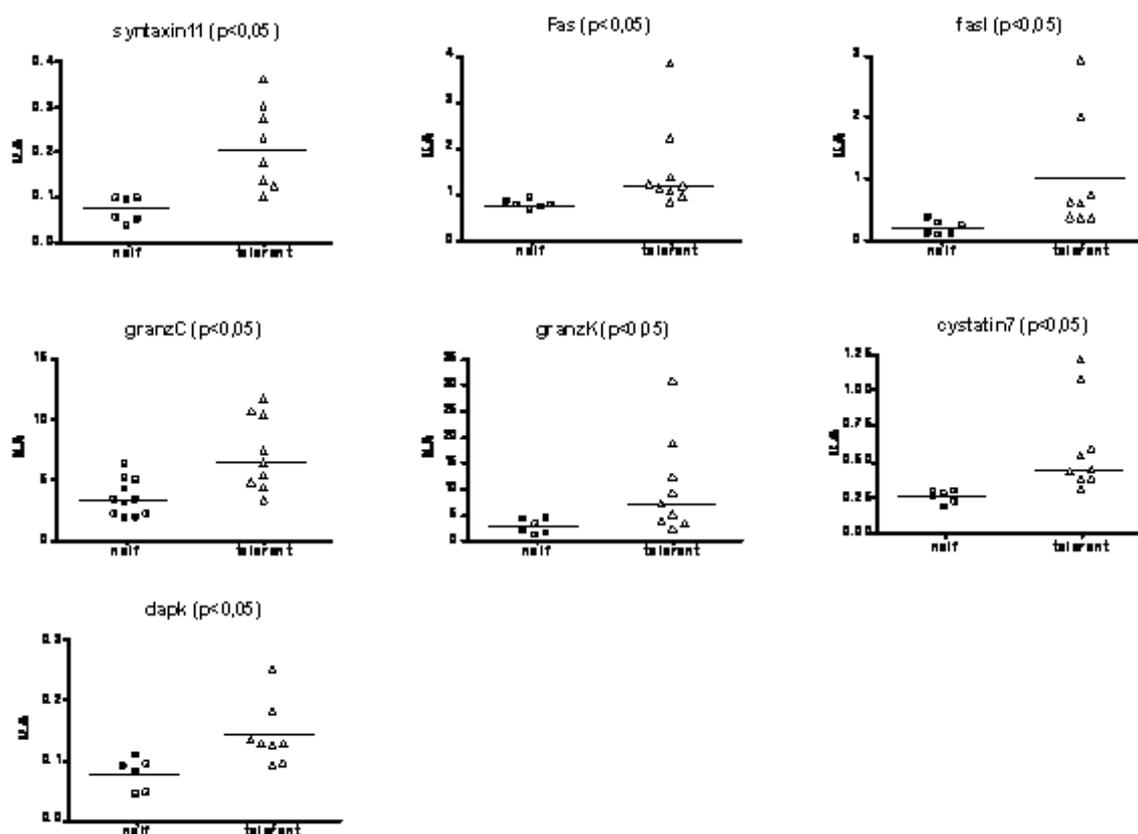


Figure 49. Expression relative des gènes impliqués dans la mort cellulaire analysés par PCR quantitative entre les cellules CD8⁺CD45RC^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs

L'expression de ces gènes surexprimés par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes a été analysée au niveau du greffon cardiaque. Fasl et la Cystatine 7 sont surexprimés dans les greffons extraits d'animaux tolérants comparativement aux greffons extraits d'animaux syngéniques.

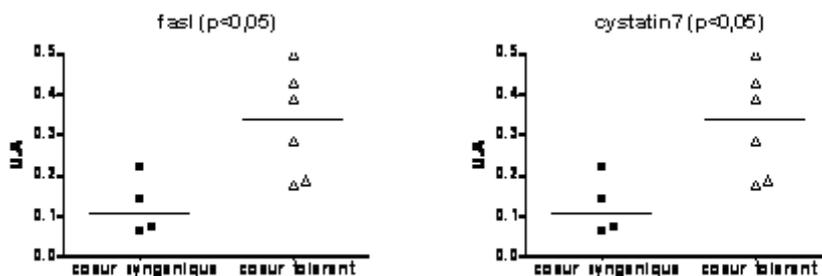


Figure 50. Analyse par PCR quantitative de l'expression de fasl et cystatin7 dans les greffons d'animaux syngéniques et tolérants

4. Activation lymphocytaire et cycle cellulaire

D'autres gènes intéressants liés à l'activation des lymphocytes sont surexprimés dans les puces des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}. La protéine Prion (FC : 4,6) est impliquée dans la signalisation des lymphocytes T et son absence altère la capacité des lymphocytes T à être stimulés par les APC. Slamf7 (CD150, FC : 5,5) est présente à la surface des lymphocytes T et B activés. Tieg (TGFb inducible early growth response) est un répresseur transcriptionnel lié à la prolifération cellulaire induite par le TGFb (FC : 2). Cflar (c-flip FC : 3,4) a été initialement décrit comme inhibiteur de Fas mais a également été décrit comme régulant l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (Dohrman, Kataoka et al. 2005). Dusp2 (FC : 2,5) qui code pour la phosphatase PAC-1, est un des gènes les plus exprimés dans l'activation des cellules immunes et est un régulateur clé de l'inflammation et des fonctions effectrices immunes (Jeffrey, Brummer et al. 2006). La protéine cdkn1a (p21, FC : 6,3) est un inhibiteur du cycle cellulaire contrôlant l'activité des lymphocytes T activés/mémoires (Moisan, Edwards et al. 1992).

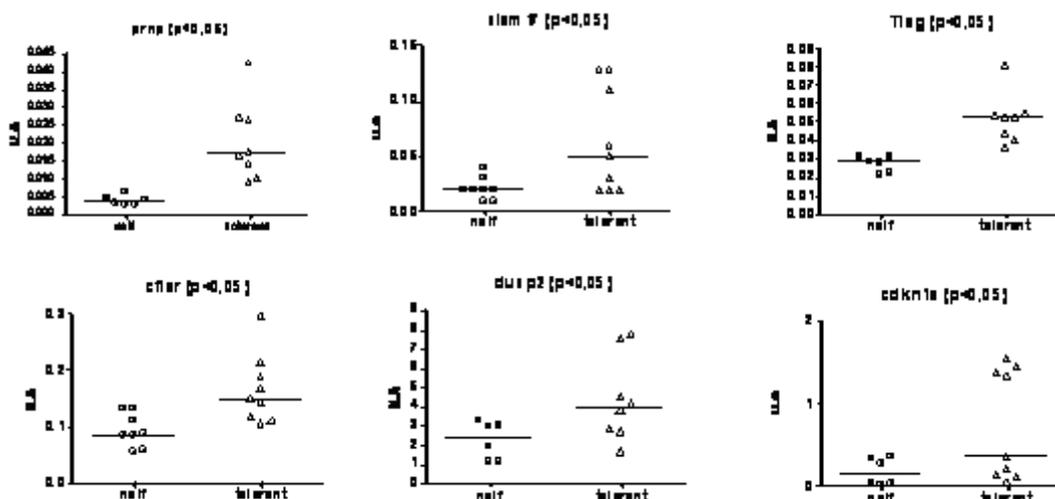


Figure 51. Expression relative des gènes impliqués dans l'activation lymphocytaire et la prolifération cellulaire

Dans les greffons extraits d'animaux tolérants le gène *cflar* est plus exprimé que dans les greffons extraits d'animaux syngéniques.

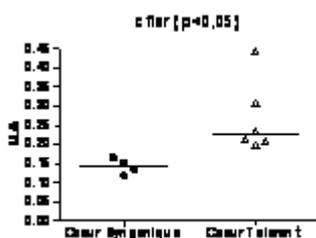


Figure 52. Analyse par PCR quantitative de l'expression de *cflar* dans les greffons syngéniques et les greffons tolérants

5. La voie de l'interleukine-12 et IFN- γ

L'IL-12 est un hétérodimère formé d'une chaîne légère de 35-kDa (p35) et d'une chaîne lourde de 40-kDa (p40). Le récepteur de l'IL-12 est composé de deux chaînes, IL-12Rb1 et IL-12Rb2. L'analyse des puces a montré que la sous-unité bêta1 du récepteur de l'interleukine-12 est surexprimée par les lymphocytes T $CD8^+CD45R^{low}$ extraits d'animaux tolérants avec un Fold Change égal à 3,73. L'expression d'IL-12Rb1 a été analysée par PCR quantitative dans les cellules extraites d'animaux naïfs et d'animaux tolérants:

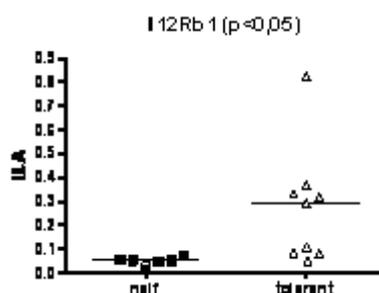


Figure 53. Expression relative du gène de la sous-unité bêta du récepteur de l'interleukine 12 entre les cellules $CD8^+CD45R^{low}$ extraites des animaux tolérants et des animaux naïfs

L'expression différentielle d'IL12-Rb1 a été confirmée par PCR quantitative. L'expression d'IL-12Rb1 et des deux sous-unités p35 et p40 de l'IL-12 a été analysée au niveau du greffon des animaux tolérants et syngéniques.

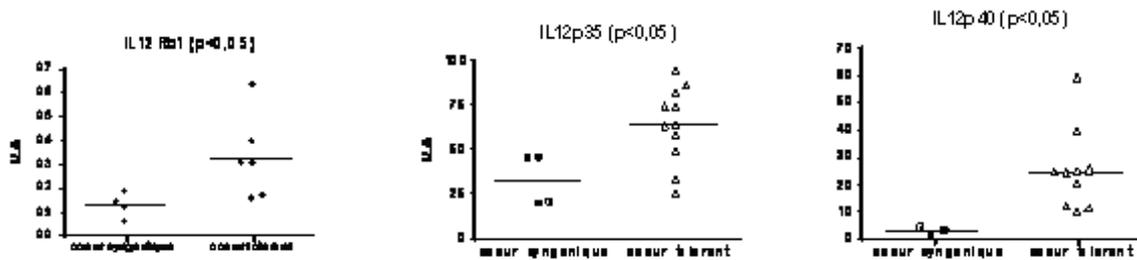


Figure 54. Expression relative des gènes de l'IL12Rb1 et des hétérodimères de l'interleukine 12 p35 et p40 analysés par PCR quantitative à partir des greffons extraits des animaux tolérants et des animaux naïfs.

La surexpression d'IL12Rb1 et des deux sous-unités de l'interleukine 12 est statistiquement significative ($p < 0,5$) en PCR quantitative. L'interleukine 23 est constituée de la sous-unité p19 et de la sous-unité p40 qu'elle partage avec l'Interleukine 12. L'analyse de l'expression de p19 est réalisée par PCR quantitative au niveau du greffon afin de discerner si la surexpression de p40 est spécifique de l'interleukine 12.

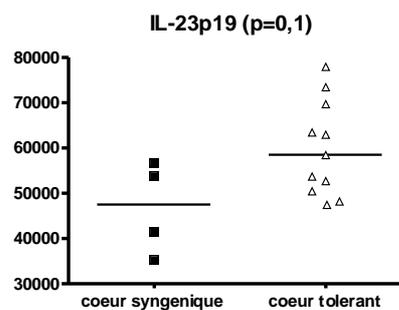


Figure 55. Expression relative de du gène de la sous-unité p19 de l'interleukine 23 analysée par PCR quantitative à partir des greffons extraits des animaux tolérants et des animaux naïfs

L'IL-23p19 n'étant pas surexprimé dans les greffons des animaux tolérants, la surexpression l'IL-12p40 est donc spécifique de l'IL-12.

IL-12 est particulièrement efficace pour induire la production d'IFN- γ (Gerosa, Paganin et al. 1996). L'induction de l'expression d'IFN- γ par l'IL-12 se déroule majoritairement durant la transcription avec l'augmentation de la stabilité et de la mobilité de l'ARNm IFN- γ (Chan, Kobayashi et al. 1992) (Walker, Aste-Amezaga et al. 1999) (Hodge, Martinez et al. 2002).

Les puces montrent que l'expression de l'IFN- γ est supérieure dans les cellules CD8⁺CD45RC^{low} des animaux tolérants comparée aux animaux naïfs (FC: 3,8). L'expression de l'IFN- γ a été analysée par PCR quantitative dans les cellules CD8⁺CD45RC^{low} isolés de la rate des animaux tolérants et des animaux naïfs.

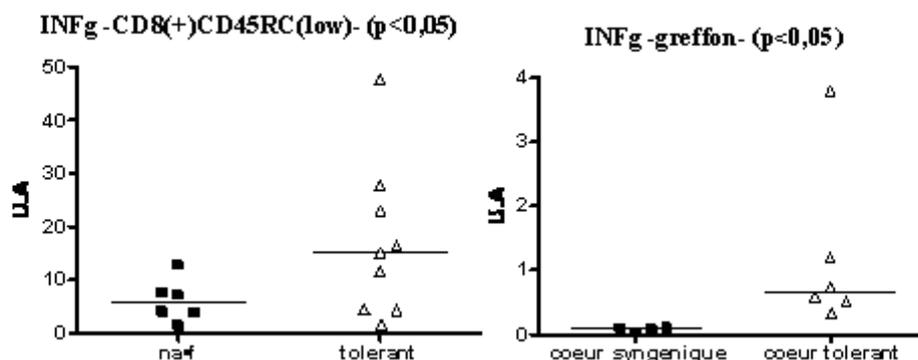


Figure 56. Expression relative du gène de l'interféron gamma analysée par PCR quantitative entre les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs et l'expression de l'IFN- γ au niveau du greffon entre des animaux recevant des cœurs syngéniques et des animaux tolérants.

La surexpression de l'interféron gamma par les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ des animaux tolérants *in situ* dans le greffon des animaux tolérants est aussi confirmée par PCR. Dans notre modèle, l'hypothèse est que la production d'IFN- γ par les lymphocytes $CD8^+CD45RC^{low}$ induit l'expression d'IDO tolérogène par les cellules endothéliales du greffon des animaux tolérants. L'expression d'IDO dans les greffons des animaux syngéniques et tolérants a donc été analysée par PCR quantitative.

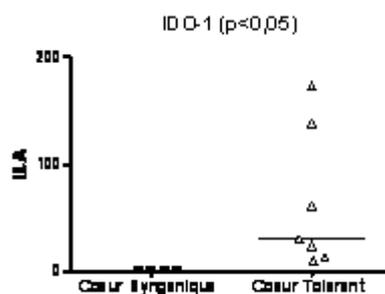


Figure 57. Expression relative du gène IDO-1 analysée par PCR quantitative au niveau du greffon entre les animaux receveurs de greffes syngéniques et des animaux tolérants

La surexpression de l'IDO-1 par les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ des greffons des animaux tolérants a été confirmée par PCR quantitative. Cette surexpression d'IDO-1 corrélée avec la surexpression de l'IFN- γ est déjà connue dans notre modèle et permet de valider les échantillons utilisés dans cette étude.

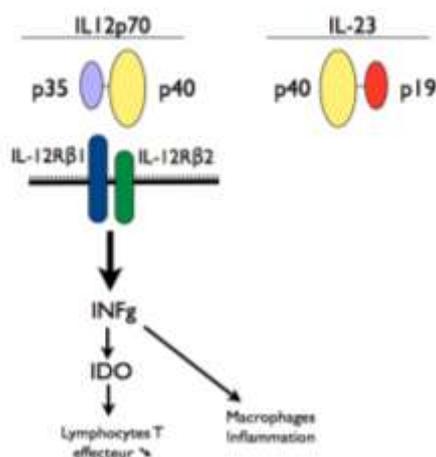


Figure 58. La voie de l'IL-12 et IDO

L'IL-12 peut se lier à son récepteur surexprimé par les lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ des animaux tolérants, entraînant la production d'IFN- γ qui va induire l'expression d'IDO tolérogène.

Il a été observé que TNF- α peut agir en synergie avec l'IFN- γ pour activer IDO (Wolf, Wolf et al. 2004). De plus, des patients traités avec un anti-TNF- α présentent une diminution de l'activité d'IDO (Popov, Abdullah et al. 2006). Dans les puces, TNF- α est significativement surexprimé dans les lymphocytes $CD8^+CD45RC^{low}$ extraits des animaux tolérants avec un Fold Change égal à 2,42. L'expression de TNF- α a été analysée par PCR quantitative dans les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ provenant des animaux naïfs et tolérants.

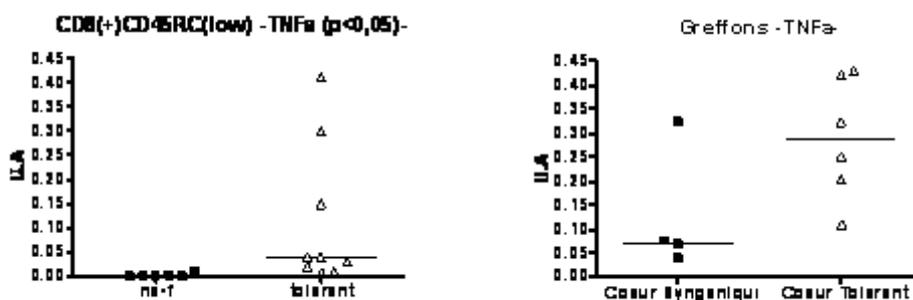


Figure 59. Expression relative de l'expression du TNF- α analysée par PCR quantitative entre les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs et l'expression du TNF- α au niveau du greffon entre les animaux receveurs de greffes syngéniques et les animaux tolérants.

La surexpression du TNF- α par les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ isolées de la rate des animaux tolérants est statistiquement significative en PCR quantitative et confirme les résultats des puces. La PCR quantitative effectuée dans le greffon montre une tendance de TNF- α à être plus fortement exprimé dans le greffon des animaux tolérants. Le TNF- α pourrait donc participer à agir en synergie avec l'IFN- γ chez les animaux tolérants pour induire l'expression d'IDO.

D'autres gènes présents sur les puces sont liés à IFN- γ . L'expression d'Oas1 ('5'-oligoadenylate synthetase 1) est induite par l'interféron, et a été initialement décrit comme responsable de la résistance aux virus mais semble également contrôler la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Mashimo, Simon-Chazottes et al. 2008). Muc4 est une glycoprotéine de membrane dont l'expression est, entre autres, induite par l'interféron gamma. Cette molécule est impliquée dans diverses fonctions biologiques liées au développement des tumeurs et possède des fonctions anti-adhérentes, anti-apoptotique et permet l'échappement des tumeurs en masquant les antigènes de surface (Chaturvedi, Singh et al. 2008). Socs1 est un inhibiteur de la signalisation liée à l'IFN- γ (Alexander, Starr et al. 1999).

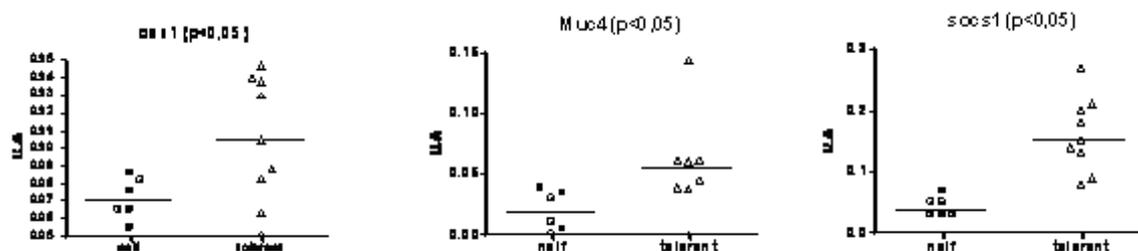


Figure 60. Expression relative des gènes liés à l'interféron gamma. Analyse par PCR quantitative entre les cellules CD8⁺CD45RC^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs

Le gène de Muc4 est également plus exprimé dans les greffons extraits d'animaux tolérants que dans les greffons extraits d'animaux syngéniques.

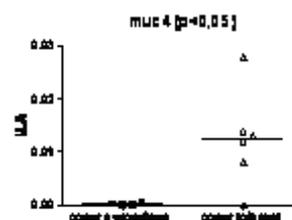


Figure 61. Expression relative de Muc4. Analyse par PCR quantitative entre les greffons des animaux receveurs de greffes syngéniques et les animaux tolérants

6. La Fibrinogen like 2 (Fgl2)

La Fibrinogen-like protein 2 (Fgl2)/Fibroleukine, est un membre des protéines liées à la superfamille des protéines Fibrinogène (Koyama, Hall et al. 1987). Fgl2 joue un rôle dans la coagulation (prothrombinase) et est exprimé par les cellules endothéliales et macrophagiques activées (Ding, Ning et al. 1997; Ding, Ning et al. 1998). Il a été associé à la pathogénie de diverses maladies inflammatoires comme l'hépatite virale fulminante, le rejet d'allo et xenogreffe et la perte du fœtus induit par les cytokines. Il existe sous une forme exprimée à la membrane et une forme sécrétée. La forme sécrétée de Fgl2 perd ses effets sur la coagulation mais possède des propriétés immunorégulatrices en inhibant la maturation des DC, en induisant l'apoptose des lymphocytes B et

en inhibant la prolifération allogénique des lymphocytes T *in vitro* (Chan, Kay et al. 2003) (Shalev, Liu et al. 2008). De plus Fgl2 est surexprimée dans certains types de lymphocytes T régulateurs comme les T CD4⁺CD25 et les T CD8⁺αα. De plus, l'expression de Fgl2 est inductible par l'IFN-γ (Lafuse, Castle et al. 1995), un élément central de notre modèle.

Fgl2 fait partie des gènes différentiellement exprimés dans nos puces avec un Fold Change de 2,43. L'expression de Fgl2 a été analysée par PCR quantitative entre les cellules CD8⁺CD45RC^{low} provenant de la rate des animaux naïfs et des animaux tolérants ainsi que dans les greffons des animaux syngéniques et tolérants.

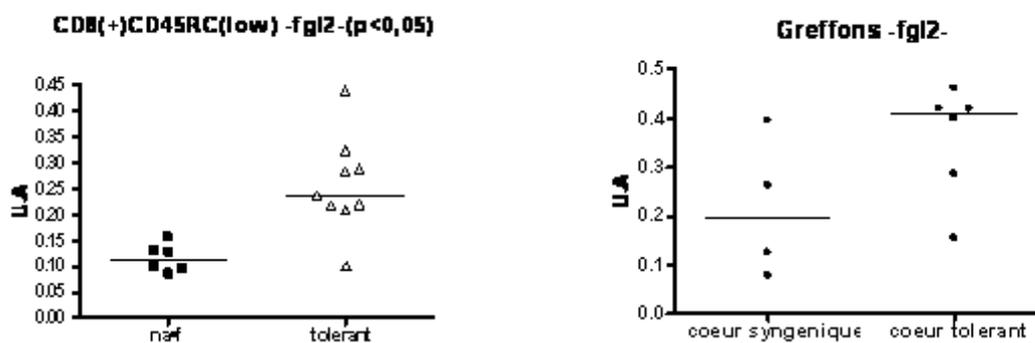


Figure 62. Expression relative de l'expression de fgl2 analysée par PCR quantitative entre les cellules CD8⁺CD45RC^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs et au niveau du greffon entre des animaux receveurs de greffes syngéniques et les animaux tolérants

La surexpression de Fgl2 par les cellules CD8⁺CD45RC^{low} des animaux tolérants isolées de la rate est statistiquement significative en PCR quantitative et confirme les résultats des puces. La PCR quantitative effectuée dans le greffon montre une tendance de Fgl2 à être surexprimée dans le greffon.

L'importance de Fgl2 dans la médiation de la suppression exercée par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} a été testée dans un test de suppression *in vitro*. En utilisant un anticorps bloquant anti-Fgl2, la capacité suppressive des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'un animal naïf est abrogée et les lymphocytes T CD4⁺ prolifèrent normalement. Fgl2 semble donc impliquée dans la suppression par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} *in vitro*.

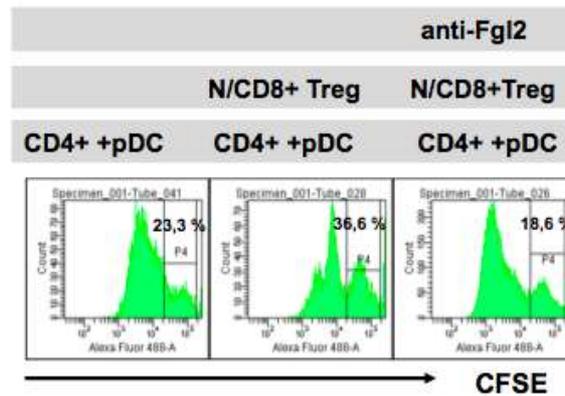


Figure 63. Prolifération des lymphocytes T naïfs CD4⁺CD25⁻ du receveur en présence des pDC du donneur (1W) plus les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'un animal naïf en présence ou non d'un anticorps bloquant anti-Fgl2.
 Pourcentages figurés : pic de non prolifération.

Dans un système transwell cet anticorps semble aussi inhiber la suppression médiée par les lymphocytes CD8⁺CD45RC^{low}. Le test de prolifération est composé de deux chambres : la chambre inférieure contient les lymphocytes T naïfs CD4⁺CD25⁻ du receveur (1A) en présence des pDC du donneur (1W). La chambre supérieure contient des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extrait d'un animal naïf (1A), en présence des pDC du donneur +/- l'anticorps bloquant anti-Fgl2.

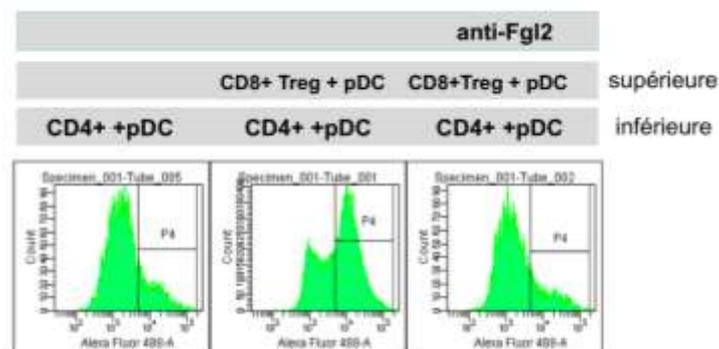


Figure 64. Test de prolifération en transwell et action de l'anticorps anti-Fgl2

Ces expériences suggèrent l'implication de Fgl2 dans le mode d'action des lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low}

7. Chimiokines et récepteurs des chimiokines

Certains récepteurs des chimiokines et CCL5 sont surexprimés dans les puces CD8⁺CD45RC^{low} d'animaux tolérants comparé aux animaux naïfs :

Nom	CCR2	CCR5	CXCR3	CCL5
Fold Change Puce	6,6	9,63	2,55	4,75

Ces résultats ont été confirmés en PCR quantitative

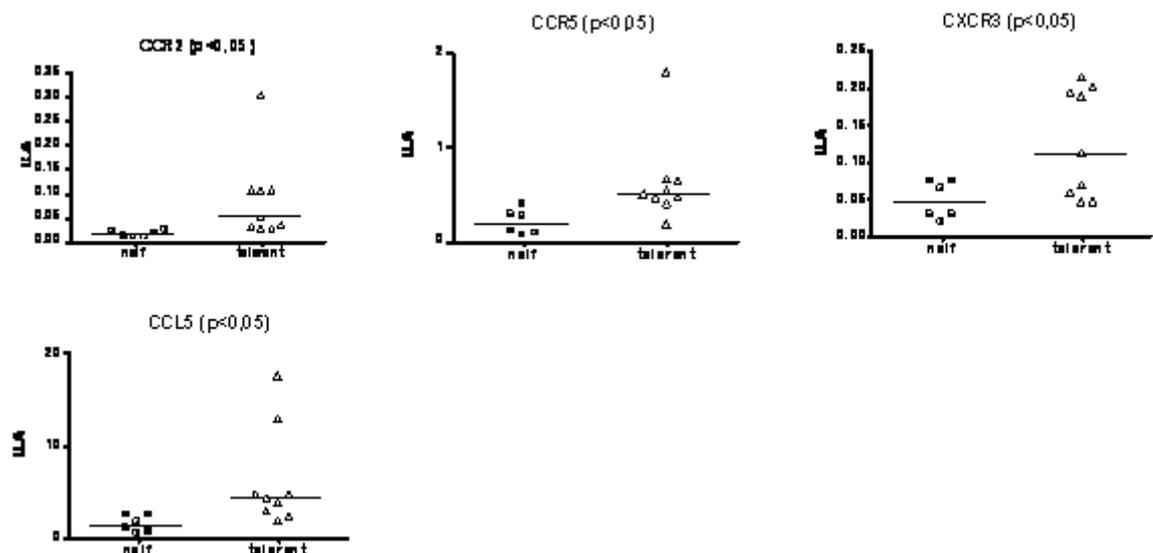


Figure 65. Expression relative des gènes des chimiokines et des récepteurs aux chimiokines analysés par PCR quantitative dans les CD8⁺CD45RC^{low} des animaux tolérants et les animaux naïfs

Certains gènes des récepteurs aux chimiokines surexprimés par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} sont également surexprimés dans les greffons des animaux tolérants par rapport aux greffons des animaux recevant une greffe syngénique.

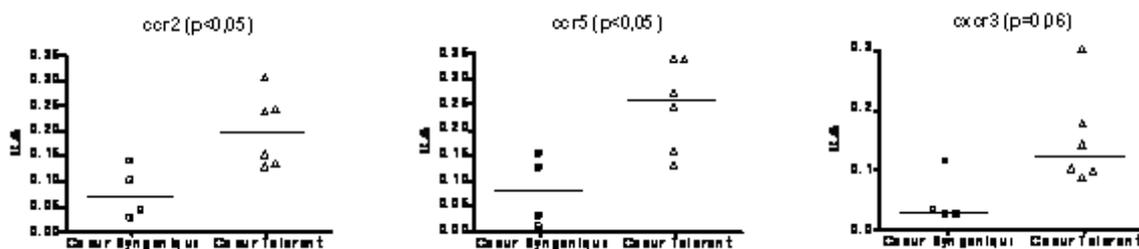


Figure 66. Expression relative des gènes des récepteurs des chimiokines analysés par PCR quantitative entre les greffons des animaux recevant des greffes syngéniques et des animaux tolérants

Ces récepteurs aux chimiokines sont capables de lier différentes chimiokines, chez le rat, le récepteur CCR2 est capable de lier les chimiokines CCL2, CCL7 ; CCR5 lie CCL3, CCL4, CCL5 et CXCR3 lie CXCL9, CXCL10, CXCL11.

Les chimiokines sont capables d'attirer les cellules du système immunitaire via un gradient de concentration. Par conséquent l'attraction des lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ dans le greffon devrait s'accompagner d'une expression spécifique des ligands correspondant. L'expression des cytokines liant ces récepteurs aux chimiokines surexprimés par les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ a été comparée entre les greffons d'animaux tolérants, (plus de 3 mois après la greffe) et des greffes syngéniques.

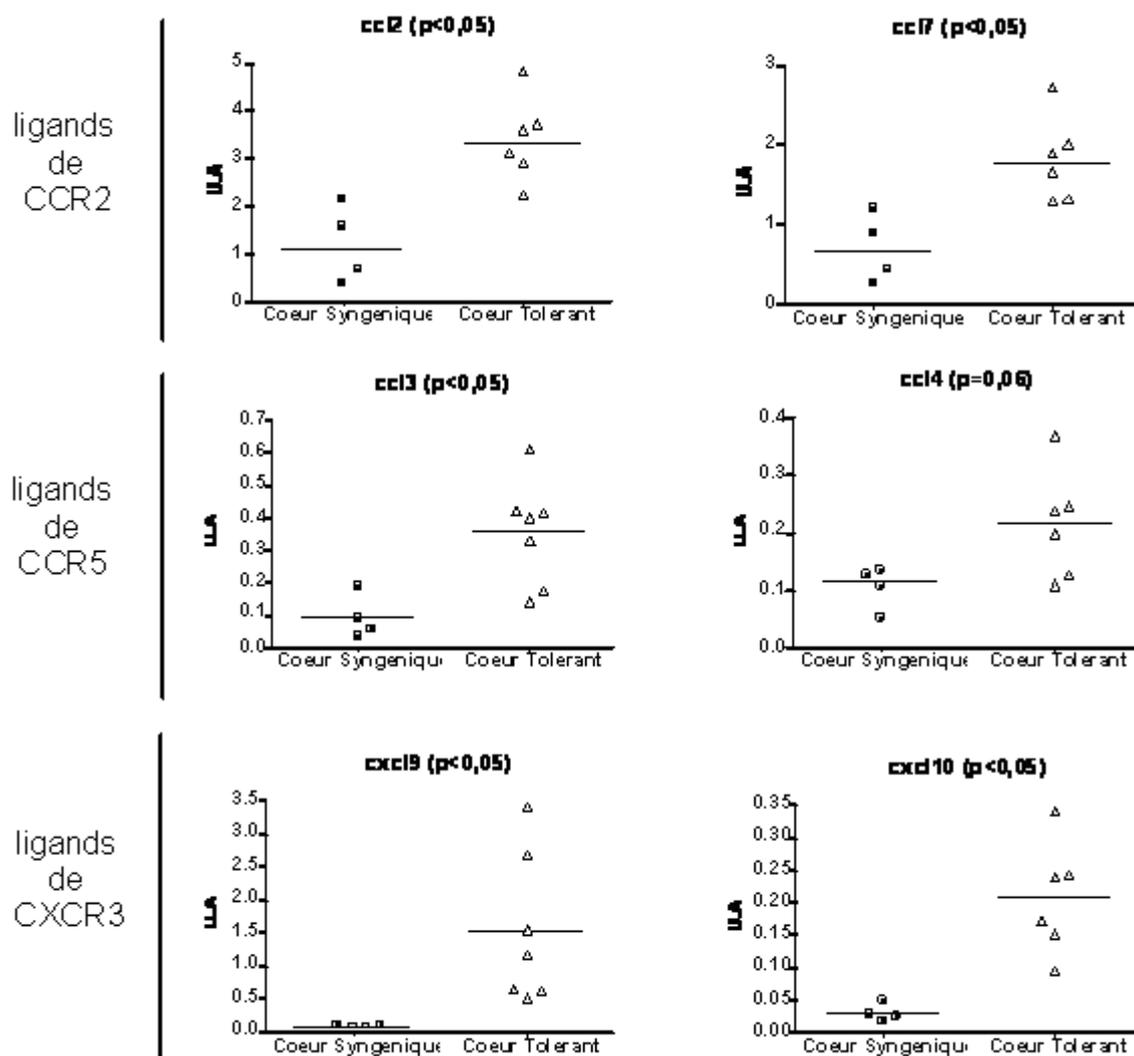


Figure 67. Expression relative des gènes des chimiokines correspondant aux récepteurs surexprimés par $CD8^+CD45RC^{low}$ des animaux tolérants, dans les greffons d'animaux recevant des greffes syngéniques et d'animaux tolérants

Les chimiokines correspondant aux récepteurs surexprimés par les $CD8^+CD45RC^{low}$ des animaux tolérants sont surexprimés au niveau du greffon des animaux tolérants par rapport aux

animaux ayant reçu une greffe syngénique, à l'exception de ccl4 qui ne montre qu'une tendance à être surexprimé.

8. adhésion cellulaire

L'analyse des puces a montré que certains gènes liés à l'adhésion cellulaire sont surexprimés dans les lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ d'animaux tolérants. Les intégrines sont des protéines transmembranaires constituées d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta. Les sous-unités bêta 1 et beta 7 de l'intégrine (itgb1/CD29 et itgb7) sont surexprimées (FC respectifs: 2 et 2,6). Ces molécules jouent un rôle dans l'interaction des leucocytes avec la matrice cellulaire. Nedd9 est également surexprimé (FC: 3,316) et semble jouer un rôle dans la signalisation liée aux intégrines, notamment dans les lymphocytes T (Seo, Ichikawa et al. 2006). L'expression de ces gènes a été confirmée par PCR quantitative.

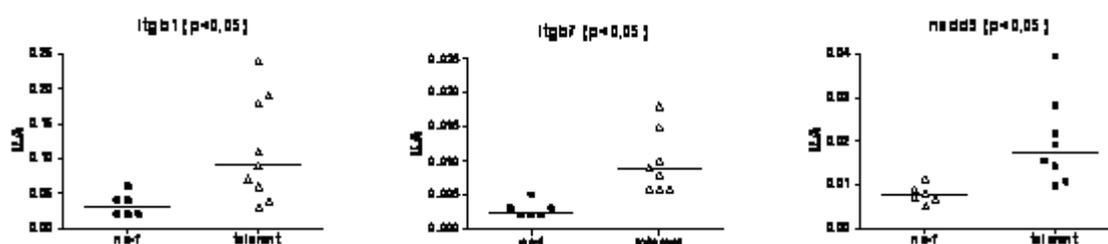


Figure 68. Expression relative des gènes liés à l'adhésion cellulaire analysés par PCR quantitative entre les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ d'animaux tolérants et naïfs

itgb7 est surexprimé dans les greffons extraits d'animaux tolérants comparativement aux greffons d'animaux recevant des greffes syngéniques.

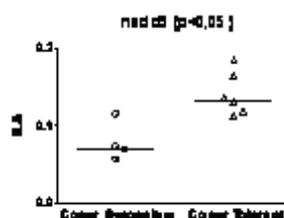


Figure 69. Expression relative de l'expression de nedd9 analysée par PCR quantitative entre les greffons d'animaux recevant des greffes syngéniques et des animaux tolérants

9. Les cellules Natural Killer (NK)

Plusieurs gènes liés aux cellules NK sont également surexprimés dans les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'animaux tolérants. Le récepteur au poliovirus (FC : 3,2) médie l'adhésion aux cellules NK, Les récepteurs des NK : NKG2A et NKG2C (FC : 3,9 et 5,7). Klrg1 (FC :3,8), une lectine inhibitrice de type C. NKG7 (FC :3,8), une protéine de surface exprimée par les lymphocytes T et les NK. Ocil, qui inhibe la mort liée aux NK. La surexpression de ces gènes a été confirmée par PCR quantitative.

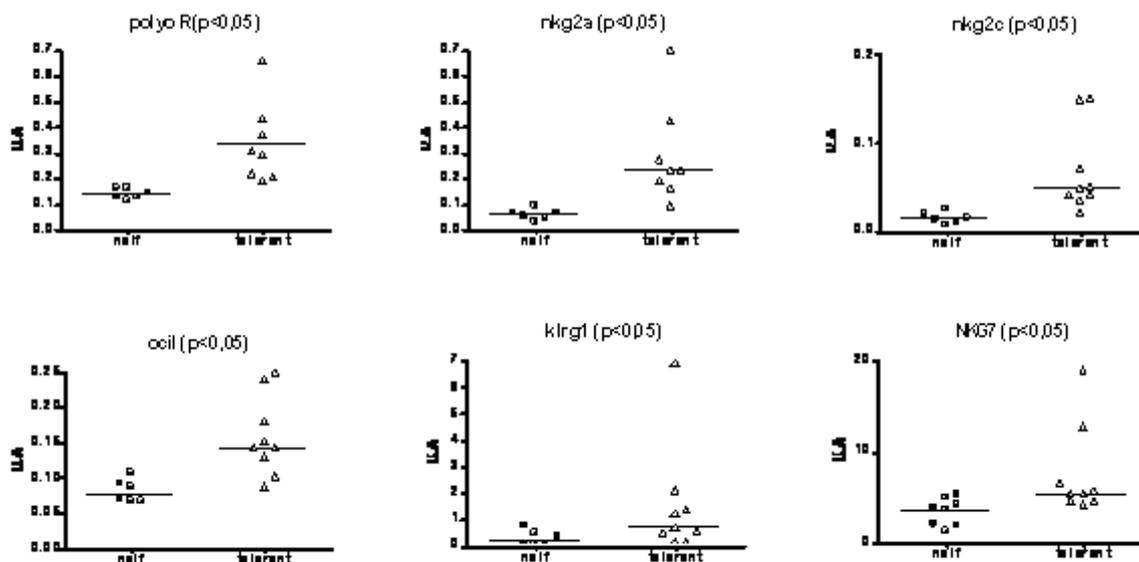


Figure 70. Expression relative des gènes liés aux cellules NK. Analyse par PCR quantitative entre les cellules CD8⁺CD45RC^{low} d'animaux tolérants et naïfs

Les gènes nkg2a, ocil et nkg7 sont surexprimés dans les greffons extraits d'animaux tolérants comparativement aux greffons extraits d'animaux syngéniques.

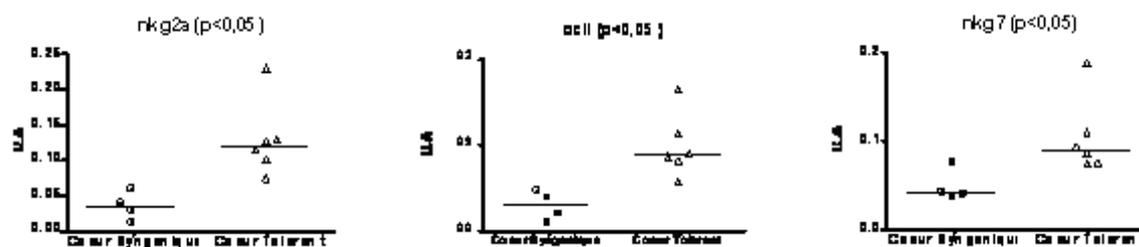


Figure 71. Expression relative de nkg2a, ocil et nkg7 analysée par PCR quantitative entre les greffons extraits d'animaux recevant des greffes syngéniques et d'animaux tolérants

10. La costimulation

Plusieurs gènes impliqués dans la costimulation, et qui sont normalement exprimés par les CPA (cf introduction) sont surexprimés par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes dans les puces :

CD86 (FC : 2,4) lie CD28 et CTLA4, CD137L (FC : 9,5) lie CD137, ICAM-1 (FC : 2,7) lie LFA-1. La surexpression de ces gènes a été confirmée par PCR quantitative.

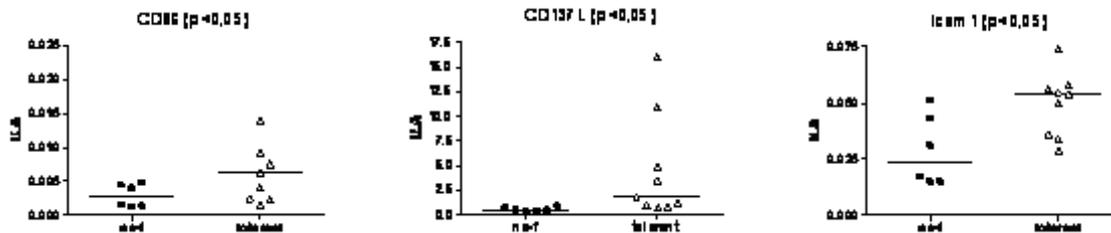


Figure 72. Expression relative des gènes liés à la costimulation analysée par PCR quantitative entre les cellules CD8⁺CD45RC^{low} extraites de la rate d’animaux tolérants

Les molécules CD137L et ICAM1 ont été analysées dans le test de suppression *in vitro*.

L’utilisation d’un anticorps anti-ICAM-1 n’inhibe pas la suppression des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d’animaux naïfs, l’effet constaté est au contraire une augmentation de la suppression. L’anticorps anti-ICAM1 est également capable d’inhiber directement la prolifération des lymphocytes TCD4⁺.

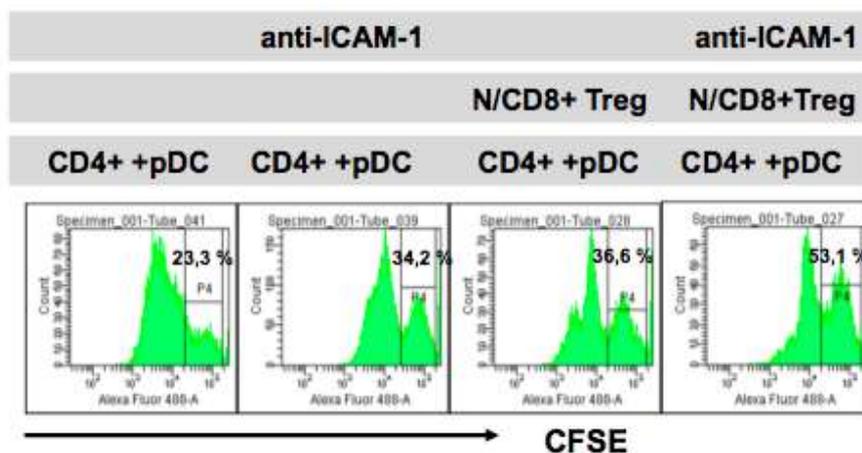


Figure 73. Prolifération des lymphocytes T naïfs CD4⁺CD25⁻ du receveur en présence des pDC du donneur (1W) plus les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d’un animal naïf en présence ou non d’un anticorps anti-ICAM-1

Pourcentages figurés : pic de non prolifération

L'utilisation d'une molécule de fusion CD137L-Fc agoniste est utilisée pour mimer l'expression de CD137L par les lymphocytes $CD8^+CD45RC^{low}$ dans un test de transwell. Dans le puits contrôle, les lymphocytes Treg $CD8^+$ sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$. En présence de CD137L-Fc, on observe une prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ malgré la présence des lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$. Cette molécule est par nature co-stimulatrice, et pourrait agir directement sur la co-stimulation des lymphocytes T $CD4^+$ dans notre test. Ces résultats sont donc difficiles à interpréter.

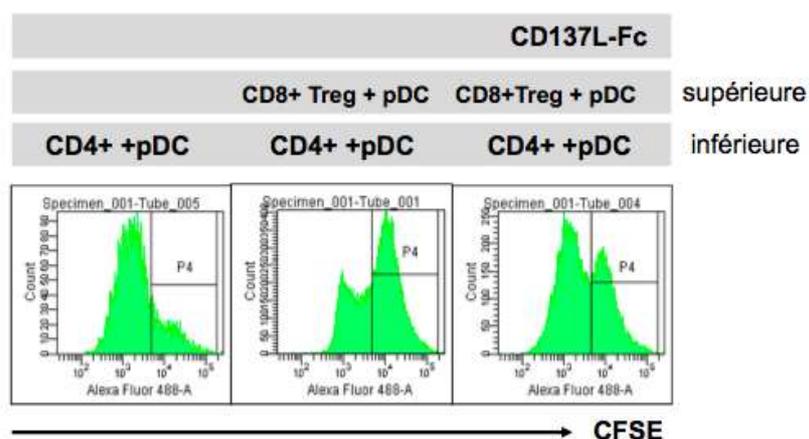


Figure 74. Test de prolifération en transwell et effet de CD137L-Fc

La chambre inférieure contient les lymphocytes T naïfs $CD4^+CD25^-$ du receveur (1A) en présence des pDC du donneur (1W). La chambre supérieure contient des lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ extrait d'un animal naïf (1A) en présence des pDC du donneur +/- la molécule de fusion CD137L-Fc.

11. Molécules surexprimées dans d'autres types de lymphocytes T régulateurs.

Certains gènes surexprimés par les lymphocytes CD8⁺CD45RC^{low} ont été décrits comme surexprimés dans certains lymphocytes T régulateurs par des analyses de puces à ADN. Certains de ces gènes ont été décrits précédemment (Ccl5, Ccr2, Ccr5, Cxcr3, Cdkn1a, Fgl2, IFN-g, Itgb1, Klrp1, Nkg7, Slamf7, Socs1), d'autres non (CD83, Lgals3, S100A4 et A6, Tiam1, Tmem23).

1er auteur	McHugh	Williams	Lin	Fontenot	Pfoertner	Sugimoto	Chen	Lee	Denning
Journal	Immunity 2002	Nature Immunology 2007	Nature Immunology 2007	Immunity 2005	Gene Biology 2006	International Immunology 2006	JEM 2005	Jl 2005	Jl 2007
organisme	souris	souris	souris	souris	humain	souris	souris	clones	souris
modèle	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Vs CD4 ⁺ CD25 ⁻	YFP ⁺ Foxp3Δ Vs YFP ⁺ Foxp3 ⁺	EGFP ⁺ CD4 ⁺ Foxp3EGFP Vs Foxp3ΔEGFP	Foxp3GFP ⁺ CD25lo Vs CD25hi	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Vs CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD25 ⁺ CD4 ⁺ Vs CD25 ⁺ CD4 ⁺	Treg pancreas Vs T conv.	CD8-CD4- [normal Vs mutant non cytotoxique]	CD8αα Vs CD8αβ
FC	gene							conf par PCR	
4,755	CCL5	++	++	-- (low)	diff. exprimé				
6,605	CCR2			-- (low)			++		
9,637	CCR5			-- (low)	diff. exprimé		++	++	
5,083	CD83	--							
6,3	Cdkn1a					++ (fraîches & activé)			
2,552	CXCR3			-- (low)			++		
2,432	Fgl2	--		-- (low)			++		++ ++
3,859	IFNγ	++	++	-- (low)					
2,009	ITGB1			-- (low)				++	
3,847	KLRG1	--		-- (low)		++ (fraîches)	++		
2,011	LGALS3		++		diff. exprimé				
3,828	NKG7		++			++ (activées)			
4,961	S100A4				diff. exprimé	++ (fraîches)			
4,076	S100A6					++ (fraîches)	++		
5,525	Slamf7		++						
2,29	Socs1	++		++ (high)					
2,296	Tiam1	diff. exprimé							
2,4	Tmem23					-- (fraîches)			

Figure 75. tableau récapitulatif des gènes surexprimés dans les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes et retrouvés dans d'autres études de puces à ADN impliquant des lymphocytes Treg

++ : surexpression du gène dans la condition rouge (-- : sous-expression). Diff. Exprimé : gènes différentiellement exprimé entre les deux conditions.

CD83 : semble contribuer aux fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ (Reinwald, Wieth et al. 2008). **Lgals3** (Galectine 3) : glycoprotéine de surface. **NKG7** : protéine de surface exprimée par les lymphocytes T et les NK. **S100A6** et **S100A4** : protéines de la famille S100 liant le calcium et impliquées dans la prolifération cellulaire, la sécrétion et l'exocytose. **Tiam-1** (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1) : molécule de signalisation. **Tmem23** : une enzyme convertissant la phosphatidylcholine (PC) et le ceramide en sphingomyéline (SM) et diacylglycerol (DAG)

La plupart des études de puces à ADN se sont intéressées aux lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ chez la souris. Ainsi, **McHugh** a comparé les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ avec les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ (McHugh, Whitters et al. 2002). **Fontenot** a comparé les lymphocytes T CD4⁺CD25^{low}FOXP3⁺ avec des lymphocytes T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ (Fontenot, Rasmussen et al. 2005). **Lin et al** a analysé les gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD4⁺FOXP3⁺ et les lymphocytes TCD4⁺ΔFOXP3⁺ (non fonctionnels) (Lin, Haribhai et al. 2007). **Sugimoto** a comparé deux paires de populations : des lymphocytes frais T CD4⁺CD25⁺ contre des lymphocytes frais T CD4⁺CD25⁺. Mais aussi des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ transduits avec un rétrovirus codant pour Foxp3 contre des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ transduits avec un rétrovirus contrôle (Sugimoto, Oida et al. 2006). **Williams** a également comparé des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ΔFOXP3⁺ avec des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ΔFOXP3⁺ (Williams and Rudensky 2007). **Chen** a comparé l'expression des gènes

des lymphocytes Treg $CD4^+CD25^+CD69^-$ et les lymphocytes T $CD4^+$ (Chen, Herman et al. 2005) dans le pancréas de souris.

Lee a comparé une lignée cytotoxique et une lignée non cytotoxique de clones $CD8^+CD4^-DN$ (Lee, Mansfield et al. 2005).

Pfoertner a comparé les lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ et T $CD4^+CD25^-$ chez l'Homme (Pfoertner, Jeron et al. 2006).

Finalement, **Denning** a comparé le profil d'expression de lymphocytes intraépithéliaux de l'intestin $TCR\alpha\beta CD8\alpha\alpha$ avec des lymphocytes $TCR\alpha\beta CD8\beta$ et $TCR\gamma\delta CD8\beta$ (Denning, Granger et al. 2007) chez la souris.

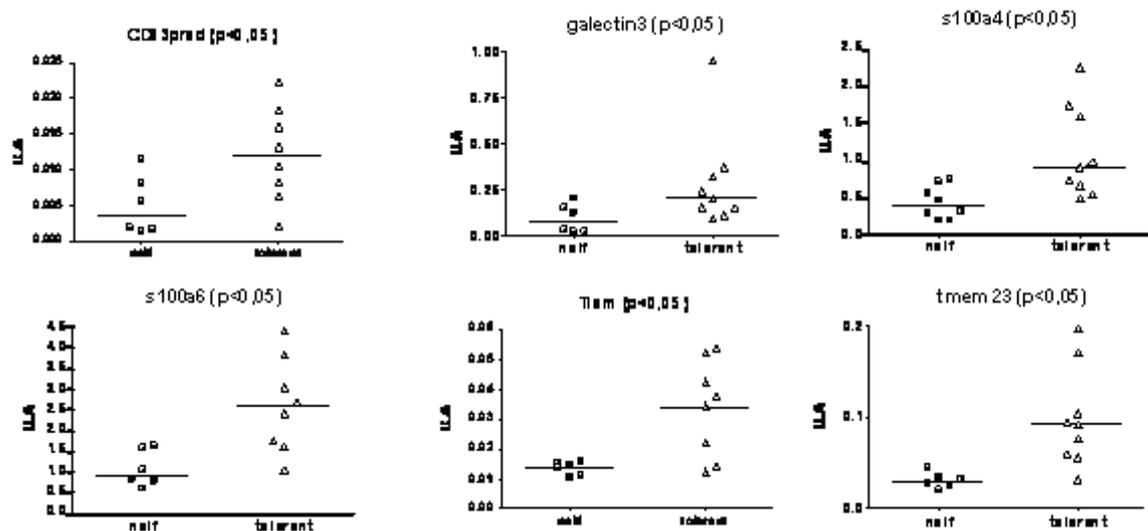


Figure 76. Expression relative des gènes mis en évidence dans d'autres types de lymphocytes T régulateurs. Analyse par PCR quantitative entre les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs

Les molécules déjà discutées ne sont pas représentées.

12. Autres gènes

Nr1d1 (Rev-erbalpha, FC : 2,4) est exprimé dans différentes cellules de la paroi vasculaire, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et certaines cellules du système immunitaire comme les macrophages. Rev-erbalpha augmente l'activation liée au TNF- α dans les cellules musculaires lisses. De plus, la surexpression de Rev-erbalpha dans ces cellules induit l'augmentation de l'expression des molécules pro-inflammatoires IL-6 et cyclooxygénase-2 (Duez and Staels 2008). Myadm (myeloid association marker, FC : 3,7), un nouveau gène dérivé d'une banque de cellules stromales de la moelle osseuse, est engagé dans la différenciation myéloïde (Wang, Li et al. 2007)

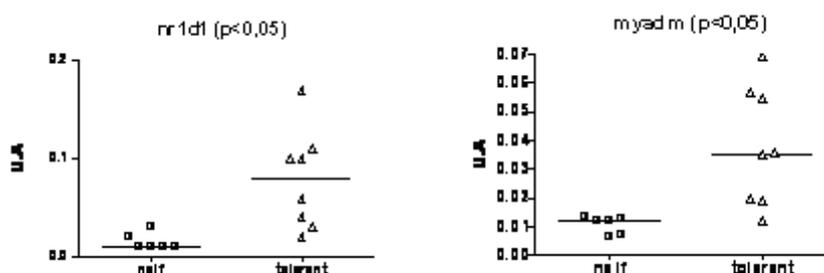


Figure 77. Expression relative des gènes Nr1d1 et Myadm1. Analyse par PCR quantitative entre les cellules CD8⁺CD45RC^{low} extraites de la rate d'animaux tolérants et naïfs

Discussion

La technique des puces à ADN nous a permis d'analyser le transcriptome des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} naturels et des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes induits par un adénovirus codant pour CD40-Ig chez le rat. Afin de caractériser ces lymphocytes T CD8⁺ tolérogènes, nous nous sommes intéressé aux gènes différentiellement exprimés relatifs à la fonction immune. L'expression différentielle de 51 gènes a été confirmée par PCR quantitative.

- **CMH-II**

Plusieurs gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II sont surexprimés dans les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}. La surexpression du CMH IIB a été confirmée par cytométrie de flux. Classiquement, les molécules du CMH de classe II sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigène telles les cellules dendritiques les macrophages et les lymphocytes B. Ces cellules sont capables d'internaliser un antigène exogène (par exemple, un allo-antigène), celui-ci va être dégradé en peptides qui vont être associés aux molécules du CMH II pour former un complexe qui sera présenté à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Dans les années 1970, les laboratoires de Schlossman et Kunkel ont démontré que les lymphocytes T humains circulants peuvent exprimer le CMH de classe II et encore plus après activation (Evans, Faldetta et al. 1978; Ko, Fu et al. 1979). Les molécules du CMH-II exprimés par les lymphocytes humains peuvent présenter des peptides aux autres lymphocytes T (Lamb and Fiedmann 1982; LaSalle, Ota et al. 1991; LaSalle, Tolentino et al. 1992), et la conséquence de la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T CD4⁺DR⁺ aux lymphocytes T autologues est une tolérance persistante en présence de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

En 2006, Baecher-Allan *et al.* ont démontré que l'expression de DR définit deux populations de lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺ aux fonctions distinctes : La population CD4⁺CD25⁺Treg DR⁺ présente une suppression précoce dépendante du contact cellulaire, alors que la population DR⁻ induit précocement une réponse immune de type Th2 suivie d'une suppression contact-dépendante médiée par Foxp3 (Baecher-Allan, Wolf et al. 2006). Il reste des discussions sur le fait que ces cellules sont DR⁺ ou DP⁺ (Swiatek-de Lange, Rist et al. 2008), mais il est établi que les lymphocytes Treg CMH-II existent chez l'Homme. Il est donc possible que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} CMH-II⁺ définissent une sous-population de lymphocytes Treg CD8⁺ chez le rat, de manière similaire à HLA-DR pour les lymphocytes Treg CD4⁺ chez l'Homme. Il serait intéressant de comparer la capacité des lymphocytes T CD8⁺ CD45RC^{low} CMH-II⁺ et CMH-II⁻ issus d'animaux traités avec CD40-Ig à transférer la tolérance.

La trogocytose correspond au transfert d'un fragment de membrane entre deux cellules. Chez l'Homme, il a été démontré que la plupart des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés peuvent acquérir le HLA-G1 des cellules présentatrices, et modifier leur fonction immune, passant d'une fonction effectrice à une fonction régulatrice (LeMaout, Caumartin et al. 2007). Dans notre étude, les transcrits de classe II sont augmentés, mais il est possible que les lymphocytes Treg CD8⁺ puissent acquérir d'autres molécules du CMH II par trogocytose, au contact des cellules présentatrices du donneur. Les cellules Treg CD8⁺ pourraient présenter l'alloantigène associé à leurs CMH II et supprimer la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ de manière alloantigène spécifique. De plus, une étude récente a montré que les lymphocytes T régulateurs CD4⁻CD8⁻ doubles négatifs sont capables de supprimer la réponse immune de manière antigène-dépendante via la trogocytose : en exprimant l'alloantigène acquis à leur surface ces cellules sont capables de tuer les lymphocytes T CD8⁺ syngéniques (Ford McIntyre, Young et al. 2008). Cependant, le test *in vitro* de suppression a montré que la fonction immunorégulatrice des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} était indépendante de contact avec les CD4⁺CD25⁻ (données non montrées). Ceci n'exclut pas la possibilité d'un phénomène de trogocytose *in vivo*, mais suggère que ce n'est pas l'unique mécanisme suppresseur utilisé par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}. Il faut ici souligner que les puces à ADN analysent le transcriptome des cellules, et que si les molécules CMH II sont acquises par ce phénomène, il n'y a pas de raison que les transcrits CMH II soient augmentés.

- **cytotoxicité**

Les lymphocytes T CD8⁺ CMH-II⁺ sont les principaux effecteurs de la cytotoxicité, et ce mécanisme peut également être régulateur. Les lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺ sont capables de tuer directement les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes B, et les monocytes dans les ganglions lymphatiques et dans les tissus cibles. Les lymphocytes Treg $\gamma\delta$ et doubles négatifs CD4⁻CD8⁻ présentent également des propriétés cytotoxiques via le système Fas/FasL. Dans l'article de Xystrakis (Xystrakis, Dejean et al. 2004), les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} naturels ne sont pas cytotoxiques, contrairement aux lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} naturels. Néanmoins, ces lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low} naturels ne sont pas capables d'induire une tolérance à une allogreffe cardiaque, contrairement aux lymphocytes Treg CD8⁺ induits par l'adénovirus CD40-Ig. Nous ne pouvons pas exclure que ces lymphocytes Treg CD8 tolérogènes soient capables de médier la cytotoxicité. La surexpression de gènes liés à ce mécanisme (Syntaxin 11, Fas/FasL, Granzyme C et K, Cystatin7, dapk) va dans ce sens. Les souches de souris déficientes en Fas ou FasL souffrent d'auto-immunité et de désordres lymphoprolifératifs sévères (Watanabe-Fukunaga, Brannan et al. 1992) (Nagata and Suda 1995), dûs à l'absence de délétion clonale induite par l'antigène en périphérie (Singer and Abbas 1994) (Wu, Zhou et al. 1994). FasL peut exister sous forme membranaire ou sécrétée, la forme sécrétée étant moins efficace que la forme cellulaire (Suzuki, Ichino et al. 1998). Pour être opérationnelle, la forme membranaire de FasL nécessite un contact cellulaire avec sa cible. Cette interaction peut être antigène spécifique, et n'aura ainsi pas de conséquence sur le répertoire de lymphocytes T non stimulés (Nishimura, Ishii et al. 1995), préservant l'immuno-compétence de l'organisme. On peut également émettre l'hypothèse que la surexpression de ces gènes relatifs à

l'apoptose dans les lymphocytes Treg CD8⁺ tolérogènes correspond à un mécanisme d'homéostasie. La présence de gènes liés à l'activation de la prolifération cellulaire (*prnp*, *Tieg*, *cflar*, *dusp2*, *cdkn1a*, *slamf7*) pourrait montrer que ces cellules tendent vers un équilibre entre apoptose et activation cellulaire.

- **IFN- γ et IL-12**

Dans l'étude menée par *Guillonnet al.*, il a été décrit que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} peuvent tuer indirectement leurs cibles via un mécanisme impliquant la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}, induisant la sécrétion d'Indoleamine 2,3-Dioxygénase par les cellules endothéliales. En accord avec cette étude, les puces à ADN ont montré une surexpression de transcrits IFN- γ qui a été confirmée par PCR quantitative mais aussi de TNF- α qui peut agir en synergie avec l'IFN- γ pour induire l'IDO (Robinson, Shirey et al. 2003). De nombreuses études ont décrit la nature pro-inflammatoire de l'IFN- γ et son implication dans les maladies auto-immunes. Paradoxalement, la susceptibilité et la sévérité de souris sujettes à certaines maladies auto-immunes, telles que l'EAE ou l'arthrite induite par le collagène, augmentent chez les souris déficientes pour l'IFN- γ ou son récepteur (Ferber, Brocke et al. 1996) (Vermeire, Heremans et al. 1997) (Manoury-Schwartz, Chiochia et al. 1997). L'IFN- γ est en fait nécessaire à l'expression de Foxp3 et à la conversion des lymphocytes Treg CD4⁺ durant l'EAE (Wang, Hong et al. 2006). L'IFN- γ est également capable d'induire l'expression de molécules de costimulation négative par les lymphocytes T inflammatoires synoviaux et les macrophages dans l'arthrite rhumatoïde (Wan, Nie et al. 2006). L'IFN- γ est aussi capable de réguler l'expression du CMH-II en agissant sur CIITA (MHC class II transactivator) (Steimle, Siegrist et al. 1994), néanmoins, les puces n'ont pas permis de détecter de différentiel d'expression pour ce gène.

L'IL-12p70 est une cytokine formée de deux sous-unités (p40 et p35) participant à l'induction des réponses de type Th1, et a longtemps été décrite comme un médiateur du rejet d'allogreffe. Les deux sous-unités de l'IL-12p70 (p40 et p35) sont surexprimées dans les greffons des animaux tolérants. L'expression de l'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ peut être induite par l'activation du récepteur à l'IL-12 (Gerosa, Paganin et al. 1996), dont la sous-unité β 1 est surexprimée par les lymphocytes Treg CD8⁺ tolérogènes et dans les greffons des animaux tolérants. Récemment, l'IL-12p70 a été démontré comme capable de retarder le rejet aigu (Verma, He et al. 2001) et est capable d'inhiber la maladie de l'hôte via le greffon (Dey, Yang et al. 1998). Il est maintenant acquis que l'action immunosuppressive de l'IL-12p70 est médiée par l'IFN- γ et comprend l'induction de nitric oxide synthase et d'IDO par les cellules présentatrices d'antigène (Wood and Sawitzki 2006). La sous-unité β 2 du récepteur à l'IL-12 est également surexprimée par les lymphocytes Treg CD8 dans les puces mais n'a pas été confirmée par PCR quantitative ; cette sous-unité a été décrite dans un article récent comme capable de promouvoir le développement des lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺ (Zhao, Yu et al. 2008). Les cellules dendritiques sont capables de produire l'IL-12 (Macatonia, Hosken et al. 1995), qui pourrait déclencher la production de l'IFN- γ par les lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low}. D'autre part, l'IL-17 a été démontrée comme jouant un rôle dans le rejet d'allogreffe : son inhibition réduit l'infiltrat inflammatoire et retarde le rejet aigu dans des modèles murins (Tang, Subbotin et al. 2001; Wood and

Sawitzki 2006) (Li, Simeoni et al. 2006). Les voies de signalisations IL-12/IFN- γ et IL-23/IL-17 se régulent entre elles : IFN- γ est un suppresseur de la synthèse de l'IL-23, du développement Th17 et de la production de l'IL-17 alors que le TGF- β inhibe la réponse à l'IFN- γ et favorise la différenciation Th17 (Murphy, Langrish et al. 2003) (Veldhoen and Stockinger 2006) (Cruz, Khader et al. 2006). L'importance de l'inhibition de l'IL-17 dans notre modèle d'induction de tolérance reste à démontrer.

- **Fgl2**

Plusieurs gènes régulés par l'IFN- γ sont surexprimés dans les lymphocytes Treg CD8⁺ tolérogènes (Oas1, Muc4, Fgl2); Fgl2 (Fibrinogen-like protein 2) représentant le gène le plus intéressant dans notre modèle (Lafuse, Castle et al. 1995). Fgl2, aussi connu sous le nom de fibroleukine a d'abord été décrit comme une protéine associée à la membrane ayant une activité prothrombinase (Chan, Chan et al. 2002) impliquée dans la pathogénèse de plusieurs maladies dont le rejet d'allogreffe et de xéno greffe (Ning, Sun et al. 2005) (Ghanekar, Mendicino et al. 2004). Les lymphocytes T sont capables de sécréter Fgl2 (Marazzi, Blum et al. 1998) et les transcrits Fgl2 sont plus importants dans les lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Herman, Freeman et al. 2004; Fontenot, Rasmussen et al. 2005) et CD8 $\alpha\alpha$ intraépithéliaux (Denning, Granger et al. 2007). Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ issus de souris Fgl2^{-/-} montrent une activité immunorégulatrice réduite (Shalev, Liu et al. 2008). *Chan et al.* ont montré que la protéine Fgl2 recombinante est capable d'inhiber la maturation des cellules dendritiques et la prolifération des lymphocytes T stimulés par les alloantigènes, l'anti-CD3/anti-CD28 et la Con A (Chan, Kay et al. 2003). Fgl2 est capable d'inhiber la maturation des cellules dendritiques et d'induire l'apoptose des lymphocytes B en fixant le récepteur Fc γ RIIB et est capable de prolonger la survie d'une greffe de peau chez la souris (Liu, Shalev et al. 2008). Nous avons démontré que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes expriment une plus grande quantité de transcrits Fgl2, et nous avons observé une tendance à la surexpression de ces transcrits dans les greffons des animaux tolérants. De plus, *in vitro*, le blocage de Fgl2 à l'aide d'un anticorps monoclonal bloque l'action immunosuppressive de ces lymphocytes Treg CD8⁺ et cette immunosuppression n'est pas dépendante du contact avec les cellules cibles, ce qui semble indiquer que les lymphocytes Treg CD8⁺ sécrètent bien la molécule Fgl2 immunorégulatrice. On peut supposer que Fgl2 inhibe la maturation des cellules dendritiques *in vitro* via leur récepteur Fc γ RIIB après que ces cellules aient activé les lymphocytes Treg CD8⁺, ou qu'elles inhibent directement la prolifération des lymphocytes T CD4⁺. Il reste également à démontrer l'importance du Fgl2 dans notre modèle *in vivo* d'induction de la tolérance. Pour cela, nous souhaitons réaliser un AAV codant pour Fgl2 qui sera injecté dans le muscle de l'animal afin d'observer si cette molécule est capable d'induire une augmentation de la survie du greffon en allogreffe cardiaque chez le rat. Nous projetons également de mettre au point un test ELISA afin de doser la concentration de Fgl2 *in vivo* et *in vitro*.

Socs1, est également surexprimé par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes. Socs1 est un répresseur inductible de l'IFN- γ (Alexander, Starr et al. 1999). Une étude récente (Feng, Wood et al. 2008) a montré que l'IFN- γ exogène est capable d'induire la surexpression de Socs1 chez des lymphocytes T CD4⁺ naïfs de souris, mais également la surexpression de Foxp3 et CD62L. De plus,

ces lymphocytes sont capables de prévenir le rejet d'une allogreffe de peau et d'îlots de Langherans. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'IFN- γ , via Socs1, est capable de supprimer l'expansion des lymphocytes Th2 et Th17, en inhibant respectivement la signalisation liée à l'IL-4 et au récepteur de l'IL-6. Cette inhibition va permettre aux lymphocytes Treg de devenir la population dominante. Un autre article a également décrit que le traitement de lymphocytes T CD4⁺Foxp3⁺ avec de l'IFN- γ exogène induit la surexpression de Foxp3 (Wang, Hong et al. 2006) . Néanmoins, l'expression des transcrits Foxp3 ne varie pas entre les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} tolérogènes et naïfs (Guillonnet, Hill et al. 2007). Cependant, les greffons d'animaux tolérants expriment significativement plus de transcrits Foxp3 (Guillonnet, Hill et al. 2007). L'importance de Socs1 et Foxp3 dans ces lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low} restent à démontrer.

- **chimiokines**

L'IFN- γ est également capable d'induire des chimiokines telles que Cxcl9 (Farber 1993), Cxcl10 (Luster, Jhanwar et al. 1987) et Cxcl11 (Cole, Strick et al. 1998) qui sont surexprimées dans les greffons des animaux tolérants. Le récepteur de ces chimiokines, Cxcr3, est également surexprimé dans les greffons des animaux tolérants, mais aussi par les lymphocytes Treg CD8 tolérogènes. Cxcr3 est nécessaire à la migration des lymphocytes T CD8 mémoires CD8⁺CD45RC^{low} (Mohan, Cordeiro et al. 2005). Les récepteurs des chimiokines Ccr2 et Ccr5 sont également surexprimés par les lymphocytes Treg CD8⁺ tolérogènes. Ccr2 (Bruhl, Cihak et al. 2004) et Ccr5 (Moreira, Cavassani et al. 2008) jouent des rôles importants dans la migration des lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺. La grande majorité des ligands de ces récepteurs est surexprimée dans les greffons des animaux tolérants et ils pourraient jouer un rôle dans la migration des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}. Une stratégie pour évaluer l'importance de ces récepteurs *in vivo* serait d'utiliser un vecteur adénoviral codant pour une molécule inhibitrice (par exemple RANTES muté pour Ccr5 ou MCP1 pour Ccr2) dans notre modèle d'induction de la tolérance par CD40-Ig.

- **adhésion**

Les intégrines bêta-1 et bêta-7 sont surexprimées par les lymphocytes Treg CD8 tolérogènes. Plusieurs types d'intégrines ont été démontrés comme impliqués dans la fonction des lymphocytes Treg CD4⁺ : l'intégrine alpha E (CD103) (Allakhverdi, Fitzpatrick et al. 2006) et les intégrines alpha4-bêta7 et alpha4-bêta1 (Stassen, Fondel et al. 2004) qui définissent plusieurs sous-populations de lymphocytes Treg CD4⁺ et l'intégrine beta 2 (CD18) est nécessaire à leur développement et à leur fonction (Marski, Kandula et al. 2005). On peut donc supposer que la présence d'intégrines peut favoriser l'adhérence au site nécessitant une immuno-modulation suite à la migration des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}.

- **NK**

Plusieurs gènes décrits chez les cellules NK sont surexprimés dans les lymphocytes T CD8⁺ tolérogènes. (klrg1, nkg2a, nkg2c, Nkg7, ocil). Les récepteurs des cellules NK ne sont pas restreints à cette population cellulaire et ont été décrits dans la plupart des cellules hématopoïétiques, y compris dans les lymphocytes T CD8⁺ mémoires. Ainsi, l'expression des molécules Ly49 (récepteur spécifique

du CMH I) n'est pas détectable chez les lymphocytes T CD8⁺ naïfs mais est observée sur les lymphocytes T CD8⁺ portant des marqueurs des phénotypes mémoires (Mingari, Schiavetti et al. 1996). Plusieurs gènes de la famille des molécules Ly49 sont surexprimés dans les puces CD8⁺CD45RC^{low} provenant d'animaux tolérants, néanmoins ces résultats n'ont pu être confirmés par PCR quantitative (données non montrées). Klr1 (killer cell lectin-like receptor G1) est exprimé par les cellules NK mais aussi par une sous-population de lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Beyersdorf, Ding et al. 2001) et lie des molécules de la famille des cadherines (Grundemann, Bauer et al. 2006; Ito, Maruyama et al. 2006). Une étude chez la souris a également démontré que l'expression de Klr1 définit une population de lymphocytes régulateurs CD4⁺ et que ces lymphocytes T CD4⁺Klr1⁺ sont majoritairement CD45RB^{low} (Beyersdorf, Ding et al. 2007). De plus, Klr1 est induit par la voie de l'IL-12 (Wilson, Matthews et al. 2008). La fonction de cette molécule reste inconnue mais pourrait intervenir dans la suppression médiée par contact cellulaire

CD94 a été initialement décrit sur les cellules NK et forme des hétérodimères avec NKG2A (CD94:NKG2A) et NKG2C (CD94:NKG2C). La liaison avec son ligand HLA-E (Qa1) induit un signal positif lorsqu'il est associé à NKG2C et négatif avec NKG2A. NKG2A et NKG2C sont surexprimés dans les lymphocytes Treg CD8⁺ tolérogènes alors que le différentiel d'expression de CD94 observé lors de l'analyse des puces n'a pas été confirmé par PCR quantitative. Les lymphocytes T CD8⁺ TCR $\gamma\delta$ NKG2A intra-épithéliaux du petit intestin utilisent NKG2A pour supprimer la cytotoxicité induite par les lymphocytes T CD8⁺TCR $\alpha\beta$ (Bhagat, Naiyer et al. 2008). CD94/NKG2C pourrait constituer une voie alternative d'activation d'une sous-population de lymphocytes T CD8⁺ (Guma, Busch et al. 2005). D'autre part, Ocil lie le récepteur NKRP-1 (CD161), capable d'inhiber la cytotoxicité médiée par les cellules NK et est également surexprimé (tout comme NKG2A) dans le greffon des animaux tolérants (Carlyle, Jamieson et al. 2004).

- **costimulation**

La costimulation joue un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T et il est de prime abord assez surprenant d'observer la surexpression des molécules de costimulation positives CD137L (lie CD137), CD86 (lie CD28) et ICAM-1 (un co-récepteur, lie LFA-1) par les lymphocytes Treg CD8⁺ tolérogènes alors que ces molécules sont classiquement exprimées par les CPA. Comme les molécules du CMH II, la trogocytose est une hypothèse plausible, mais bien évidemment les puces à ADN sont incapables de détecter ce phénomène. Il reste étonnant de retrouver des molécules costimulatrices sur des lymphocytes T régulateurs. Paradoxalement, l'utilisation transitoire d'anticorps agonistes anti-CD137 est capable d'inhiber la réponse auto-immune dans plusieurs modèles murins (Sun, Chen et al. 2002; Sun, Lin et al. 2002; Foell, Strahotin et al. 2003). Les anticorps anti-CD28 agonistes sont capables de protéger des souris NOD (Non-obese diabetic) contre le diabète (Cameron, Arreaza et al. 1997) (Arreaza, Cameron et al. 1997) et sont potentiellement capables d'activer et d'élargir les lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺ (Beyersdorf, Hanke et al. 2005) (Hunig and Dennehy 2005). ICAM-1 serait capable d'induire la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺ (http://www.jimmunol.org/cgi/content/meeting_abstract/178/MeetingAbstracts/S145). L'augmentation du

signal de costimulation pourrait agir via plusieurs mécanismes. 1) Favoriser les mécanismes d'AICD (Activation Induced Cell Death). 2) Induire l'anergie des lymphocytes T CD4⁺. 3) Améliorer les fonctions régulatrices de certaines sous-population de lymphocytes, par exemple l'activation de CD28 joue un rôle important dans l'homéostasie des lymphocytes Treg (Bour-Jordan and Blueston 2002). 4) Favoriser la production d'IFN- γ par les lymphocytes T qui va activer les macrophages pouvant médier l'apoptose des lymphocytes. 5) Favoriser la production de cytokines protectrices comme l'IL-4 ou l'IL-10. 6) Inhiber la présentation des antigènes par les CPA, induisant l'anergie des lymphocytes T CD4⁺ (Sun, Subudhi et al. 2003).

Les tests de suppression *in vitro* utilisant un anticorps anti-ICAM1 ou une protéine de fusion CD137LFC sont difficiles à analyser compte tenu du rôle ambivalent de ces molécules. En effet, si les molécules de costimulation peuvent jouer un rôle dans la suppression, elles jouent aussi un rôle dans la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ médiée par les pDC. Le blocage de la molécule de costimulation étudiée n'est pas spécifique des lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low} et aura un effet direct sur la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ dépendant des molécules de costimulation. Pour éviter ces difficultés, nous souhaitons développer des outils permettant de transférer des shRNA dans les lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low} afin de cibler spécifiquement l'inhibition de molécules d'intérêt dans notre test *in vitro* par RNA interference. Cette approche nous permet de contourner deux autres difficultés liées à notre modèle 1) Le nombre d'anticorps inhibiteurs dirigés contre les molécules issues du rat est limité. 2) La difficulté d'inhiber une molécule d'intérêt lorsqu'elle est intracellulaire et qu'aucun agent chimique inhibiteur n'est décrit. Nous avons essayé plusieurs techniques pour transférer les lymphocytes T primaires de rat (lipofection, électroporation, nucléofection, lentivirus...) et la méthode la plus efficace consiste à infecter les lymphocytes T avec un lentivirus suite à leur activation (>80% de cellules GFP+ avec un lentivirus contrôle). Nous devons maintenant tester si l'activation des lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low} ne perturbe pas leurs capacités suppressives avant de pouvoir utiliser ces shRNA.

- **Treg**

Plusieurs gènes surexprimés par les lymphocytes Treg CD8⁺ tolérogènes ont été décrits dans d'autres études de puces à ADN de lymphocytes T régulateurs (*ccr2*, *ccr2*, *cxcr3*, *klrg1*, *fgl2*, *Nkg7*, *slamf7*, *socs1* dont nous avons déjà discuté, mais aussi *CD83*, *galectin3*, *s100A4*, *s100a6*). *CD83* a été initialement décrit comme un marqueur de l'activation des cellules dendritiques avant que l'on ne lui découvre un rôle dans la régulation des lymphocytes B, la maturation thymique et l'activation périphérique des lymphocytes T. L'expression de *CD83* peut également contribuer à la fonction immunosuppressive des lymphocytes Treg CD4⁺ (Reinwald, Wiethe et al. 2008). *S100A4*, membre de la famille des protéines fixant le calcium impliqué dans la régulation de diverses activités biologiques, pourrait être responsable de la lyse médiée par les lymphocytes Treg TCR $\gamma\delta$ (Senolt, Grigorian et al. 2006). La *galectin-3* est une lectine fixant la β -galactosidase et pourrait réguler l'activité des cellules dendritiques (Bernardes, Silva et al. 2006). L'importance de l'expression des autres gènes dans le mécanisme de suppression des lymphocytes Treg reste à caractériser.

Les PCR quantitatives réalisées sur les greffons confirment rarement les résultats obtenus à partir des lymphocytes Treg CD8⁺ isolés. Il serait intéressant d'analyser l'expression de ces gènes d'intérêt sur des lymphocytes infiltrants le greffon car, dans notre étude, les transcrits présents dans le tissu environnant peuvent parasiter l'analyse.

Les micro ARN (miRNA) sont des ARN simple brins capables d'exercer une répression post-transcriptionnelle. En s'appariant aux ARN messagers, ils guident leur dégradation, ou la répression de leur traduction en protéine. L'endonucléase Dicer est indispensable à la maturation de ces miRNA. Récemment, deux études se sont intéressées aux lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺ chez la souris Dicer^{-/-} (Liston, Lu et al. 2008; Zhou, Jeker et al. 2008). Les Treg CD4⁺CD25⁺ déficients pour Dicer perdent leur activité suppressive *in vivo* et les souris Dicer^{-/-} développent une maladie auto-immune. Les miRNA semblent donc importants dans la fonction des lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺. Les puces à ADN utilisées dans notre étude ne sont pas capables d'analyser les différences d'expression des miRNA entre les lymphocytes Treg CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'animaux naïfs et tolérants. Nous ne pouvons donc pas discuter de l'importance du mécanisme des miRNA dans notre modèle. La société Agilent Technologies a développé des puces à miRNA chez le rat, et il serait intéressant d'analyser les différences d'expression entre les deux populations de lymphocytes Treg CD8⁺ à ce niveau.

Cette étude est basée sur la confirmation par PCR quantitative des résultats obtenus par Puces à ADN. En raison du nombre important de gènes différentiellement exprimés par sur les puces (349), nous nous sommes intéressés aux gènes impliqués dans la réponse immune (80). J'ai préparé et testé l'efficacité de plus d'une centaine de paires de primers pour pouvoir les utiliser en PCR quantitative. Cette étape est particulièrement fastidieuse et pourrait aujourd'hui être évitée grâce au système de cartes microfluidiques d'Applied Biosystems. Ce système de PCR en temps réel à « haut débit » se caractérise par une série de mini-réacteurs PCR pré-chargés sur un support de cartes microfluidiques portant les sondes TaqMan pré-désignées (TaqMan Low Density Array). Ce système est partiellement automatisé et capable d'analyser simultanément 384 échantillons avec un niveau de confiance de 99,7 % lors d'une analyse d'un gène dont l'expression est doublée entre deux conditions cellulaires différentes. Les sondes utilisées par la puce pourraient être utilisées sur ces cartes microfluidiques. Notre démarche évite de dupliquer les problèmes liés aux sondes si elles sont erronées, mais le risque d'erreur humaine et le temps nécessaire sont des facteurs non négligeables.

Les puces à ADN restent limitées dans leur capacité à quantifier un faible nombre de copies d'ARN, leur gamme de détection (2-3 log), le design des sondes et leur reproductibilité. Les nouvelles plateformes de séquençage à haut débit (ex : la plateforme SOLiD d'Applied Biosystems ou la plateforme Illumina GA) permettent de dépasser ces obstacles et ouvrent une nouvelle ère en permettant de séquencer le transcriptome entier, ce qui permet de gagner en sensibilité (100X plus sensible), en gamme de détection (5 log), et d'éviter les problèmes liés aux sondes ((Shendure 2008) et fiche technique Applied Biosystems « SOLiD™ System High-throughput Analysis of Differential Gene Expression »)

Finalement, l'étude du transcriptome des lymphocytes Treg CD8⁺CD45RClow issus d'animaux traités par un adénovirus CD40-Ig par puce à ADN a permis d'établir de nombreuses hypothèses quant aux mécanismes impliqués dans l'induction de la tolérance. La voie de l'IL-12/IFN- γ semble jouer un rôle central, notamment par l'induction de la protéine immuno-régulatrice Fgl2. La présence des molécules du CMH de classe II semble également importante. Les autres hypothèses énoncées ne sont pas basées sur des expériences préliminaires et sont donc plus fragiles (migration via certaines chemokines, adhérence au site d'action via les intégrines, présentation de l'alloantigène, cytotoxicité, relation avec les cellules NK, costimulation entraînant la mort cellulaire...). Il faut également souligner que de nombreuses molécules surexprimées par les lymphocytes CD8⁺ Treg ont été observées dans d'autres analyses de lymphocytes Treg par puces à ADN, indiquant que les mécanismes utilisés par ces CD8⁺ Treg ne sont pas uniques. Globalement, cette étude montre la diversité des mécanismes potentiellement mis en jeu par ces lymphocytes CD8 Treg tolérogènes.

**Mise en place d'un modèle de transfert de gene par
vecteur viral chez le primate pour l'évaluation de
l'induction de tolerance via le blocage des voies de
costimulation CD28/B7 et CD40/CD40L et suivi
immunologique**

Matériels et Méthodes

1. Préparation des vecteurs et tests *in vitro*.

La partie extra-membranaire du CD40 humain est amplifiée par PCR, à partir de cellules dendritiques humaines matures. Le CD40 est ensuite cloné dans un plasmide contenant le peptide signal de l'oncostatine et le fragment Fc de l'IgG1 humaine. La présence du fragment Fc permet d'augmenter le poids moléculaire de la protéine CD40 et confère une durée de vie plus longue. Les IgG ne sont pas éliminées par le rein et sont recyclées dans la circulation via les récepteurs FcR γ présents sur les cellules endothéliales (Salveti, Oräve et al. 1998). Le CD40-Ig est séquencé et cloné dans un plasmide vecteur pZA, sous le contrôle du promoteur RSV, en amont du WPRE avec les ITR de l'AAV de sérotype 2.

Au laboratoire, Vanhove *et al.* (Vanhove, Laflamme et al. 2003) ont développé un anticorps monovalent antagoniste provenant de la fusion d'un fragment ScFv (Single chain fv) de l'anticorps humain bloquant de haute affinité avec l'alpha1 anti-trypsine humaine afin d'augmenter la taille de la protéine et ainsi allonger la demi-vie de sérique l'anticorps (Ferkol, Eckman et al. 2000). La protéine obtenue est appelée sc28AT. Cette molécule permet d'inhiber l'interaction CD28/B7 tout en laissant l'interaction CTLA4/B7 inhibitrice libre. *In vitro*, sc28AT est capable d'inhiber une réaction lymphocytaire mixte chez l'Homme et le macaque. Le plasmide du sc28-AT est cloné dans le même de vecteur.

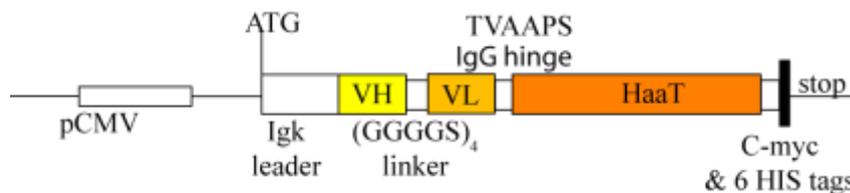


Figure 78. Construction scFv28.3-Haat

Les fragments d'ADNc codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères de l'anticorps CD28.3 ont été assemblés avec un linker (GGGGS) $_4$ et lié à un ADNc codant pour les acides aminés 53 à 425 de l'ADNc Haat. D'après (Vanhove et coll. 2003)

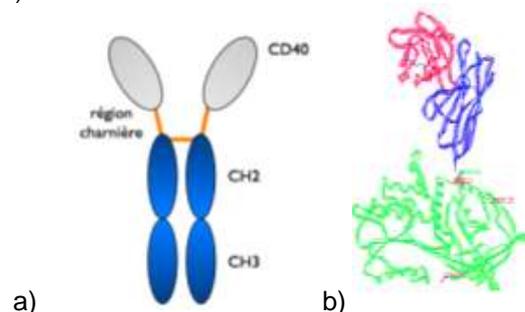


Figure 79. Représentation des protéines recombinantes CD40-Ig et sc28AT

a) Représentation de CD40-Ig. En bleu, le fragment Fc composé des domaines constants CH2 et CH3, et la région charnière de la chaîne lourde de l'IgG1 humaine. Les homodimères sont reliés entre eux par des ponts disulfures. En gris, la partie extracellulaire du CD40 humain.

b) Représentation du sc28AT. En rouge, le paratope de l'anticorps anti-CD28 CD28.3. En bleu, Le « single chain » Fv VH-VL de l'anticorps anti-CD28 CD28.3. En vert l'alpha-1-antitrypsine humaine.

- **CD40-Ig**

Des cellules 293 ont été co-transfectées par lipofection avec le plasmide AAV-CD40-Ig et le gène de résistance à la néomycine. Un clone résistant à la néomycine et produisant la molécule humaine (hCD40-Ig) a ensuite été cloné par dilution limitante. CD40-Ig a été purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine G et quantifié par ELISA. L'ELISA sandwich est réalisé en recouvrant une plaque Maxisorp (Nunc) avec un anticorps anti-CD40-Ig de souris (1 µg/ml) (Immunotech, mAb89). Après saturation, des dilutions sériées de l'échantillon à doser sont déposées. Un anticorps anti-CD40-Ig de chèvre est utilisé (0,7 µg/ml) (R&D systems, AF632) suivi d'un anticorps biotinylé anti-IgG de chèvre (Jackson). La fixation est révélée par de la streptavidine couplée à la peroxydase et addition de substrat ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) (Sigma). La réaction colorimétrique est lue à 405nm par un spectrophotomètre. Une gamme étalon de CD40-Ig (Alexis, ALX-522-016) est utilisée comme référence.

Afin de tester la capacité du CD40-Ig à se fixer sur des lymphocytes activés de l'Homme et du macaque, les cellules mononuclées du sang périphérique sont activées par de la PMA (20 ng/ml) et de la ionomycine (300ng/ml) durant 6 heures. Les cellules sont incubées avec du hCD40-Ig puis avec un anti-IgG humain-FITC. La fluorescence est analysée par cytométrie en flux (Facs Calibur).

Les lymphocytes B prolifèrent sur un tapis de fibroblastes mitomycinés exprimant CD40L (cellules L transfectées avec le CD40L, don de F. Briere, Schering-Plough, Dardilly) dans un milieu contenant de l'IL-2 (50 U/ml) et de l'IL-10 (50 ng/ml). Les lymphocytes B sont ainsi cultivés pendant 3 jours en présence ou non de CD40-Ig et la prolifération est mesurée par addition de thymidine tritiée 16 heures avant la fin de la culture.

- **Sc28AT**

Une transfection transitoire est réalisée par lipofection de cellules 293 par le plasmide AAV-sc28AT. Le sc28AT présent dans le surnageant est quantifié par ELISA sandwich. Une plaque Maxisorp (Nunc) est recouverte avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'alpha-1-anti-trypsine humaine (0,25 µg/ml) (TcLand). Après incubation et saturation des sites réactifs, les dilutions sériées de l'échantillon à doser sont déposées. Un anticorps biotinylé anti-alpha-1-Anti-Trypsine de chèvre est utilisé (Abcam). La streptavidine couplée à la peroxydase (Vector) est ensuite déposée et la révélation est développée avec le TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), stoppée avec du H₂SO₄ et lue à 450nm par un spectrophotomètre. Une gamme étalon de sc28AT de concentration connue est utilisée comme référence. L'activité de la molécule étudiée est comparée à la molécule sc28AT de référence en comparant leur capacité de fixation au CD28Fc humain (R&D Systems) fixé sur une plaque Maxisorp (Nunc). La réaction se fait comme précédemment, par utilisation d'un anticorps anti-AT-IgG de lapin, un anti-lapin couplé à la peroxydase et addition du substrat (Tetra Methyl Benzidine).

Les vecteurs viraux recombinants sont produits par la plateforme de production de vecteurs viraux pré-cliniques du GVPN de Nantes (Inserm U649). Les sérotypes 1 et 8 de l'AAV sont retenus car ce sont des vecteurs très efficaces chez le primate (Chenuaud, Larcher et al. 2004; Rivera, Gao et

al. 2005). D'après des résultats préliminaires l'efficacité de ces deux sérotypes est équivalente quand le mode d'administration est adapté et cela nous permet d'élargir l'éventail de choix des animaux dont l'immunisation spontanée contre ces virus est assez fréquente (P. Moullier et I. Anegon, communication personnelle).

2. Injection des animaux.

Les expériences sont conduites chez des macaques cynomolgus (*macacus fascicularis fascicularis*) mâles de 3-5kg élevés en captivité (BioPrim). Les animaux sont sélectionnés sur la base de l'absence d'anticorps dirigés contre les AAV de sérotype 1 ou 8 dans le sérum. Sous anesthésie à la kétamine (10 mg/kg) l'AAV est injecté en perfusion rétrograde dans la veine saphène interne après pose d'un tourniquet (Su, Gopal et al. 2005). Le virus, à la dose de $3.5 \cdot 10^{12}$ vg/kg, est dilué en solution de Ringer-lactate (50ml/kg) et perfusé sous pression (300 mm Hg). Quinze minutes après, le tourniquet est enlevé.

Afin de limiter l'immunisation contre le vecteur mais surtout contre le transgène tant qu'il sera produit en quantités inefficaces les animaux sont traités pendant la période précoce après injection (3 semaines) avec du Cellcept (40mg/kg/j) et de la prednisolone (5mg/j). En cas d'association les virus sont injectés dans la même perfusion.

Les animaux sont injectés en laboratoire A3 puis déclassés en A2 après 15 jours.

Les animaux recevant le CD40-Ig sont suivis sur le plan de la coagulation afin de prévenir le risque thromboembolique qui a été observé avec certains anticorps anti-CD40L (Schuler, Bigaud et al. 2004).

La détermination de la concentration en particules virales présentes chez l'animal est effectuée en extrayant l'ADN de l'AAVr d'échantillons biologiques à l'aide du «Qiamp Viral RNA minikit» (Qiagen). Un dixième de l'extrait (8 ul) est analysé par PCR quantitative par amplification du gène WPRE en utilisant les amorces 5'-agggtggcaacacaggcga-3' et 5'-ttgggcactgacaattccg-3' et le SYBR Green master mix 2 avec un appareil ABI PRISM 77000 Sequence Detection System. Le nombre de copies de virus présentes dans l'échantillon biologique est déterminé en comparant la valeur obtenue avec une gamme de particules virales extraite de concentration connue.

L'infectiosité des particules est déterminée à l'aide d'un test de Replication Center Assay (RCA). 200 µl d'échantillon biologique sont ajoutés à des cellules HeLaRC32 subconfluentes pendant deux heures. Après deux jours, les cellules sont récoltées et filtrées sur une membrane Zetaprobe (Biorad). Les filtres sont hybridés avec une sonde spécifique du CD40-Ig marquée à la fluorescéine (Amersham, Gene Images random prime labeling module) et exposés sur un film autoradiographique selon les recommandations du fabricant (Amersham, Gene Images CDP-Star detection module). Les résultats sont comparés à une gamme étalon.

3. Greffe de rein

Les greffes sont réalisées en condition ABO compatible et les combinaisons donneur/receveur sont sélectionnées sur l'incompatibilité DR déterminée par génotypage de l'exon 2. Ces tests sont pratiqués par le Pr A Blancher à Toulouse.

Brièvement, l'anesthésie générale est effectuée par du Zoletil (15 mg/kg en IM) et prolongée avec de l'isoflurane à 5 %. L'animal est hépariné durant le prélèvement du greffon et son implantation (0,5 mg/kg). L'allogreffe rénale est implantée selon les procédures microchirurgicales standard afin de créer une anastomose entre l'artère rénale du donneur et l'aorte distale du receveur ainsi qu'entre la veine rénale du donneur et la veine cave du receveur.

- **Suivi des animaux greffés**

Les animaux greffés reçoivent un remplissage adapté au bilan sanguin et à la diurèse. La diurèse des 24 heures est relevée tous les jours et un bilan sanguin comprenant la créatininémie et un ionogramme, ainsi qu'une numération sanguine et un bilan de coagulation avec taux de Prothrombine et Temps de Céphaline Activée et numération de plaquettes est prélevé tous les jours.

- **examen anatomopathologique**

Lorsque la créatininémie augmente de plus de 30% par rapport à la ligne de base, en dehors de toute cause obstructive ou fonctionnelle, ou que l'état général se dégrade nettement, le receveur est repris pour examen macroscopique du greffon, transplantectomie en cas de rejet, et euthanasie. Le schéma anesthésique est le même que précédemment décrit. Le greffon est examiné et biopsié. Un fragment est mis dans du liquide de Carnoy, pour examen anatomopathologique par un pathologiste habitué à l'analyse des biopsies rénales chez l'homme. La classification de Banff est utilisée pour interpréter les biopsies. Un autre fragment est congelé dans du Tissue-Tek® pour examen immuno-histochimique. Un fragment supplémentaire est congelé dans l'azote liquide pour analyse transcriptionnelle ultérieure.

4. Evaluation de la réponse immune

- **Capacité de réponse humorale:**

Afin d'évaluer la capacité de réponse immune de animaux traités, leur réponse à divers antigènes à plusieurs antigènes est étudiée.

D'une part et indépendamment de la greffe de rein l'immunisation vis-à-vis des transgènes sera évaluée par test ELISA. La molécule CD40-Ig n'était pas immunogène chez le rat malgré la présence d'un fragment Fc xénogénique et chez le primate l'homologie sera plus importante. La molécule sc28-AT semble présenter des capacités immunogènes variables selon les espèces de singe lors de traitement d'induction et selon la qualité des préparations injectées (études en cours). L'association des deux molécules devrait limiter cette immunisation (Guillonnet, Seveno et al. 2007).

La présence d'anticorps anti-sc28AT est déterminée par ELISA. 500ng de sc28AT est déposé dans des plaques Maxisorps (Nunc). Après saturation des sites réactifs, les dilutions sériées de sérum sont distribuées. Les anticorps anti-IgG ou anti-IgM de lapin (Pharmingen) sont ensuite utilisés. Un anti-lapin couplé à la peroxydase est ensuite déposé, la réaction est développée avec de l'ABTS et l'absorbance lue à 405nm. Un sérum de macaque traité par sc28AT et connu pour être immunisé est utilisé comme contrôle positif.

Pour déterminer la présence d'anticorps anti-CD40-Ig dans le sérum des animaux injectés, une plaque Maxisorp (Nunc) est préparée avec 500ng de CD40-Ig par puits. Les dilutions sériées de sérum sont ensuite distribuées dans les plaques. Un anticorps anti-Fab couplé à la peroxydase est utilisé. La réaction est développée avec de l'ABTS et l'absorbance lue. Le sérum d'un macaque immunisé contre le LEA29Y est utilisé comme contrôle.

- **Réponse humorale mémoire et autoréactivité**

Le développement des réponses mémoires est évalué en pratiquant une vaccination anti-tétanique des animaux avant toute injection de vecteur viral. A distance et après expression prolongée des transgènes les animaux reçoivent une nouvelle injection et la réponse humorale secondaire sera mesurée et comparée à celle observée chez les animaux contrôle.

Les molécules de costimulation sont aussi impliquées dans le développement des cellules régulatrices (Kumanogoh, Wang et al. 2001; Haspot, Seveno et al. 2005) et leur rôle pourrait aussi être important dans la maintenance de ces cellules. C'est pourquoi nous pratiquerons au décours des traitements un bilan des anticorps auto-réactifs (facteur rhumatoïde, anticorps anti-nucléaires, anti-muscle lisse, anti-mitochondries) afin d'évaluer un potentiel risque de rupture de tolérance. Ce bilan sera réalisé au laboratoire d'Immunologie du CHU de Caen

- **Saturation des lymphocytes T circulants en transgène**

Pour déterminer la saturation des lymphocytes T circulants (CD3-APC, BD 557597) par le sc28AT, les molécules fixées sont révélées par un anticorps de lapin anti-alpha-1-antitrypsine biotinilé (Abcam) suivi d'une streptavidine-PE. La saturation est déterminée en utilisant le sc28AT à dose saturante (40 µg/ml) et en comparant le pourcentage de cellules fixées avec le pourcentage de cellules fixées sans saturation.

De la même manière, le pourcentage de saturation du CD40-Ig des lymphocytes T circulants (CD3-APC, BD) est déterminé en utilisant un anti-IgG humain biotinilé (Jackson Immunoresearch) suivi d'une streptavidine-PE. La saturation est déterminée en utilisant le CD40-Ig à dose saturante (50 µg/ml) et en comparant le pourcentage de cellules fixées avec le pourcentage de cellules fixées sans saturation.

Résultats

1. Introduction

Parallèlement au développement d'immunosuppresseurs pharmacologiques, de nombreux bioréactifs mis au point pour cibler spécifiquement les interactions moléculaires impliquées dans l'activation cellulaire menant au rejet ont été évalués. Certains comme les AcMo anti-RIL2 ont intégré l'arsenal thérapeutique classique des transplantateurs (Vincenti, Kirkman et al. 1998) (Nashan, Moore et al. 1997) ou en sont proches comme la molécule de fusion CTLA4Ig (Flavio Vincenti et coll. 2005). Leur capacité à inhiber l'activation des lymphocytes ou à les rendre tolérants fait partie des critères de sélection pour de nouveaux développements.

L'activation des lymphocytes T par un antigène, y compris ceux issus d'une allogreffe, nécessite plusieurs étapes (cf introduction). Le signal 1 provient de la stimulation du TCR par les peptides, ici dérivés du donneur, présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Le signal 2 est fourni par les molécules dites de costimulation. Au départ associé à l'interaction CD28/B7 cet effet costimulateur a été élargi à un plus grand nombre de molécules dont les rôles sont complémentaires. Enfin un signal 3 essentiellement apporté par diverses cytokines permet la prolifération et la différenciation terminale des effecteurs cellulaires.

L'étape de la costimulation s'est avérée particulièrement critique à partir du moment où il a été montré que la stimulation du TCR sans signal 2 induisait, *in vitro*, une anergie des lymphocytes 2, c'est-à-dire un état de non-réponse spécifique de l'antigène utilisé lors la stimulation. Ceci a été obtenu en inhibant l'interaction CD28/B7 par une molécule de fusion obtenue à partir du récepteur alternatif pour le B7, le CTLA4 combiné au fragment Fc d'une immunoglobuline (CTLA4Ig). Si cette molécule s'est avérée capable de produire une immunosuppression puissante (Linsley, Wallace et al. 1992) (Lenschow, Zeng et al. 1992), son action tolérogène *in vivo* est beaucoup difficile à obtenir et semble restreinte à certains modèles animaux ou nécessite des associations (Williams, Trambley et al. 2000) (Larsen, Elwood et al. 1996).

Un second type de signal costimulateur, a été identifié en amont de CD28/B7: l'interaction CD40L/CD40. Cette étape permet l'activation complète de la CPA avec en particulier augmentation de son expression de B7. L'utilisation d'AcMo anti CD40L (CD154) qui inhibent cette interaction prolonge la survie d'allogreffe dans de nombreux modèles aussi bien chez le primate qu'en monothérapie chez le rongeur (Kenyon, Chatzipetrou et al. 1999) (Larsen, Elwood et al. 1996) (Hancock, Sayegh et al. 1996). Par contre la survie à long-terme de greffes de peau chez le rongeur ne peut être obtenue que par des associations avec des cellules du donneur (Markees, Phillips et al. 1998), et chez le primate avec des cellules du donneur et de la rapamycine (Preston, Xu et al. 2005).

Au laboratoire nous avons développé un modèle de transfert de gène par un adénovirus permettant la production d'une molécule de fusion CD40-Ig qui prévient le rejet de greffe de cœur chez plus de 90% des rats greffés (Guillot, Guillonnet et al. 2002) (Guillonnet, Hill et al. 2007). De plus les animaux qui acceptent leur greffe à long terme développent des cellules qui permettent le transfert (itératif) de cette survie à un animal naïf recevant une greffe provenant du même type de donneur sans autre traitement associé. Les cellules nécessaires à ce transfert sont des lymphocytes CD8⁺CD45RC^{low}.

Afin d'évaluer l'efficacité de cette molécule chez le primate nous avons décidé d'utiliser cette stratégie de transfert de gène, mais en utilisant des AAV injectés dans le muscle squelettique, qui permettent une expression élevée d'un transgène comme l'érythropoïétine (Chenuaud et coll. 2004). Cette stratégie, utilisée en collaboration P. Moullier (Inserm U649) montre que l'expression d'un transgène immunomodulateur comme le CTLA4Ig est obtenue de façon stable à partir de 8 semaines et persiste à des taux élevés (taux circulants pouvant atteindre 100µg/ml) durant plusieurs mois (I. Anegon, P. Moullier, résultats non publiés).

Le blocage transitoire et isolé de CD40/C40L comme traitement d'induction étant probablement insuffisant chez le primate pour induire une tolérance aux allogreffes, nous voulons y associer une inhibition de la voie CD28/B7. Les signaux de costimulation recouvrent maintenant toute une famille de signaux dits costimulateurs positifs et négatifs. Parmi ceux-ci le premier identifié est issu du CTLA4 que nous avons déjà évoqué. Comme le CD28, il interagit avec les différents ligands B7, mais présente une affinité plus de 10 fois supérieure à celle du CD28. C'est pour cette capacité de compétition pour le ligand que la molécule de fusion CTLA4Ig a été développée afin d'inhiber la fixation du CD28 à ses ligands B7 23. Par ailleurs il a été montré que CTLA4 exprimé à la surface du T est capable après fixation à B7 de délivrer un signal négatif à la cellule T en inhibant le signal du TCR/CD3 25 et l'on peut envisager que la fixation préférentielle de CTLA4Ig à B7 préviendra la transduction des signaux anti-apoptotiques du CD28. Le CTLA4Ig est aussi capable de transmettre un signal à la CPA via le B7 qui provoque l'activation de l'enzyme indoléamine 2, 3 déoxygénase (IDO) inhibitrice de la prolifération et pro-apoptotique pour les Th1 (Grohmann et coll. 2002). Par conséquent l'interaction différentielle de B7 avec CD28 et CTLA4 aura des effets activateurs des T mais aussi des effets inhibiteurs. Ainsi dans un modèle chez le rat, le blocage de CD28, ménageant l'interaction CTLA4/B7 peut inhiber une réponse allogénique sans altérer les réponses immunes activées par présentation indirecte (Haspot et coll. 2002). C'est pourquoi une molécule de fusion capable d'inhiber spécifiquement la liaison CD28/B7 tout en ménageant les possibilités d'interaction de B7 avec CTLA4 a été développée au laboratoire. Cette molécule, sc28-AT, combine un fragment scFv, c'est-à-dire le paratope (VH+VL) d'un anticorps anti-CD28 avec une molécule d'alpha-1-antitrypsine (Vanhove et coll. 2003) et reste ainsi monovalente pour éviter d'éventuels effets agonistes. Cette molécule conserve les capacités d'inhibition de l'interaction CD28/B7 de l'anticorps originel. Cette molécule sera aussi vectorisée avec des AAV afin de circonvenir les problèmes de production en quantité suffisante. Ce modèle ne relève pas d'une approche pré-clinique de thérapie génique mais nous permet de valider l'intérêt de ces molécules recombinantes tout en évitant les étapes de production de quantités importantes pour des modèles chez le grand animal.

L'objectif principal est d'évaluer l'effet tolérogène de ces molécules et de leur combinaison chez le primate

2. Préparation des plasmides AAV/hCD40-Ig et AAV/sc28AT et tests fonctionnels *in vitro*

Nous avons jusqu'à présent effectué le transfert de gène dans un modèle rat avec un adénovirus. Pour le primate, le clonage d'un plasmide vecteur AAV/hCD40-Ig a été réalisé.



Figure 80. Structure du plasmide AAV-CD40-Ig

RSV : promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous, promoteur précoce du virus SV40. CD40-Ig : La partie extra-membranaire du CD40 humain fusionnée au fragment Fc de l'IgG1 humaine. WPRE : Woodchuck post-transcriptional regulatory élément, améliore l'expression du transgène. PASV40 : Signal de polyadénylation du simian virus 40. ITR : Inverted terminal repeat de l'AAV de sérotype 2.

Un clone stable produisant la molécule CD40-Ig humaine (hCD40-Ig) a été obtenu en co-transfectant le plasmide AAV/hCD40-Ig et le gène de résistance à la néomycine. La molécule hCD40-Ig produite a été purifiée par chromatographie d'affinité afin de tester ses propriétés *in vitro*. La capacité de fixation de hCD40-Ig à des cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) de l'Homme et du macaque a été testée sur des cellules activées *in vitro*. Les résultats montrent que hCD40-Ig se fixe efficacement sur les CMSP activées de l'Homme et du macaque. Les quantités nécessaires pour obtenir 50% du signal maximum, tant en terme de nombre de cellules marquées que d'intensité de fluorescence sont comparables dans les deux espèces.

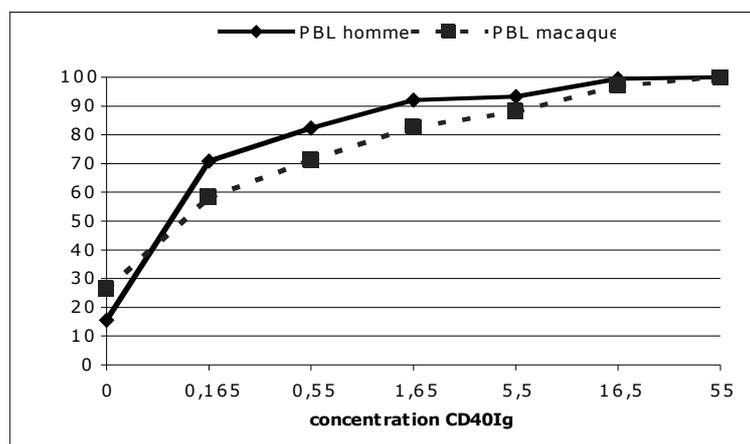


Figure 81. Marquage des lymphocytes du sang circulant activés de l'Homme et du macaque en fonction de la concentration en CD40-Ig

La fonctionnalité de hCD40-Ig a été testée sur des lymphocytes B dont la prolifération est CD40-ligand (CD40L) dépendante (Clark and Ledbetter 1986). Les résultats montrent que l'addition de hCD40-Ig inhibe la prolifération des lymphocytes B et que cette inhibition est comparable sur les cellules d'Homme et de macaque.

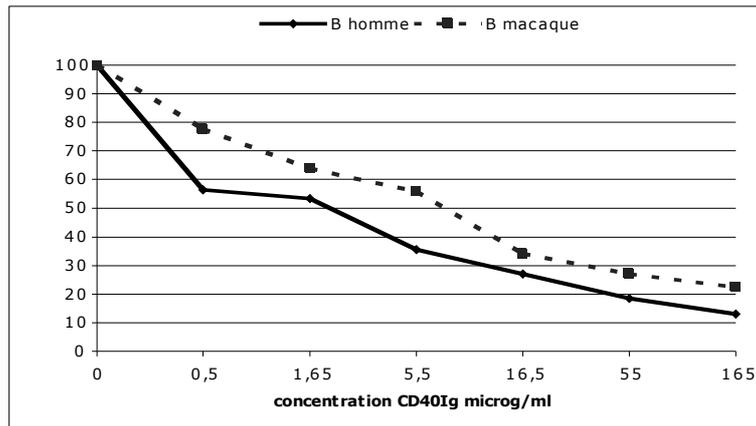


Figure 82. Prolifération des lymphocytes B extraits de l'homme et du macaque sur un tapis de cellules CD40L en fonction de la concentration en CD40-Ig

La molécule hCD40-Ig obtenue à partir du plasmide AAV/hCD40-Ig est donc capable de se fixer sur les CMSP et est fonctionnelle chez l'Homme et le macaque. Les vecteurs AAV de sérotype 1 et 8 ont été produits.

De la même manière que pour le hCD40-Ig, le sc28-AT a été cloné dans un plasmide vecteur pour former le plasmide AAV/sc28-AT.

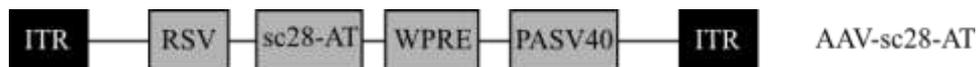


Figure 83. Structure du plasmide AAV-sc28AT

Après transfection transitoire de cellules humaines par le plasmide AAV/sc28-AT, nous avons dosé l'activité du sc28AT produit par ce plasmide par rapport au sc28-AT de référence. La capacité de fixation au CD28 humain a été testée en ELISA. Les résultats montrent que le sc28-AT produit par notre plasmide est capable de se lier au CD28 humain avec la même affinité que la molécule sc28-AT de référence (Figure 84). Par ailleurs, Vanhove et al. ont démontré que la molécule de référence est capable d'inhiber la prolifération de lymphocytes provenant de l'Homme et du macaque en culture lymphocytaire mixte (données non publiées). La molécule sc28-AT obtenue à partir du plasmide AAV/sc28AT est donc fonctionnelle chez l'Homme et le macaque et le virus a été produit au Laboratoire d'Amplification des Vecteurs (Nantes). Préalablement à l'injection des animaux, la préparation virale d'AAV/sc28AT a été testée *in vitro* sur des cellules en culture, l'activité de la molécule sc28-AT présente dans le surnageant 6 jours après l'infection a été testée par ELISA (Figure 85).

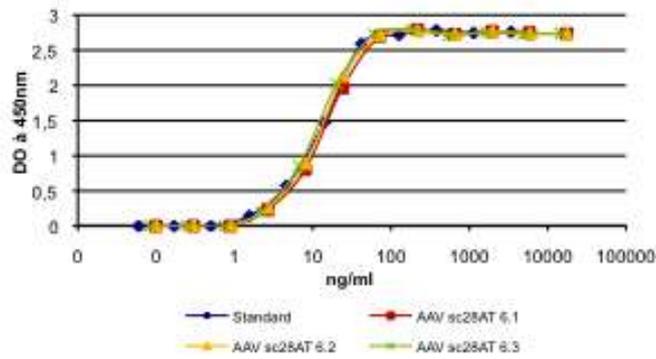


Figure 84. Activité de la molécule issue du plasmide AAV sc28AT après transfection de cellules in vitro.

Activité comparée à la molécule sc28AT de référence (standard). Les dilutions sont réalisées à concentration de protéines équivalentes. ED50 : concentration (en ng/ml) nécessaire pour obtenir 50% de l'activité de sc28AT. La transfection a été réalisée en triplicat (6.1, 6.2, 6.3) et le surnageant d'un puits sans virus est utilisé comme contrôle négatif.

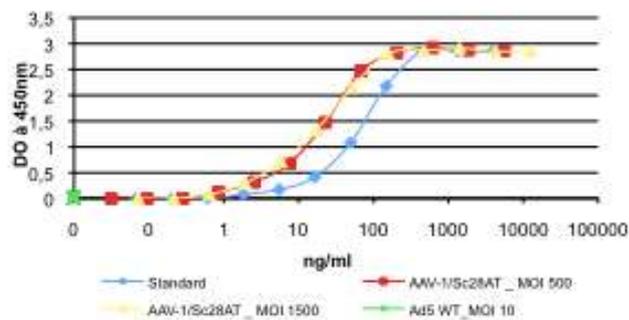


Figure 85. Activité de la molécule issue de l'infection de cellules en culture par l'AAV sc28AT

Activité comparée à la molécule sc28AT de référence (standard). Les dilutions sont réalisées à concentration de sc28AT équivalentes. Les cellules ont été infectées pendant 5 jours avec des MOI de 500 et 1500. Les concentrations de sc28AT obtenues dans le surnageant sont respectivement de 5,5 et 12,6 ug/ml. Un adénovirus sauvage a été utilisé comme contrôle négatif.

3. Injection, taux circulant, effets secondaires et immunisation

3.1. CD40-Ig

Les animaux sont sélectionnés sur la base d'une séronégativité pour l'AAV 1 ou 8, ce qui représente 10-15% des animaux testés. Quatre animaux ont été injectés avec l'AAV-CD40-Ig de sérotype 1 ou 8 et une dose de 3.5×10^{12} vg/kg. Quel que soit le sérotype utilisé, les animaux ont exprimé le transgène à des taux supérieurs à 100 ug/ml, et jusqu'à plus de 5 mois après l'injection. Le transgène est bien toléré, sans effet secondaire notable, nous n'avons détecté aucun trouble de la coagulation.

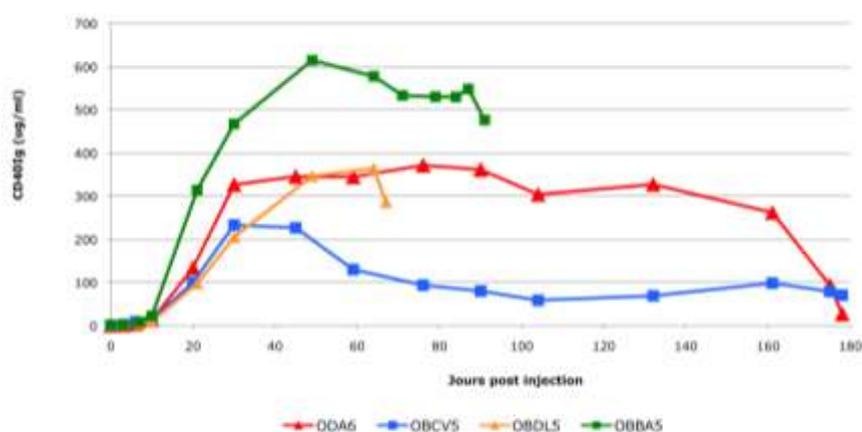


Figure 86. Concentration en hCD40-Ig circulant en fonction du temps chez les animaux injectés avec l'AAV-CD40-Ig détecté par ELISA

Un des animaux (OBCV5) a vu son taux de hCD40-Ig diminuer de manière notable, ce qui pourrait être dû à l'apparition d'anticorps dirigés contre le transgène, qui est une molécule d'origine humaine. Un test ELISA permettant de détecter la présence d'anticorps anti-hCD40-Ig n'a détecté aucune immunisation chez les animaux testés.

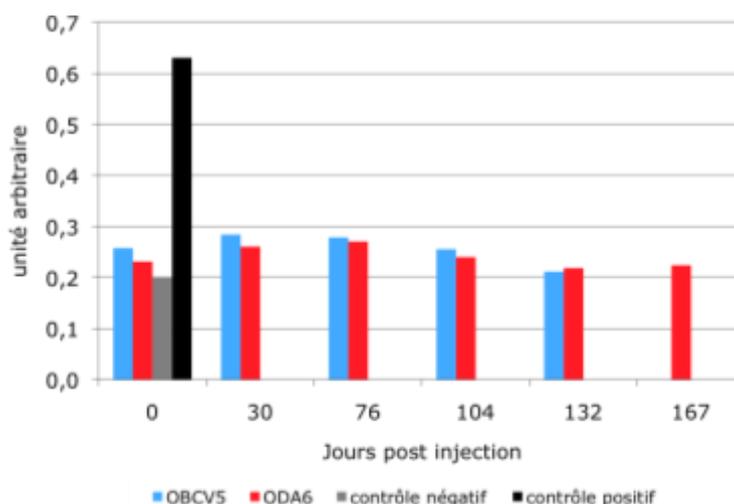


Figure 87. Quantité d'anticorps (unité arbitraire) dirigée contre hCD40-Ig en fonction du temps mesurée par ELISA.

Contrôle positif : Macaque immunisé contre le LEA29Y. Contrôle négatif : Tampon.

3.2. sc28AT

Un animal a été injecté avec l'AAV/sc28AT. La molécule s'est exprimée rapidement, à des taux supérieurs à 20 ug/ml pendant plus de 40 jours (Figure 88). Le plateau d'expression de sc28AT est atteint environ 7 jours après l'injection, contre environ 40-50 jours pour le CD40-Ig. La base des vecteurs AAV/CD40-Ig et AAV/sc28AT étant la même, la nature du transgène semble influencer l'efficacité de sa production par les cellules transduites. L'activité de la molécule n'est pas altérée *in vivo* (Figure 89, gauche). L'expression du transgène n'est plus détectable 50 jours après l'injection, ce qui correspond à l'apparition d'anticorps dirigés contre le sc28AT (nommés masca: Macaque Anti-Sc28AT Antibodies). Les masca d'isotype IgG augmentent fortement avec le temps, tandis que la présence des anticorps d'isotype IgM reste faible et tend à diminuer rapidement. En effectuant un test d'activité de sc28AT en diluant la molécule dans du sérum contenant les anticorps dirigés contre sc28AT, l'activité de la molécule n'est pas altérée, ce qui indique que ces anticorps ne sont pas neutralisants (Figure 89, droite).

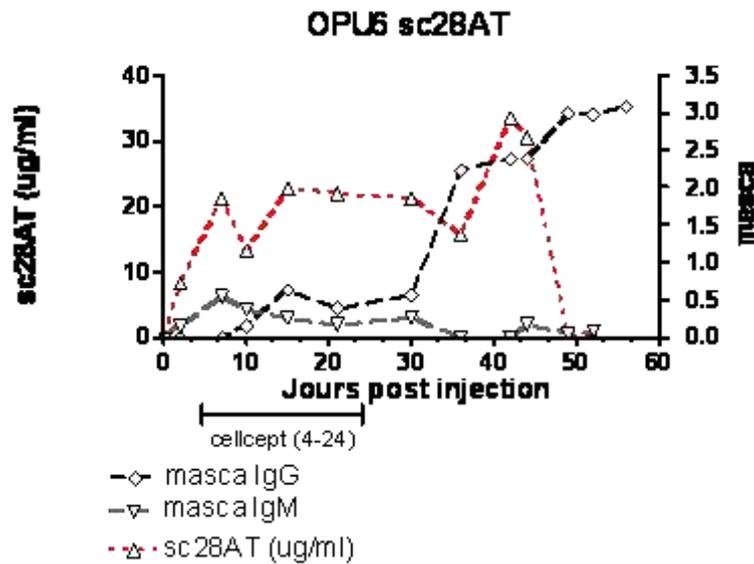


Figure 88. Concentration en sc28AT chez l'animal injecté avec l'AAV/sc28AT et quantification des masca dans la circulation

masca : macaque anti-sc28AT antibodies.

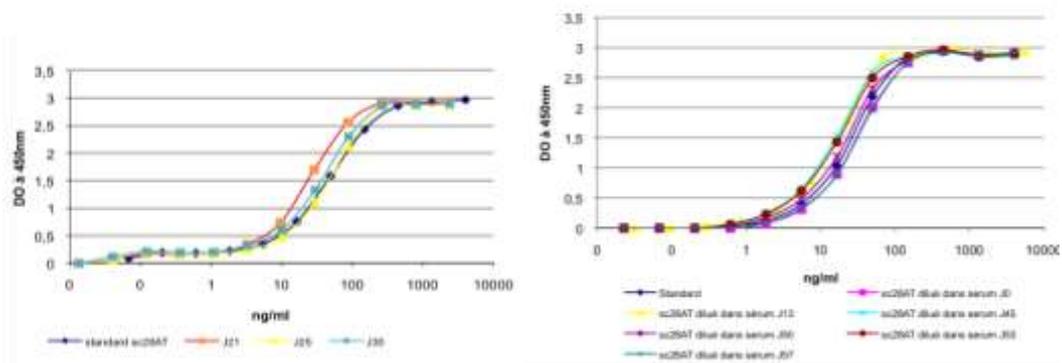


Figure 89. Activité représentative de la molécule sc28AT in vivo, après injection de l'AAV et activité de la molécule sc28AT en présence d'anti-sc28AT.

(gauche) Activité comparée à la molécule sc28AT de référence (standard). Les dilutions sont réalisées à concentration de protéines équivalentes.

(droite) Activité comparée à la molécule sc28AT de référence diluée dans le tampon (standard) et dans du sérum provenant de l'animal avant (J0, J13) et après (J45, J50, J53, J57) présence des anticorps anti-sc28AT.

L'expression de sc28AT s'accompagne d'une saturation des sites CD28 exprimés par les lymphocytes circulants. Avec l'apparition des masca et la disparition du sc28AT circulant, les sites CD28 exprimés par les lymphocytes T circulants sont libres (Figure 90).

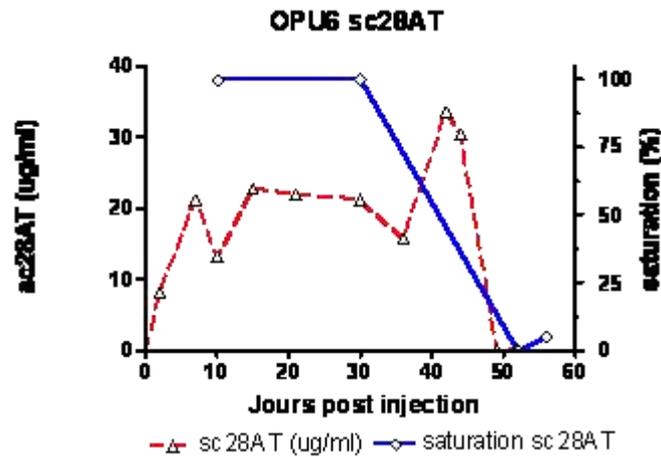


Figure 90. Pourcentage de saturation des sites CD28 des lymphocytes T circulants en fonction de la concentration en sc28AT circulants chez l'animal injecté avec l'AAVsc28AT

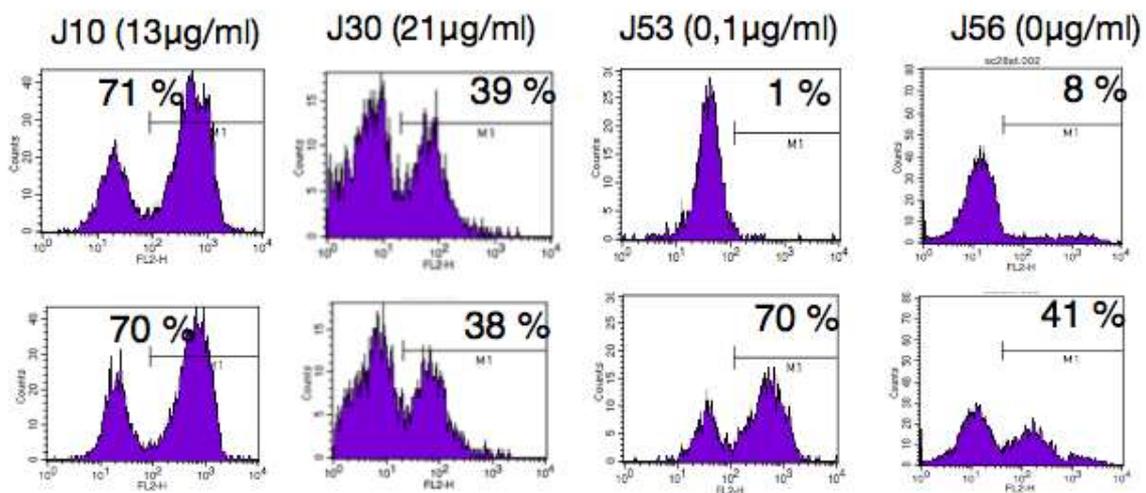


Figure 91. Fixation de sc28AT sur les sites CD28 des lymphocytes T (CD3⁺) circulants analysés par cytométrie en flux

En haut, le pourcentage de lymphocytes T recouverts par le sc28AT à J10, J30, J53 et J56 post injection (après incubation avec un anti-AT-Biot/ST-PE). En bas, pourcentage de lymphocytes T au même jour recouverts par le sc28AT en présence d'une concentration saturante de sc28AT

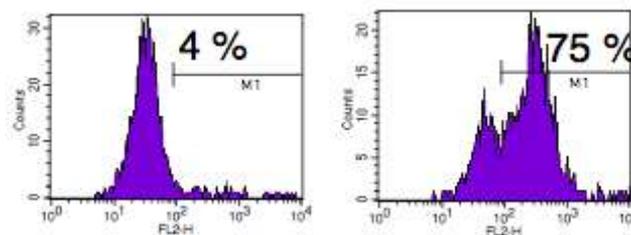


Figure 92. Fixation de sc28AT sur les sites CD28 des lymphocytes T (CD3⁺) circulants analysés par cytométrie en flux chez un animal non injecté par l'AAVsc28AT

A gauche, en absence de sc28At et à droite, en présence d'une concentration saturante de sc28AT.

3.3. Combinaison sc28AT & CD40-Ig

Un animal a été injecté simultanément avec l'AAV/CD40-Ig et l'AAV/sc28AT. Cette double injection a été bien supportée par l'animal, sans effet secondaire notable. Le transgène CD40-Ig s'est exprimé plus lentement et à des taux plus faibles qu'en monothérapie (50 mg/ml contre plus de 100 mg/ml) (Figure 93). De même, la molécule sc28AT s'est exprimée plus faiblement (moins de 3 ug/ml contre 20 ug/ml en monothérapie) et la molécule a disparu plus tôt (J26 contre J48 en monothérapie) (Figure 94). La séronégativité de l'animal a été re-contrôlée et confirmée.

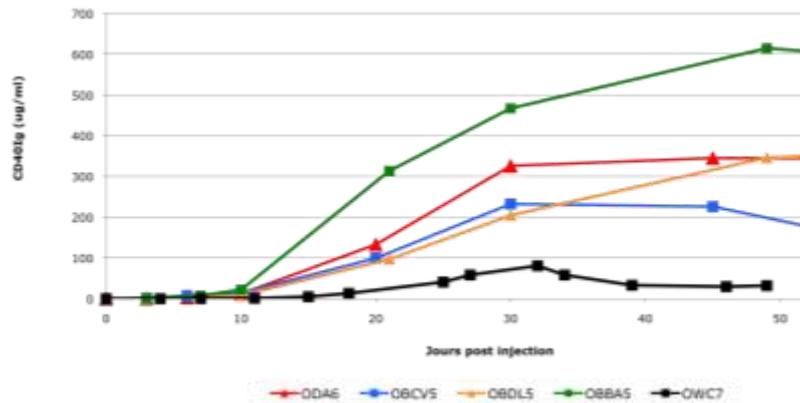


Figure 93. Concentration en hCD40-Ig circulant en fonction du temps chez les animaux injectés avec l'AAV-CD40-Ig et chez l'animal injecté en combinaison CD40-Ig/sc28AT (OWC7)

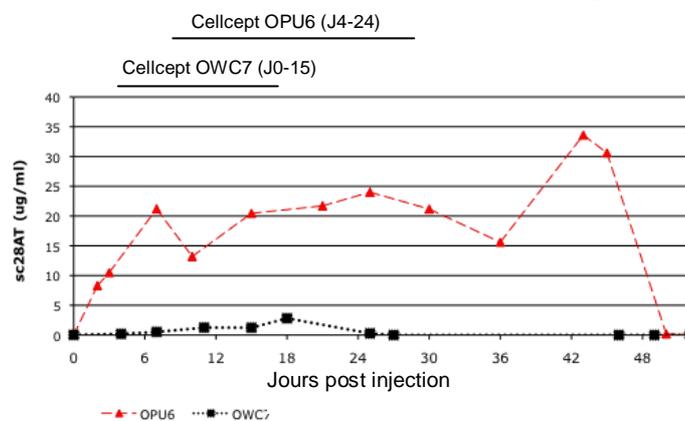


Figure 94. Concentration en sc28AT circulant en fonction du temps chez l'animal injecté avec l'AAV-sc28AT (OPU6) et chez l'animal injecté en combinaison CD40-Ig/sc28AT (OWC7)

La disparition du sc28AT correspond à l'apparition des masca IgG. Cette apparition est concomitante à l'arrêt du cellcept, utilisé pour empêcher les réponses immunes contre le virus après l'injection, et surtout contre le transgène tant qu'il n'est pas suffisamment exprimé. Lorsque le taux circulant de sc28AT est de l'ordre de 1,2 mg (J11), la saturation des sites CD28 des lymphocytes circulants n'est pas totale comme pour l'animal en monothérapie mais reste importante (environ 75%, Figure 97). Avec l'apparition des masca et la disparition du sc28AT circulant, les sites CD28 des lymphocytes circulants ne sont plus occupés par le sc28AT et sont donc libres. D'autre part, la l'expression de CD28 sur les lymphocytes T circulants semble diminuer avec le temps et peut être

expliqué par la modulation de l'expression du CD28 par les lymphocytes ciblés par le sc28AT. On note également que la molécule CD40-Ig s'exprime plus tard chez cet animal après la disparition du sc28AT circulant, et ces 2 molécules n'ont donc pas pu agir de concert comme prévu.

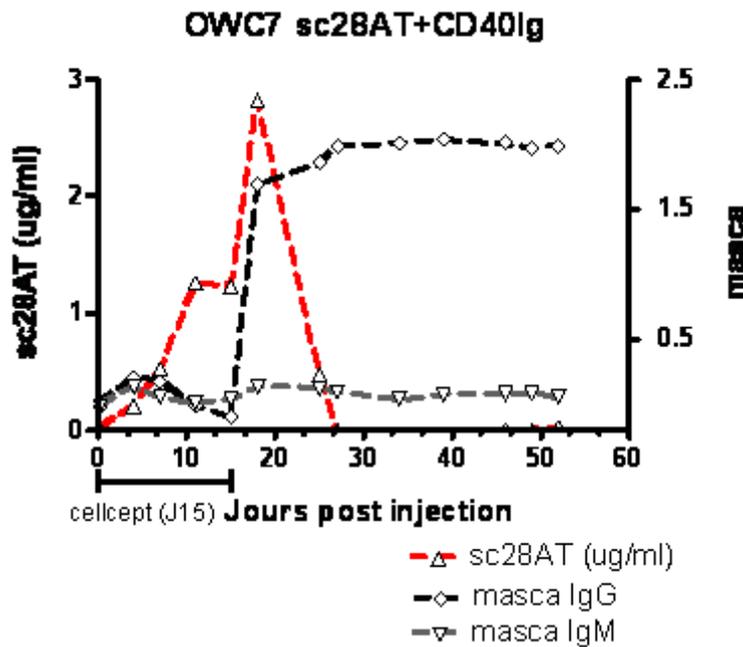


Figure 95. Concentration en sc28AT circulant en fonction du temps chez l'animal injecté avec l'AAVsc28AT et présence des anticorps dirigés contre le sc28AT d'istotype IgG et IgM (masca)

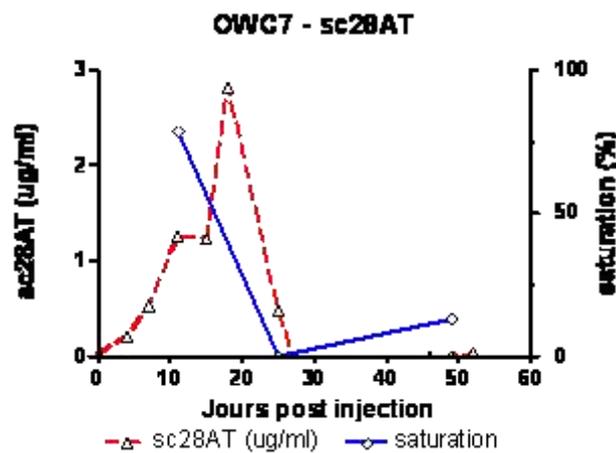


Figure 96. Pourcentage de saturation des sites CD28 des lymphocytes T circulants en fonction de la concentration en sc28AT circulant chez l'animal injecté avec les AAVsc28AT et AAVCD40-Ig

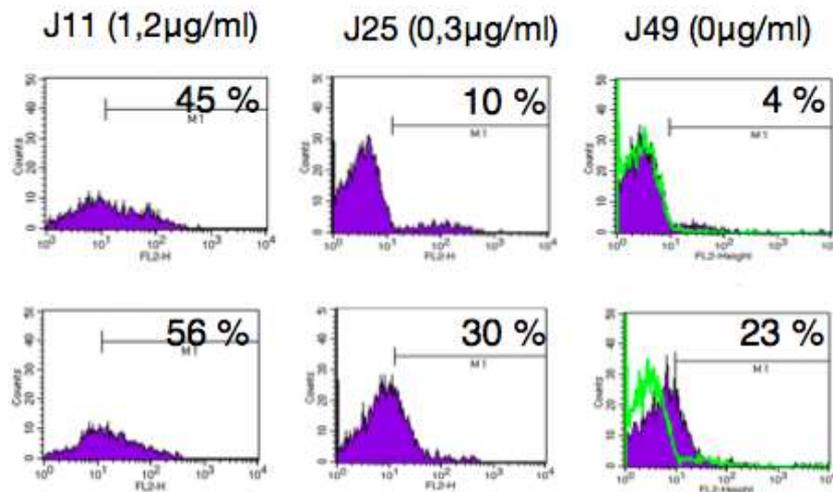


Figure 97. Fixation de sc28AT sur les sites CD28 des lymphocytes T (CD3+) circulants analysée par cytométrie en flux chez l'animal injecté en combinaison avec les AAVsc28AT et AAVCD40-Ig

En haut, le pourcentage de lymphocytes T fixés par le sc28AT à J11, J25 et J49 post injection. En bas, pourcentage de lymphocytes T aux mêmes jours fixés par le sc28AT en présence d'une concentration saturante de la molécule sc28AT.

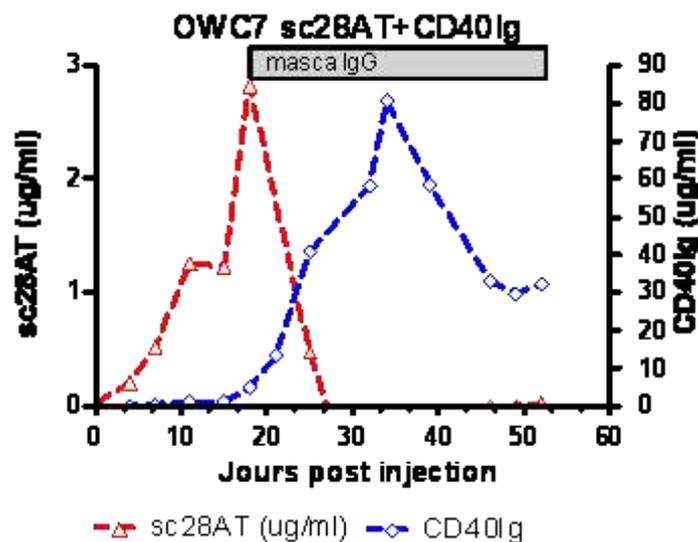


Figure 98. Concentration en sc28AT et en CD40-Ig circulants chez l'animal injecté en combinaison avec les AAVsc28AT et AAVCD40-Ig et présence des masca IgG

3.4. Déclassement pour greffe

Les animaux injectés ont montré une présence persistante des particules virales circulantes détectées par PCR standard plus de 4 mois après l'injection. La concentration de ces particules virales circulantes a été quantifiée par qPCR. Après un pic dans les premiers jours suivant l'injection, la concentration en particules virales diminue pour devenir stable et persiste en très faible quantité. Un test de « replication center assay » a montré la non-infectiosité des particules virales résiduelles. De plus, les particules virales n'ont pas été détectées dans les urines des singes. Avec l'accord du comité de génie génétique, les animaux ont pu être déclassés pour la greffe.

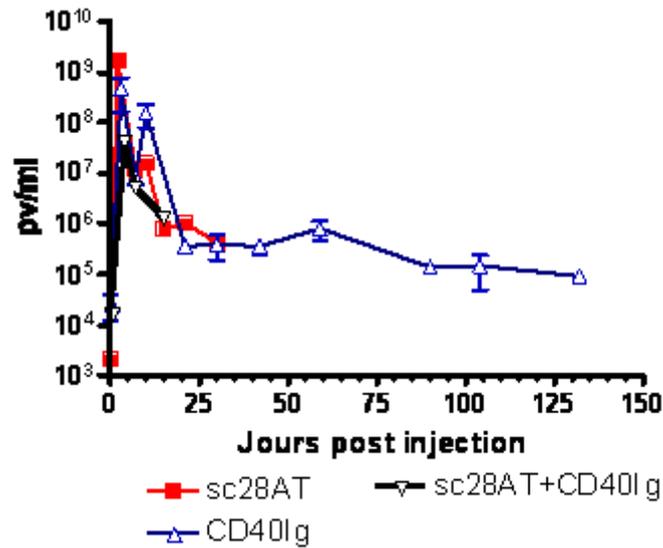


Figure 99. Courbes des moyennes de concentration en particules virales/ml déterminée par PCR quantitative en fonction du temps pour les animaux injectés avec l'AAVCD40-Ig et l'AAVsc28AT

4. Greffes

Les greffes sont réalisées en compatibilité ABO avec incompatibilité pour le CMH II DR. En raison de la faible hétérogénéité génétique des animaux de l'île Maurice, environ 10 fois plus d'animaux que nécessaires doivent être testés y compris la sélection de receveurs sérologiquement négatifs pour les AAV1 et/ou AAV8.

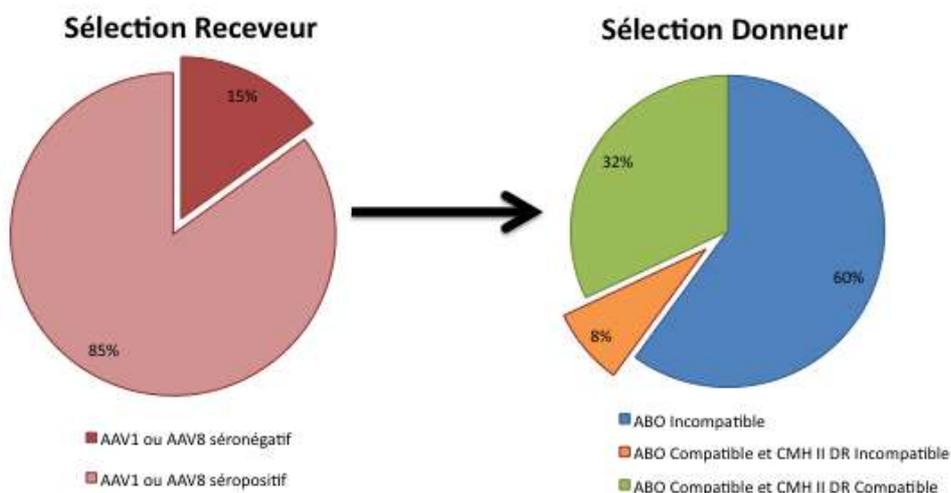


Figure 100. Mode de sélection des animaux receveur/donneur d'organes et proportion des animaux sélectionnables

4.1. Greffe CD40-Ig

Après déclassement, les quatre animaux injectés avec l'AAV/CD40-Ig ont reçu une greffe de rein. Aucun effet pro-thrombotique n'a été détecté au décours de l'intervention chirurgicale. La fonction du greffon est suivie par le taux de créatinémie (Figure 101). Deux animaux sont morts trois jours après la greffe suite à des complications techniques, nous amenant à modifier notre mode opératoire. Préalablement, les animaux étaient greffés après une néphrectomie bilatérale, et en l'absence de cathéter à demeure, les animaux devaient subir en post-opératoire des anesthésies générales répétées pour être hydratés par perfusion. Sans nécessité de reprise chirurgicale patente, ces animaux fragilisés sont morts sans signes de rejets. Suite à ces problèmes, les animaux gardent désormais un rein propre avec le greffon rénal. Le rein propre est enlevé 4-5 jours après la greffe, permettant le démarrage de la fonction du greffon. De plus, afin d'éviter les anesthésies générales répétées, des gilets munis d'un cathéter ont été adaptés à ces animaux de petite taille.

Les deux autres animaux injectés ont rejeté leur greffe à sept jours, alors que les animaux contrôles non injectés et sans traitement rejettent en 6 jours. Au moment de la greffe, le taux de CD40-Ig était en moyenne supérieur à 50 mg/ml et n'a pas diminué. La courbe de créatinémie des deux animaux injectés est similaire à celle des animaux contrôles. La présence du CD40-Ig circulant ne semble pas avoir d'effet sur le rejet de greffe.

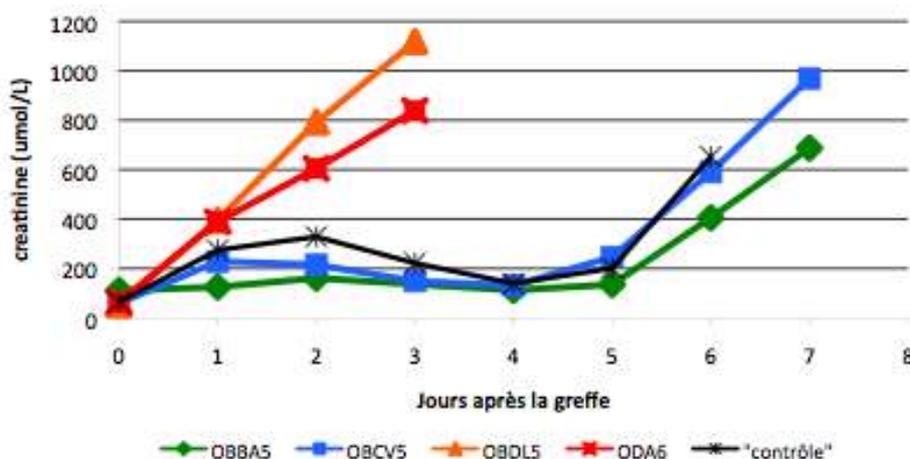


Figure 101. Suivi de la créatinémie en fonction du temps après la greffe des animaux injectés avec l'AAV CD40-Ig et des animaux contrôles

La courbe « contrôle » correspond à la moyenne de créatinémie des deux animaux non traités greffés

- fixation du hCD40-Ig avant et après greffe

La fixation du CD40-Ig sur les lymphocytes circulants des animaux injectés par l'AAV/CD40-Ig a été testée par cytométrie en flux. Le CD40-ligand (CD40L) n'est pas exprimé par les lymphocytes T circulants au repos. Ainsi, même à dose saturante, le CD40-Ig n'est pas capable de se fixer aux lymphocytes T circulants. Après la greffe, l'analyse de la fixation de CD40-Ig montre une fixation sur 20-

25 % des cellules. Après addition d'un excès de CD40-Ig *in vitro*, le pourcentage de cellules fixées ne varie pas ou peu, confirmant que les doses circulantes de CD40-Ig sont saturantes. Par contre, l'expression du CD40L est transitoire et à J15 on n'observe plus de CD40-Ig aux lymphocytes T circulants.

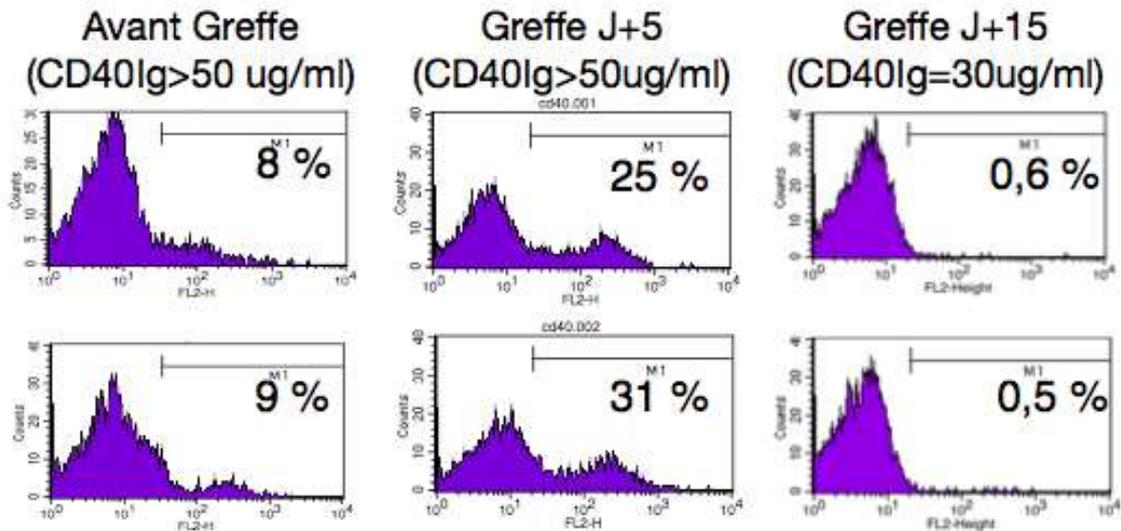


Figure 102. Fixation de CD40-Ig sur les lymphocytes T périphériques d'un animal injecté avec l'AAV/CD40-Ig

En haut, le pourcentage de lymphocytes T fixés par le CD40-Ig avant la greffe, 5 jours et 15 jours après. En bas, pourcentage de lymphocytes T aux mêmes jours fixés par le CD40-Ig en présence d'une concentration saturante de la molécule CD40-Ig.

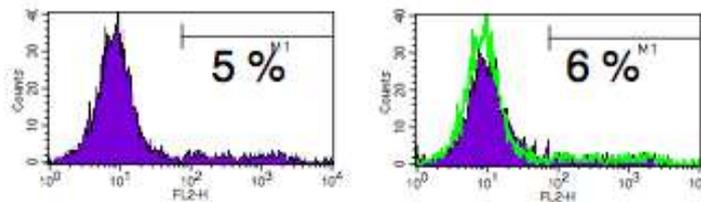


Figure 103. Fixation de CD40-Ig sur les lymphocytes T périphériques d'un animal contrôle, non greffé et non injecté avec l'AAVCD40-Ig

À gauche, le pourcentage de lymphocytes T fixés sans CD40-Ig. A droite, le pourcentage de lymphocytes T fixés par le CD40-Ig en présence d'une concentration saturante de la molécule CD40-Ig.

4.2. Greffe sc28AT

L'animal injecté avec l'AAV sc28AT en monothérapie a été greffé 38 jours après l'injection. Le jour de la greffe, le taux circulant de sc28AT est proche 20 ug/ml et a atteint 30 μ g au jour 6 post greffe (Figure 104). Le greffon a fonctionné jusqu'à J15-J18. Cependant il faut noter qu'à partir de J12 post greffe le sc28 AT n'était plus détectable dans la circulation et que concomitamment, les sites membranaires de CD28 n'étaient plus saturés du fait de l'apparition des masca (Figure 98).

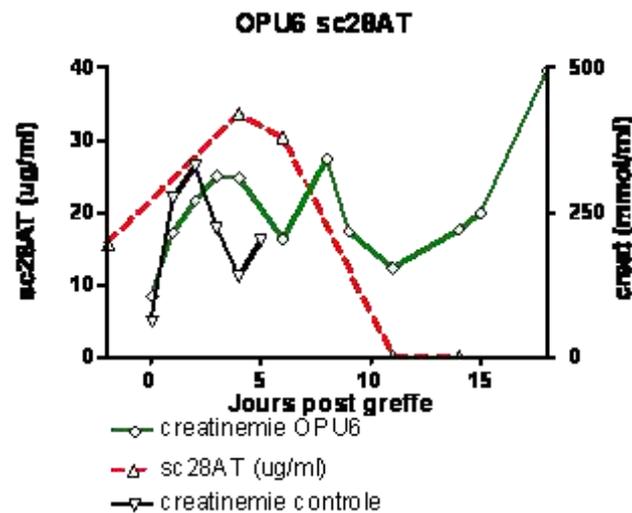


Figure 104. Taux circulants de sc28AT et créatinémie de l'animal injecté en avec l'AAV sc28AT

4.3. Greffe en combinaison CD40-Ig & sc28AT

L'animal ayant été injecté simultanément avec l'AAV sc28AT et l'AAV CD40-Ig a été greffé 34 jours après l'injection. Au moment de la greffe, le taux circulant de sc28AT est nul et n'était plus détectable depuis 9 jours. Par contre le taux circulant de CD40-Ig est supérieur à 50 mg/ml. La survie du greffon a été de 18 jours et au moment du rejet, le taux de CD40-Ig circulant s'est stabilisé à 30 ug/ml et le taux circulant de sc28AT a été confirmé comme indétectable y compris avec absence de fixation cellulaire. Ce résultat est à opposer à l'absence d'efficacité observée avec le CD40-Ig utilisé seul. On peut donc se demander si la présence transitoire pré-greffe a un effet, dépendant ou non de la présence de CD40-Ig.

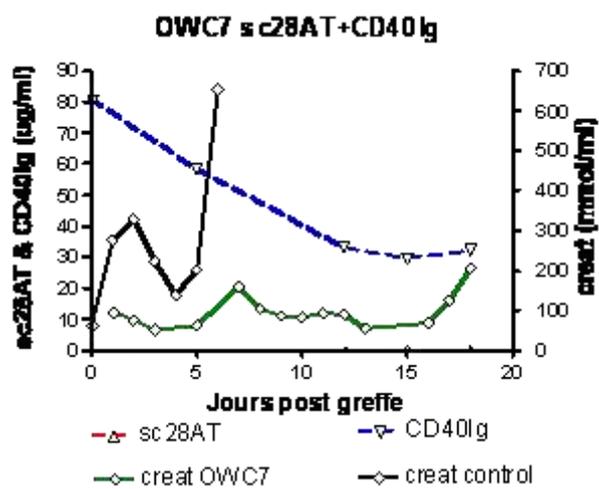


Figure 105. Taux circulants de CD40-Ig et sc28AT et créatinémie de l'animal injecté en combinaison avec l'AAV CD40-Ig et l'AAV sc28AT

Discussion

Au laboratoire, nous avons développé un adénovirus codant pour CD40-Ig, un inhibiteur de la voie de costimulation CD40/CD40L, capable de prévenir le rejet de greffe de cœur de plus de 90% des rats greffés. Afin d'évaluer cette stratégie chez le primate, nous avons construit un adénovirus codant pour la molécule CD40-Ig humaine, capable de se fixer aux sites CD40L des lymphocytes T activés de macaques *in vitro et in vivo*. De plus cette molécule inhibe la prolifération CD40L dépendante des lymphocytes B *in vitro*. Suite à ces résultats, l'AAV-CD40-Ig a été injecté chez le primate non humain et les taux circulants obtenus sont supérieurs à 100 µg/ml et stables pendant plusieurs mois, sans effets secondaires notables.

Cette étude est la première à évaluer l'effet du CD40-Ig chez le primate pour l'induction de la tolérance en transplantation. L'utilisation d'un anticorps anti-CD40L représente une stratégie proche de la nôtre et l'utilisation de ces anticorps anti-CD40L en monothérapie dans des modèles d'allogreffes chez le primate non humain a montré une prolongation significative de la survie du greffon rénal, cardiaque et en greffe d'îlots de pancréas mais, contrairement aux modèles rongeurs, aucune étude n'a décrit l'induction d'une tolérance (Tableau 10). Une autre stratégie possible pour bloquer l'interaction CD40/CD40L serait d'utiliser un anticorps anti-CD40 ; cette stratégie a été évaluée chez le primate non humain en monothérapie (ex : Ch5D12, un antagoniste, et Chi220, un agoniste partiel) dans un modèle de greffe de rein (Haanstra, Ringers et al. 2003) (Pearson, Trambley et al. 2002) (Imai, Suzuki et al. 2007) sans induire de tolérance (rein : 3-7 mois).

- **CD40-Ig/anti-CD40L chez le rat**

Comme décrit par notre laboratoire et ailleurs, l'injection d'un adénovirus CD40-Ig permet une acceptation longue du greffon cardiaque ou hépatique chez le rongeur, malgré la persistance de l'infiltrat leucocytaire (Masunaga, Yamashita et al. 2005) (Yamashita, Masunaga et al. 2003) (Guillot, Guillonnet et al. 2002) (Nomura, Yamashita et al. 2002). Peu d'études ont décrit les effets de CD40-Ig sur les réactions lymphocytaires mixte. En 1993, P.Lane et al. (Lane, Gerhard et al. 1993) ont montré que CD40-Ig n'était pas capable d'inhiber la prolifération de clones de lymphocytes T, contrairement à CTLA4-Ig utilisé dans les mêmes conditions. Masunaga et al. ont décrit que CD40-Ig n'est pas capable d'inhiber une MLR et possède un rôle pro-activateur en induisant la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺, une cytokine capable d'induire la prolifération T (Smith 1988) et le mécanisme de mort induite par l'activation (Wells, Li et al. 1999). Néanmoins, l'augmentation de la prolifération des lymphocytes T dans les greffons traités avec l'AdCD40-Ig n'a pas été détectée (Masunaga, Yamashita et al. 2005). Paradoxalement, des résultats au laboratoire montre que CD40-Ig est capable d'inhiber une réaction lymphocytaire mixte de manière dose dépendante chez le rat (données non montrées). Plusieurs facteurs varient dans ces modèles expérimentaux (lignées cellulaires et souches de rat, durée de la MLR, concentration en CD40-Ig...) mais expliquent difficilement des résultats aussi contradictoires.

L'élimination des cellules CD40L positives fixées par l'anticorps l'anti-CD40L/CD40-Ig par l'activation du complément ou des mécanismes cellulaires semble également importante dans l'induction de la tolérance chez le rongeur. Ainsi, le traitement anti-CD40L de souris déficientes en C5 (Sanchez-Fueyo, Domenig et al. 2002), en C3 ou en Fc γ R (Monk, Hargreaves et al. 2003) n'a pu induire la tolérance.

Dans le modèle de greffe de coeur de Masunaga *et al* (Masunaga, Yamashita et al. 2005), l'utilisation du CD40-Ig améliore la production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺ et génère des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ avec des propriétés régulatrices *in vitro*. Dans le même modèle, l'utilisation d'un monomère soluble CD40/Myc/His, dénué du fragment Fc, n'est pas capable de prévenir le rejet d'allogreffe ou d'induire la génération de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺. De la même manière, le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L par un anticorps anti-CD40L durant la stimulation allogénique *in vitro* génère des lymphocytes T CD4⁺ dont le transfert est capable d'induire la tolérance aux alloantigènes (Taylor, Noelle et al. 2001) (Graca, Honey et al. 2000). Dans le modèle rongeur utilisé par notre équipe, l'utilisation d'un adénovirus CD40-Ig lors de la greffe induit la génération de lymphocytes T CD8⁺ tolérogènes capables de transmettre la tolérance à un autre animal (Guillonnet, Hill et al. 2007). La fixation de CD40-Ig sur le CD40L semble donc capable d'induire l'activation de molécules de signalisation nécessaires à la génération de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ ou CD8⁺ et à la tolérance au greffon *in vivo*.

Il est également possible que les anticorps anti-CD40L bloquent les interactions de CD40L avec des récepteurs alternatifs tels que les intégrines α IIb β 3, décrits sur les plaquettes (Andre, Prasad et al. 2002), les progéniteurs hématopoïétiques (Ody, Corbel et al. 2001) et les cellules mastocytaires (Emambokus and Frampton 2003), ou α 5 β 1 (Leveille, Bouillon et al. 2007), qui est également décrit sur les mastocytes (Houtman, Koster et al. 2001). L'inhibition de ces interactions a un rôle encore inconnu.

Vu l'efficacité discutée de CD40-Ig et de l'anticorps anti-CD40L *in vitro* en réaction lymphocitaire mixte, l'importance du fragment Fc dans la prévention du rejet et la capacité de ces molécules à induire des lymphocytes T régulateurs, il paraît peu probable que le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L seul induise la tolérance en transplantation.

- **Anti-CD40L chez le primate non humain**

Chez le primate non humain, aucune étude n'a encore testé l'efficacité de CD40-Ig en allogreffe. Les anticorps anti-CD40L induisent la survie à long terme du greffon (Tableau 10) mais n'induisent pas la tolérance en monothérapie et sont moins efficaces que chez le rongeur.

Clone	Prolongation survie	Tolérance	Effet thromboembotique	Références
Hu5C8	Oui rein : 1-10 mois peau : 6mois-1 an îlots= 4-15 mois	Non	Oui	(Kirk, Harlan et al. 1997; Kenyon, Chatzipetrou et al. 1999; Kirk, Burkly et al. 1999; Elster, Xu et al. 2001; Montgomery, Xu et al. 2002; Xu, Tadaki et al. 2002) (Knosalla, Gollackner et al. 2002) (Kawai, Andrews et al. 2000) (Buhler, Alwayn et al. 2001; Elster, Xu et al. 2001; Xu, Elster et al. 2001; Kawai, Sogawa et al. 2004; Koyama, Kawai et al. 2004)
IDEC-131	Oui Cœur : 2 mois Peau : 10-12 jours Rein : 3j-1mois (variable+++)	Non	Oui	(Pfeiffer, Iii et al. 2001; Pierson, Crowe et al. 2001; Xu, Montgomery et al. 2003; Preston, Xu et al. 2005)
ABI-793	Oui Rein : 1-12 mois	Non	Oui	(Kanmaz, Fechner et al. 2004; Schuler, Bigaud et al. 2004)
4D11	Oui Rein 3-12 mois	Non	Non	(Imai, Suzuki et al. 2007)

Tableau 10. Les anticorps anti-CD40L (monothérapie) en allogreffe chez le primate

D'après (Kean, Gangappa et al. 2006)

Tout comme chez le petit animal, il semble peu probable que l'efficacité de ces anticorps soit uniquement due au blocage de l'interaction CD40/CD40L et la suppression de l'activation des lymphocytes T naïfs. Tout d'abord, et bien que l'efficacité du blocage de la MLR soit un mauvais pronostic de l'induction de la tolérance *in vivo* (Vierboom, Ossevoort et al. 2003), les anticorps anti-CD40L humains seuls inhibent très modestement une MLR *in vitro* (Kirk, Harlan et al. 1997) (Arpinati, Chirumbolo et al. 2008), et peuvent même avoir des effets activateurs sous forme immobilisée (Arpinati, Chirumbolo et al. 2008), alors qu'ils favorisent la survie du greffon *in vivo*. Il est notable que l'effet des anticorps anti-CD40L en MLR ne soit disponible que pour un clone (5C8), suggérant une mauvaise efficacité d'inhibition pour les autres anticorps.

Ferrant *et al.* (Ferrant, Benjamin et al. 2004) ont voulu analyser l'importance du fragment Fc de l'anticorps anti-CD40L Hu5C8 chez le primate. Pour cela, ils ont comparé l'efficacité *in vivo* du Hu5C8 avec sa forme aglycosilé ayant une avidité très réduite pour le RFc γ et pour la molécule du complément C1q. Dans un modèle de greffe d'îlots et de greffe rénale associées à un traitement anti-CD40L aglycosilé, la survie du greffon est très proche des animaux non traités alors que l'utilisation du Hu5C8 original retarde le rejet. Ces résultats résonnent avec une autre étude qui a démontré que la dimérisation des fragments Fc des molécules anti-CD40L est nécessaire à l'activité de hu5C8 (Monk, Hargreaves et al. 2003). La distribution du RFc γ au niveau des sites de l'inflammation ou l'agrégation

de l'anticorps pourrait également améliorer son avidité. Ces résultats suggèrent une nouvelle fois l'importance du fragment Fc et de la voie du complément dans les effets des anticorps anti-CD40L. Les quantités importantes de Hu5C8 nécessaires pour inhiber la réponse humorale (5-20 mg/kg) ont été imputés au grand nombre de sites à saturer si on inclut les plaquettes, mais suggère également l'importance de l'agrégation plutôt qu'une déplétion. L'utilisation d'un anticorps anti-CD40L chez le primate ne semble néanmoins pas dépléter les lymphocytes T ou B (Kirk, Burkly et al. 1999) (Kenyon, Chatzipetrou et al. 1999). La perte d'efficacité de notre molécule CD40-Ig pourrait venir de l'utilisation d'un isotype Fc moins sensible à ces mécanismes; néanmoins, nous avons utilisé le fragment Fc IgG1 humain, qui est également utilisé dans l'anticorps hu5C8 (Pierson, Chang et al. 1999). Il est donc peu probable que la perte d'efficacité que nous voyons dans notre modèle soit due à l'isotype d'Ig utilisé dans notre construction.

Chez nos animaux traités avec CD40-Ig, la molécule n'est pas capable de se fixer aux lymphocytes T naïfs périphériques avant la greffe. En revanche, quelques jours après la greffe, le pourcentage de lymphocytes T marqués par CD40-Ig, et donc le pourcentage de lymphocytes T circulant activés CD40L⁺ suggère que dans le cadre d'une allogreffe rénale chez le primate non humain, le CD40-Ig pourrait participer à l'activation des lymphocytes T périphériques. Arpinati a démontré que la forme soluble de hu5C8 est capable d'inhiber modestement une MLR, alors que sa forme immobilisée possède des effets stimulateurs sur les lymphocytes T et induit la différenciation de lymphocytes T cytotoxiques (Arpinati, Chirumbolo et al. 2008). Les résultats suggèrent que la voie de signalisation mise en jeu est partiellement indépendante de la voie de costimulation CD28/B7 (Arpinati, Chirumbolo et al. 2008). Dans une autre étude, l'utilisation combinée d'un anti-CD3 et de hu5C8 *in vitro* induit une activation CD28 indépendante et une délétion subséquente des lymphocytes T (Blair, Riley et al. 2000). Le faible effet inhibiteur de hu5C8 *in vitro* pourrait être capable de surpasser l'effet activateur *in vivo*, et ainsi entraver la maintenance des lymphocytes T (Buhlmann, Gonzalez et al. 1999) (Markees, Phillips et al. 1997). Alternativement, l'effet *in vivo* pourrait résulter de l'activation plutôt que l'inhibition, via le mécanisme de mort induite par l'activation.

Les lymphocytes T mémoires, formant un répertoire agissant de manière croisée contre les cellules du greffon, pourraient expliquer le manque d'efficacité de CD40-Ig. En effet, l'activation de la voie CD40/CD40L est essentielle à l'activation des lymphocytes T naïfs et non aux lymphocytes T mémoires (Borrow, Tough et al. 1998) et le traitement anti-CD40L est inefficace dans un modèle d'allogreffe murin pré-sensibilisé (Zhai, Meng et al. 2002) Chez la souris, les lymphocytes mémoires sont également connus pour résister à la déplétion médiée par les anticorps monoclonaux (Kuroda, Schmitz et al. 1999). Pearl *et al.* ont proposé un modèle (Pearl, Xu et al. 2007) pour évaluer l'importance de ces lymphocytes T mémoires dans le blocage de la voie CD40/CD40L en transplantation. Pour ce faire, ils ont manipulé le répertoire T périphérique de macaques pour obtenir une dominance de lymphocytes mémoires. Dans ce modèle expérimental, l'utilisation d'un traitement conjugué anti-CD40L/sirolimus/DST a permis de prolonger la survie du greffon au-delà de 100 jours, comme chez les animaux contrôles ayant un répertoire T « normal ». Néanmoins, cette étude évalue un traitement combiné et ne permet pas de conclure quant à l'importance des lymphocytes mémoires

chez le primate non humain dans la perte d'efficacité de l'anticorps anti-CD40L en monothérapie par rapport aux rongeurs.

Tout comme les modèles rongeurs, une explication alternative et complémentaire à l'efficacité du traitement par les anticorps anti-CD40L est la génération de lymphocytes T régulateurs ayant une activité immunorégulatrice. Cependant, aucune étude portée chez les primates n'a encore présenté des résultats dans ce sens.

L'espèce utilisée pourrait présenter une résistance à l'efficacité du CD40-Ig. Les macaques *Cynomolgus* sont potentiellement plus difficiles à « immuno-supprimer » que les macaques Rhésus : en utilisant le même traitement (anti-CD40L ABI793 pendant 3 mois post-transplantation en iv), Kanmaz *et al* (Kanmaz, Fechner et al. 2004) ont obtenu des résultats légèrement meilleurs (médiane de survie : 149 jours post greffe) que Schuler *et al* (Schuler, Bigaud et al. 2004) (médiane de survie : 108 jours) malgré une concentration circulante inférieure (300-600 µg/ml contre 500-1000 µg/ml). Le CD40-Ig pourrait donc avoir des effets variables selon les espèces testées

- **Anti-CD40L chez l'Homme**

Les essais cliniques pilotes utilisant les anticorps anti-CD40L sont peu, voire non efficaces (Kirk, Knechtle et al. 2001; Kalunian, Davis et al. 2002), supposément à cause de la composition du répertoire lymphocytaire T de l'homme adulte, riche en lymphocytes T mémoires. De plus, des complications thromboemboliques ont été notées dans certaines études, suite à l'utilisation d'anti-CD40L chez l'Homme et le primate non humain (Tableau 10) (Kalunian, Davis et al. 2002) (Kawai, Andrews et al. 2000), ce qui a stoppé le développement de cette stratégie. Les anticorps anti-CD40L sont capables de se fixer à CD40L mais aussi à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ des plaquettes (Andre, Prasad et al. 2002). En accord avec cette hypothèse, l'absence de CD40L chez les souris CD40L^{-/-} induit la déstabilisation et la désintégration de larges thrombi pouvant causer de microinfarctus (Andre, Prasad et al. 2002) indépendamment de CD40. D'autres études ont montré que les propriétés pro-thrombotiques des anti-CD40L passeraient par des interactions entre le fragment Fc et son récepteur (Langer, Ingersoll et al. 2005) (Mirabet, Barrabes et al. 2008). Il est envisageable que le CD40-Ig puisse avoir les mêmes effets mais nous n'avons noté aucun effet pro-thrombotique chez les singes injectés avec l'AAV-CD40-Ig.

Les plaquettes sont également capables de relarguer CD40L sous forme soluble (sCD40L) après leur activation (Henn, Slupsky et al. 1998). Le sCD40L est capable d'activer des cellules endothéliales et des CPA *in vitro* (Czapiga, Kirk et al. 2004) (Xu, Arnaud et al. 2001). Xu *et al.* ont démontré que le sCD40L est capable d'induire un rejet d'allogreffe indépendamment du CD40L membranaire, à distance du geste chirurgical (Xu, Zhang et al. 2006), montrant la participation des signaux non immuns à la réponse allogénique liée à la greffe. L'importance du CD40L dérivé des plaquettes qui pourrait être produit en grandes quantités pourrait également expliquer la forte dose d'anti-CD40L nécessaire pour prolonger la greffe chez le primate non humain. Le CD40-Ig pourrait également interagir avec le sCD40L relargué par les plaquettes suite au trauma de la greffe, et expliquer, du moins en partie, le manque d'efficacité de cette molécule à retarder le rejet de greffe.

- **Sc28AT et le blocage de la voie CD28/B7 chez le primate non humain**

Chez le primate non humain, les anticorps monoclonaux dirigés contre B7-1 et B7-2 en monothérapie ne prolongent que modérément la survie de l'allogreffe rénale alors qu'en combinaison avec un immunosuppresseur comme le sirolimus, ils retardent significativement le rejet (Birsan, Hausen et al. 2003). Chez le rongeur, ces anticorps anti-B7-1 et anti-B7-2 sont capables de prolonger la survie du greffon et sont également plus efficaces en combinaison (Lenschow, Zeng et al. 1995; Woodward, Bayer et al. 1998; Kagaya, Hori et al. 2002). Néanmoins, le coût du développement de deux molécules au lieu d'une seule a rendu cette approche anti-B7-1/anti-B7-2 difficilement envisageable pour des applications cliniques. La protéine de fusion CTLA4-Ig à l'avantage de se fixer à B7-1 et (avec moins d'affinité) à B7-2. CTLA4-Ig présente une efficacité limitée chez le macaque (Tableau 11) alors qu'elle induit une survie à long terme du greffon en monothérapie chez le petit animal (Laumonier, Potiron et al. 2003; Potiron, Chagneau et al. 2005). Le CTLA4-Ig semble induire un blocage sous-optimal en raison de sa faible avidité. Pour éviter cet écueil une version mutée de CTLA4-Ig, nommée LEA29Y, a été développée et présente une meilleure avidité que CTLA4-Ig pour B7-2. En monothérapie, le LEA29Y est capable de prolonger significativement la survie en allogreffe rénale chez le macaque rhésus (Tableau 11).

Traitement	Prolongation survie	Références
Anti-CD80/86	Modérée rein : 1-3 mois peau : 14 jours	(Ossevoort, Lorre et al. 1999; Ossevoort, Ringers et al. 1999; Hausen, Klupp et al. 2001; Kirk, Tadaki et al. 2001; Montgomery, Xu et al. 2002; Birsan, Hausen et al. 2003; Haanstra, Ringers et al. 2003; Haanstra, Sick et al. 2005)
CTLA4-Ig	Peu/pas efficace îlots : prolongation survie 2/5 animaux rein : 8j (mediane)	(Levisetti, Padrid et al. 1997; Larsen, Pearson et al. 2005)
LEA29Y	Oui rein : 45 j (médiane)	(Larsen, Pearson et al. 2005)

Tableau 11. Le blocage de la voie CD28/B7 en allogreffe chez le primate

D'après (Kean, Gangappa et al. 2006)

L'anticorps monovalent antagoniste sc28AT dirigé contre le CD28 est capable de retarder le rejet de greffe dans notre étude chez le macaque en monothérapie (rejet à J18 contre J6 pour les contrôles). La faible expression de sc28AT comparativement à celle de CD40-Ig (20 ug/ml contre 100-300 ug/ml) semble due à l'alpha-1-antitrypsine qui pourrait être moins efficace que le fragment Fc pour prolonger la demi-vie. En effet, contrairement à l'alpha-1-antitrypsine, les fragments Fc sont recyclés dans la circulation via les récepteurs FcRn présents sur les cellules endothéliales, ce qui permet l'accumulation de la protéine dans la circulation. De plus, dans notre étude, la molécule sc28AT est immunogène et est éliminée rapidement pour être absente une semaine avant le rejet. Des données préliminaires obtenues par l'équipe de B. Vanhove montrent que l'injection de la protéine sc28AT en IV chez le babouin induit l'apparition d'anticorps dirigés contre le sc28AT et une chute du taux de la protéine sc28AT injectée (communication personnelle). Cette immunisation est probablement due à l'alpha-1-antitrypsine, utilisée pour augmenter la demi-vie de la protéine. Il a déjà été décrit que l'administration intramusculaire d'un AAV codant pour l'alpha-1 antitrypsine humaine provoque l'apparition des anticorps anti-AAT chez le primate non humain, en corrélation avec la perte de l'expression du transgène (Song, Scott-Jorgensen et al. 2002). L'alpha-1-antitrypsine humaine semble donc immunogène chez le primate non humain. Cependant, l'alpha-1-antitrypsine est capable d'induire la tolérance chez le rongeur en greffe d'îlots (Song, Goudy et al. 2004; Lewis, Shapiro et al. 2005; Lewis, Mizrahi et al. 2008) selon des mécanismes mal élucidés.

- **Combinaison CD40-Ig et sc28AT**

Afin de remédier aux limites du blocage de CD28/B7 et de CD40/CD40L en monothérapie chez le primate, nous avons utilisé une combinaison d'AAV/CD40-Ig et AAV/sc28AT. Les voies de costimulation CD40/CD40L et CD28/B7 coopèrent pour activer les lymphocytes T (Lenschow, Walunas et al. 1996). Au laboratoire, il a été montré dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat que les blocages combinés de la voie CD40/CD40L (par un AdCD40-Ig) et de CD28/B7 (par un anti-CD28 préservant la voie CTLA4/B7) synergisent pour induire une survie à long terme des greffons, préviennent l'apparition de lésions de rejet chronique dans 60% des cas et abrogent la formation d'alloanticorps (Guillonnet, Seveno et al. 2007). En effet, l'interaction de CD40L avec le CD40 des lymphocytes B est une étape importante de leur activation et leur différenciation (Foy, Shepherd et al. 1993). L'injection combinée n'a pu éviter l'apparition des anticorps anti-sc28AT et la protéine a été rapidement éliminée. Néanmoins, malgré l'absence de la molécule sc28AT au moment de la greffe, la survie du greffon a été significativement prolongée (J18 contre J6 pour les contrôles). Il est possible que les lymphocytes recouverts par le sc28AT aient été éliminés préalablement à la greffe via une déplétion médiée par les anticorps anti-sc28AT, néanmoins nous ne notons pas de diminution significative du nombre total de lymphocytes après l'injection de sc28AT (données non montrées). Lors de l'injection simultanée des deux AAV chez cet animal la production de CD40-Ig est décalée et intervient après la disparition du sc28AT et l'apparition des anticorps anti-sc28AT. Dans cette situation, CD40-Ig n'a pu exercer son rôle potentiellement protecteur vis à vis de l'apparition des anticorps. D'autres animaux sont prévus en combinaison CD40-Ig/sc28AT. Il est à noter que dans d'autres études, la combinaison des anticorps anti-CD80/CD86 ou CTLA4-Ig avec un anti-CD40L n'a pas semblé induire de synergie chez le primate (Montgomery, Xu et al. 2002) (Elster, Xu et al. 2001)

(Xu, Elster et al. 2001). Néanmoins, un anticorps bispécifique anti-CD40/CD86, capable de prévenir l'expansion des lymphocytes T allogéniques et la génération de lymphocytes T cytotoxiques, et capable d'induire des lymphocytes T régulateurs induisant l'anergie de manière spécifique à l'antigène *in vitro* semble prometteur (Koenen, den Hartog et al. 2004).

- **Divergences entre le modèle rongeur et le modèle primate non humain**

Ces résultats montrent une forte divergence entre les résultats obtenus avec CD40-Ig chez le rongeur et chez le primate. Les études *in vitro* ne peuvent mimer la complexité des acteurs cellulaires et humoraux rencontrés en allo-transplantation, les modèles animaux sont donc indispensables pour confronter les hypothèses mécanistiques formulées *in vitro*. Dans cette logique, les primates sont utilisés comme étape préalable aux essais pré-cliniques. Extrapoler les résultats obtenus chez les rongeurs aux primates reste difficile, et ce pour différentes raisons. D'abord, le jeune âge des rongeurs utilisés doit correspondre à un système immunitaire immature, plus facile à manipuler. De plus, les rongeurs sont élevés dans une atmosphère contrôlée et leur nourriture est irradiée, ce qui contribue à la pauvreté de leur répertoire de lymphocytes T mémoires. A l'inverse, les primates sont souvent des animaux de capture, puis élevés en captivité, nourris avec des granulés, mais aussi des fruits « normaux », ce qui doit influencer leur répertoire T. Chez les rongeurs, l'expression des molécules du CMH de classe II est restreinte aux cellules présentant l'antigène (Choo, Seebach et al. 1997), contrairement aux primates où l'expression constitutive du CMH-II sur leur endothélium joue un rôle important en transplantation (Kirk 1999). Le métabolisme est également différent, rendant difficile les conversions de dosage et de pharmacocinétique (Mordenti 1986). De nombreux CD restent non identifiés chez le macaque et la détermination des sous-classes d'immunoglobulines est encore imprécise chez le babouin (Dehoux, de la Parra et al. 2002). Il est également possible que les primates aient perdu certaines molécules liées au système immunitaire lors de l'évolution, rendant certains mécanismes définis chez les rongeurs inadaptés aux primates.

D'un autre côté, le primate est très similaire à l'Homme au niveau des molécules du CMH (Prilliman, Lawlor et al. 1996), des cytokines (Villinger, Brar et al. 1995), des anticorps (Herodin, Thullier et al. 2005), du système ABO et de la coagulation (Wiener, Socha et al. 1974) (Mestries, Kruithof et al. 1994). Néanmoins, entre l'Homme et le chimpanzé, 80% des protéines sont différentes (Glazko, Veeramachaneni et al. 2005). L'exemple récent de l'essai clinique TGN1412 illustre de manière dramatique les différences entre l'Homme et le primate. Chez le primate non humain, l'administration de cet anticorps anti-CD28 superagoniste induit des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ résultant en une lymphocytose et l'absence d'effets toxiques. Administrée chez l'Homme, cette molécule a provoqué chez des volontaires sains une activation polyclonale du compartiment T et le développement d'un choc cytokinique majeur ayant généré une défaillance de multiples organes (Suntharalingam, Perry et al. 2006).

Pourquoi les macaques *Cynomolgus* et *Rhesus* n'ont-ils pas montré les effets délétères du TGN1412 compte tenu du fait que le domaine extracellulaire du CD28 est conservé entre ces trois espèces (Hanke 2006), que le nombre de molécules CD28 exprimées est équivalent, et que l'affinité

du TGN1412 pour CD28 chez l'Homme et le singe sont comparables (Hanke 2006) (Waibler, Sender et al. 2008) ? Si le domaine extracellulaire est conservé, le domaine transmembranaire présente des différences pour 3 acides aminés entre l'homme et le primate (Waibler, Sender et al. 2008). Cette particularité pourrait entraîner des modifications de la transduction du signal. Une autre hypothèse est basée sur l'importance de la perte évolutive des récepteurs membranaires Siglec, des molécules de la superfamille des immunoglobulines pouvant porter des domaines ITIM dans leur queue cytoplasmique. Ces molécules sont difficilement détectables sur les lymphocytes humains alors que les chimpanzés expriment plusieurs membres de ces récepteurs. Il a été prouvé que l'expression de siglec-5 sur les lymphocytes T humains empêche la réponse médiée par CD3 (Nguyen, Hurtado-Ziola et al. 2006). La perte évolutive de siglec sur les lymphocytes humains pourrait abaisser le seuil d'activation nécessaire pour activer la machinerie de signalisation intracellulaire. Il reste à déterminer si les macaques Rhésus et *Cynomolgus* expriment siglec et si son altération peut modifier les réponses au anti-CD28 superagonistes.

Notre modèle d'évaluation de l'induction de tolérance utilise le transfert de gène par vecteurs viraux pour faire exprimer nos molécules d'intérêt. Il convient de préciser que ce modèle est expérimental et ne constitue pas une approche préclinique. La dose optimale à utiliser, l'addition de séquences permettant de réguler l'expression du gène transduit et l'étude du caractère intégratif des vecteurs sont des points particulièrement importants pour la sécurité des applications de transferts de gène par vecteurs viraux. Dans notre modèle, le virus AAV est injecté par perfusion dans le muscle du primate et il a été montré que dans ces conditions, le génome du vecteur viral persiste sous forme épisomique dans le muscle des animaux (Penaud-Budloo, Le Guiner et al. 2008), ce qui évite les effets secondaires liés à l'intégration du génome viral. Pour être utilisable en transplantation, il faudrait que l'expression du gène d'intérêt puisse être arrêté quand son expression atteint la dose thérapeutique ou lorsque l'effet désiré est atteint, ceci afin d'éviter les effets secondaires. Quatre systèmes de régulation ont été développés : les systèmes tétracycline, rapamycine, le récepteur aux stéroïdes des mammifères et des insectes. Seuls les systèmes tétracycline et rapamycine ont été testés chez le primate, cependant ils induisent le développement d'une réponse cellulaire et humorale contre les protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle et la perte d'expression du transgène (Le Guiner, Stieger et al. 2007). En l'absence de système de régulation opérationnel, notre modèle restera donc purement expérimental.

Nous avons développé une molécule CD40-Ig humaine fonctionnelle *in vitro*. L'injection des animaux par AAV CD40-Ig et/ou sc28AT permet une expression prolongée de CD40-Ig, mais plus faible et transitoire du sc28AT, qui semble immunogène. Le CD40-Ig ne semble pas prolonger seul la survie de la greffe contrairement au sc28AT. La survie du greffon d'un animal recevant les deux transgènes a été prolongée et d'autres animaux sont prévus. L'expression de molécules d'intérêt thérapeutique par vecteurs viraux permet de disposer d'un modèle d'évaluation de bioréactifs pour l'induction de la tolérance chez le primate dans des conditions de faisabilité satisfaisantes. Cependant, l'efficacité limitée des molécules CD40-Ig et sc28AT dans ce modèle de transplantation utilisant des vecteurs viraux montre les limites de la transposition des modèles rongeurs aux primates non humains.

Bibliographie

- Adachi, K., M. Fujino, et al. (2006). "Exogenous expression of Fas-ligand or CrmA prolongs the survival in rat liver transplantation." Transplant Proc **38**(8): 2710-3.
- Adams, A. B., M. A. Williams, et al. (2003). "Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance." The Journal of Clinical Investigation **111**(12): 1887-95.
- Afzali, B., G. Lombardi, et al. (2007). "The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease." Clinical and Experimental Immunology **148**(1): 32-46.
- Albert, M. L., M. Jegathesan, et al. (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." Nature Immunology **2**(11): 1010-7.
- Alegre, M. L., K. A. Frauwirth, et al. (2001). "T-cell regulation by CD28 and CTLA-4." Nature reviews. Immunology **1**(3): 220-8.
- Alexander, W. S., R. Starr, et al. (1999). "SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine." Cell **98**(5): 597-608.
- Allakhverdi, Z., D. Fitzpatrick, et al. (2006). "Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets." J Allergy Clin Immunol **118**(6): 1342-9.
- Allan, J. S., J. K. Choo, et al. (1997). "Cardiac allograft vasculopathy is abrogated by anti-CD8 monoclonal antibody therapy." The Annals of thoracic surgery **64**(4): 1019-25.
- Allan, S. E., R. Broady, et al. (2008). "CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases." Immunol Rev **223**: 391-421.
- Alonso, D. R., P. K. Starek, et al. (1977). "Studies on the pathogenesis of atheroarteriosclerosis induced in rabbit cardiac allografts by the synergy of graft rejection and hypercholesterolemia." The American journal of pathology **87**(2): 415-42.
- Amalfitano, A. (1999). "Next-generation adenoviral vectors: new and improved." Gene Therapy **6**(10): 1643-5.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." Science (New York, N.Y.) **298**(5597): 1395-401.
- Andre, P., K. S. Prasad, et al. (2002). "CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism." Nat Med **8**(3): 247-52.
- Andreadis, S. T., C. M. Roth, et al. (1999). "Large-scale processing of recombinant retroviruses for gene therapy." Biotechnology Progress **15**(1): 1-11.
- Aramaki, O., N. Shirasugi, et al. (2004). "Programmed death-1-programmed death-L1 interaction is essential for induction of regulatory cells by intratracheal delivery of alloantigen." Transplantation **77**(1): 6-12.
- Argnani, R., M. Lufino, et al. (2005). "Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications." Gene Ther **12 Suppl 1**: S170-7.
- Arneson, L. N., A. Brickshawana, et al. (2007). "Cutting edge: syntaxin 11 regulates lymphocyte-mediated secretion and cytotoxicity." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **179**(6): 3397-401.
- Arpin, C., J. DÇchanet, et al. (1995). "Generation of memory B cells and plasma cells in vitro." Science (New York, N.Y.) **268**(5211): 720-2.
- Arpinati, M., G. Chirumbolo, et al. (2008). "Enhancement of T cell activation by immobilized hu5C8 (anti-CD40L) monoclonal antibody." Eur J Haematol **80**(4): 322-30.
- Arpinati, M., G. Chirumbolo, et al. (2003). "Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Transpl Immunol **11**(3-4): 345-56.
- Arreaza, G. A., M. J. Cameron, et al. (1997). "Neonatal activation of CD28 signaling overcomes T cell anergy and prevents autoimmune diabetes by an IL-4-dependent mechanism." J Clin Invest **100**(9): 2243-53.
- Arruda, V. R., H. H. Stedman, et al. (2005). "Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model." Blood **105**(9): 3458-64.
- Ashour, H. M. and J. Y. Niederkorn (2006). "Gammadelta T cells promote anterior chamber-associated immune deviation and immune privilege through their production of IL-10." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **177**(12): 8331-7.

- Auchincloss, H., R. Lee, et al. (1993). "The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(8): 3373-7.
- Bacchetta, R., M. Bigler, et al. (1994). "High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells." The Journal of Experimental Medicine **179**(2): 493-502.
- Baecher-Allan, C., E. Wolf, et al. (2006). "MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells." J Immunol **176**(8): 4622-31.
- Bailey, C. J., R. G. Crystal, et al. (2003). "Association of adenovirus with the microtubule organizing center." Journal of Virology **77**(24): 13275-87.
- Barrou, B., L. Bertry-Coussot, et al. (2002). "Prolonged islet allograft survival by adenovirus-mediated transfer of sICAM-1/Ig immunoadhesin gene." Hum Gene Ther **13**(12): 1441-50.
- Battaglia, M., A. Stabilini, et al. (2005). "Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells." Blood **105**(12): 4743-8.
- Beck, S. and J. Trowsdale (2000). "The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence." Annual Review of Genomics and Human Genetics **1**: 117-37.
- Beier, K. C., A. Hutloff, et al. (2000). "Induction, binding specificity and function of human ICOS." European journal of immunology **30**(12): 3707-17.
- Bellon, G., L. Calmard, et al. (1996). "[Aerosol administration of a replication defective recombinant adenovirus expressing normal human cDNA-CFTR in the respiratory tractus in patients with cystic fibrosis]." C R Seances Soc Biol Fil **190**(1): 109-42.
- Bendelac, A., M. N. Rivera, et al. (1997). "Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function." Annual Review of Immunology **15**: 535-62.
- Benichou, G., A. Valujskikh, et al. (1999). "Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **162**(1): 352-8.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, et al. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." Science (New York, N.Y.) **275**(5304): 1320-3.
- Bernardes, E. S., N. M. Silva, et al. (2006). "Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity." Am J Pathol **168**(6): 1910-20.
- Beyersdorf, N., X. Ding, et al. (2007). "Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1." European Journal of Immunology **37**(12): 3445-54.
- Beyersdorf, N., T. Hanke, et al. (2005). "Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases." Ann Rheum Dis **64 Suppl 4**: iv91-5.
- Beyersdorf, N. B., X. Ding, et al. (2001). "Expression of inhibitory "killer cell lectin-like receptor G1" identifies unique subpopulations of effector and memory CD8 T cells." Eur J Immunol **31**(12): 3443-52.
- Bhagat, G., A. J. Naiyer, et al. (2008). "Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease." J Clin Invest **118**(1): 281-93.
- Bickerstaff, A. A., A. M. VanBuskirk, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta and interleukin-10 subvert alloreactive delayed type hypersensitivity in cardiac allograft acceptor mice." Transplantation **69**(7): 1517-20.
- Bilbao, G., J. L. Contreras, et al. (1999). "Genetic modification of liver grafts with an adenoviral vector encoding the Bcl-2 gene improves organ preservation." Transplantation **67**(6): 775-83.
- Birsan, T., B. Hausen, et al. (2003). "Treatment with humanized monoclonal antibodies against CD80 and CD86 combined with sirolimus prolongs renal allograft survival in cynomolgus monkeys." Transplantation **75**(12): 2106-13.
- Bjorkman, P. J. and P. Parham (1990). "Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules." Annual Review of Biochemistry **59**: 253-88.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, et al. (1987). "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2." Nature **329**(6139): 506-12.
- Blair, P. J., J. L. Riley, et al. (2000). "CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis." The Journal of Experimental Medicine **191**(4): 651-60.
- Blydt-Hansen, T. D., M. Katori, et al. (2003). "Gene transfer-induced local heme oxygenase-1 overexpression protects rat kidney transplants from ischemia/reperfusion injury." J Am Soc Nephrol **14**(3): 745-54.

- Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." *Cell* **74**(4): 597-608.
- Bopp, T., C. Becker, et al. (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." *The Journal of Experimental Medicine* **204**(6): 1303-10.
- Borrow, P., D. F. Tough, et al. (1998). "CD40 ligand-mediated interactions are involved in the generation of memory CD8(+) cytotoxic T lymphocytes (CTL) but are not required for the maintenance of CTL memory following virus infection." *Journal of Virology* **72**(9): 7440-9.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, et al. (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." *Blood* **110**(4): 1225-32.
- Bouche, D., C. Chauveau, et al. (2002). "Inhibition of graft arteriosclerosis development in rat aortas following heme oxygenase-1 gene transfer." *Transpl Immunol* **9**(2-4): 235-8.
- Bour-Jordan, H. and J. A. Blueston (2002). "CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals." *Journal of Clinical Immunology* **22**(1): 1-7.
- Brauner, R., M. Nonoyama, et al. (1997). "Intracoronary adenovirus-mediated transfer of immunosuppressive cytokine genes prolongs allograft survival." *J Thorac Cardiovasc Surg* **114**(6): 923-33.
- Brenner, M. B., J. McLean, et al. (1986). "Identification of a putative second T-cell receptor." *Nature* **322**(6075): 145-9.
- Brimnes, J., M. Allez, et al. (2005). "Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease." *J Immunol* **174**(9): 5814-22.
- Brown, J. H., T. S. Jardetzky, et al. (1993). "Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1." *Nature* **364**(6432): 33-9.
- Bruhl, H., J. Cihak, et al. (2004). "Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells." *J Immunol* **172**(2): 890-8.
- Budker, V., G. Zhang, et al. (1998). "The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle." *Gene Ther* **5**(2): 272-6.
- Buhler, L., I. P. Alwayn, et al. (2001). "Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism." *Transplantation* **71**(3): 491.
- Buhlmann, J. E., M. Gonzalez, et al. (1999). "Cutting edge: sustained expansion of CD8+ T cells requires CD154 expression by Th cells in acute graft versus host disease." *J Immunol* **162**(8): 4373-6.
- Burns, J. C., T. Friedmann, et al. (1993). "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(17): 8033-7.
- Cameron, M. J., G. A. Arreaza, et al. (1997). "Cytokine- and costimulation-mediated therapy of IDDM." *Crit Rev Immunol* **17**(5-6): 537-44.
- Campos, S. K. and M. A. Barry (2007). "Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting." *Current Gene Therapy* **7**(3): 189-204.
- Candon, S. (2007). *Transplantation rénale: aspects immunologiques*. Néphrologie, Elsevier Masson SAS.
- Cao, X., S. F. Cai, et al. (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." *Immunity* **27**(4): 635-46.
- Carlyle, J. R., A. M. Jamieson, et al. (2004). "Missing self-recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3527-32.
- Carroll, R. G., J. L. Riley, et al. (1997). "Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells." *Science (New York, N.Y.)* **276**(5310): 273-6.
- Cathomen, T., T. H. Stracker, et al. (2001). "A genetic screen identifies a cellular regulator of adeno-associated virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(26): 14991-6.
- Cemazar, M., M. Golzio, et al. (2006). "Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues in vivo: where do we stand?" *Curr Pharm Des* **12**(29): 3817-25.
- Chan, C. W., M. W. Chan, et al. (2002). "Kinetic analysis of a unique direct prothrombinase, fgl2, and identification of a serine residue critical for the prothrombinase activity." *J Immunol* **168**(10): 5170-7.
- Chan, C. W., L. S. Kay, et al. (2003). "Soluble fibrinogen-like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells." *J Immunol* **170**(8): 4036-44.
- Chan, C. W. Y., L. S. Kay, et al. (2003). "Soluble fibrinogen-like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of

- bone marrow-derived dendritic cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **170**(8): 4036-44.
- Chan, S. H., M. Kobayashi, et al. (1992). "Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **148**(1): 92-8.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, et al. (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." Nature Immunology **3**(3): 237-43.
- Chang, G. J., T. Liu, et al. (2002). "Targeted gene therapy with CD40Ig to induce long-term acceptance of liver allografts." Surgery **132**(2): 149-56.
- Chang, L. S., Y. Shi, et al. (1989). "Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor." Journal of Virology **63**(8): 3479-88.
- Chapoval, A. I., J. Ni, et al. (2001). "B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production." Nature Immunology **2**(3): 269-74.
- Chaturvedi, P., A. P. Singh, et al. (2008). "Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin." The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **22**(4): 966-81.
- Chen, L. (2004). "Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity." Nat Rev Immunol **4**(5): 336-47.
- Chen, W., M. S. Ford, et al. (2003). "Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **170**(4): 1846-53.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science (New York, N.Y.) **265**(5176): 1237-40.
- Chen, Z., A. E. Herman, et al. (2005). "Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes." The Journal of Experimental Medicine **202**(10): 1387-97.
- Chen, Z. K., S. P. Cobbold, et al. (1996). "Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance." Transplantation **62**(9): 1200-6.
- Chenuaud, P., T. Larcher, et al. (2004). "Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle." Mol Ther **9**(3): 410-8.
- Chernajovsky, Y., D. J. Gould, et al. (2004). "Gene therapy for autoimmune diseases: quo vadis?" Nat Rev Immunol **4**(10): 800-11.
- Chiou, H. C., M. V. Tangco, et al. (1994). "Enhanced resistance to nuclease degradation of nucleic acids complexed to asialoglycoprotein-polylysine carriers." Nucleic Acids Res **22**(24): 5439-46.
- Cho, Y. W., J. M. Cecka, et al. (1994). "HLA matching effect: better survival rates and graft quality." Clin Transpl: 435-49.
- Choi, B. K., T. Asai, et al. (2006). "4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms." Cytokine **34**(5-6): 233-42.
- Choo, J. K., J. D. Seebach, et al. (1997). "Species differences in the expression of major histocompatibility complex class II antigens on coronary artery endothelium: implications for cell-mediated xenoreactivity." Transplantation **64**(9): 1315-22.
- Christopherson, K. W., 2nd, G. Hangoc, et al. (2004). "Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26." Science **305**(5686): 1000-3.
- Ciubotariu, R., R. Vasilescu, et al. (2001). "Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts." Human Immunology **62**(1): 15-20.
- Clark, E. A. and J. A. Ledbetter (1986). "Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(12): 4494-8.
- Coenen, J. J. A., H. J. P. M. Koenen, et al. (2006). "CTLA-4 engagement and regulatory CD4+CD25+ T cells independently control CD8+-mediated responses under costimulation blockade." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **176**(9): 5240-6.
- Coenen, J. J. A., H. J. P. M. Koenen, et al. (2005). "Tolerizing effects of co-stimulation blockade rest on functional dominance of CD4+CD25+ regulatory T cells." Transplantation **79**(2): 147-56.
- Coffin, J., S. Hughes, et al. (1997). Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cohen, A. H. and C. C. Nast (1998). "TGF-beta in renal allograft rejection." Mineral and Electrolyte Metabolism **24**(2-3): 197-201.

- Cole, K. E., C. A. Strick, et al. (1998). "Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3." *J Exp Med* **187**(12): 2009-21.
- Collins, R. A., D. Werling, et al. (1998). "Gammadelta T cells present antigen to CD4+ alphabeta T cells." *Journal of Leukocyte Biology* **63**(6): 707-14.
- Collison, L. W., C. J. Workman, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* **450**(7169): 566-9.
- Constant, S. L. and K. Bottomly (1997). "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." *Annual Review of Immunology* **15**: 297-322.
- Cottrez, F., S. D. Hurst, et al. (2000). "T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **165**(9): 4848-53.
- Crook, K., G. McLachlan, et al. (1996). "Plasmid DNA molecules complexed with cationic liposomes are protected from degradation by nucleases and shearing by aerosolisation." *Gene Ther* **3**(9): 834-9.
- Cruz, A., S. A. Khader, et al. (2006). "Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection." *J Immunol* **177**(3): 1416-20.
- Czapiga, M., A. D. Kirk, et al. (2004). "Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation." *Exp Hematol* **32**(2): 135-9.
- Dai, Y., E. M. Schwarz, et al. (1995). "Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1401-5.
- Dallman, M. J., O. Shiho, et al. (1991). "Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway." *The Journal of Experimental Medicine* **173**(1): 79-87.
- Daniel, C., S. Horvath, et al. (1998). "A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR." *Immunity* **8**(5): 543-52.
- David, A., J. Chetritt, et al. (2000). "Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats." *Gene Ther* **7**(6): 505-10.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *The Journal of Experimental Medicine* **204**(6): 1257-65.
- DeBruyne, L. A., K. Li, et al. (1998). "Lipid-mediated gene transfer of viral IL-10 prolongs vascularized cardiac allograft survival by inhibiting donor-specific cellular and humoral immune responses." *Gene Ther* **5**(8): 1079-87.
- Degauque, N., D. Lair, et al. (2007). "Development of CD25- regulatory T cells following heart transplantation: evidence for transfer of long-term survival." *European Journal of Immunology* **37**(1): 147-56.
- Dehoux, J. P., B. de la Parra, et al. (2002). "Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft." *Xenotransplantation* **9**(5): 338-49.
- DeLuca, N. A., A. M. McCarthy, et al. (1985). "Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4." *J Virol* **56**(2): 558-70.
- Denning, T. L., S. W. Granger, et al. (2007). "Mouse TCRalphabeta+CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **178**(7): 4230-9.
- Denning, T. L., S. W. Granger, et al. (2007). "Mouse TCRalphabeta+CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses." *J Immunol* **178**(7): 4230-9.
- Densmore, C. L. (2006). "Advances in noninvasive pulmonary gene therapy." *Curr Drug Deliv* **3**(1): 55-63.
- Dey, B. R., Y. G. Yang, et al. (1998). "Interleukin-12 inhibits graft-versus-host disease through an Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T-cell activation and expansion." *Blood* **91**(9): 3315-22.
- Dieckmann, D., H. Plottner, et al. (2001). "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." *The Journal of Experimental Medicine* **193**(11): 1303-10.
- Ding, J. W., Q. Ning, et al. (1997). "Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase." *Journal of Virology* **71**(12): 9223-30.

- Ding, J. W., Q. Ning, et al. (1998). "Expression of the fgl2 and its protein product (prothrombinase) in tissues during murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) infection." Advances in Experimental Medicine and Biology **440**: 609-18.
- Dmitriev, I., V. Krasnykh, et al. (1998). "An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism." Journal of Virology **72**(12): 9706-13.
- Dohrman, A., T. Kataoka, et al. (2005). "Cellular FLIP (long form) regulates CD8+ T cell activation through caspase-8-dependent NF-kappa B activation." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **174**(9): 5270-8.
- Dong, C., N. Gong, et al. (2006). "Antisense ERK1/2 oligodeoxynucleotide gene therapy attenuates graft arteriosclerosis of aortic transplant in a rat model." Transplant Proc **38**(10): 3304-6.
- Dong, C., A. E. Juedes, et al. (2001). "ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function." Nature **409**(6816): 97-101.
- Dong, C., U. A. Temann, et al. (2001). "Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **166**(6): 3659-62.
- Donsante, A., D. G. Miller, et al. (2007). "AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma." Science (New York, N.Y.) **317**(5837): 477-477.
- Drazan, K. E., K. M. Olthoff, et al. (1996). "Adenovirus-mediated gene transfer in the transplant setting: early events after orthotopic transplantation of liver allografts expressing TGF-beta1." Transplantation **62**(8): 1080-4.
- Drobyski, W. R. and D. Majewski (1997). "Donor gamma delta T lymphocytes promote allogeneic engraftment across the major histocompatibility barrier in mice." Blood **89**(3): 1100-9.
- Du, D., S. Chang, et al. (2007). "Adenovirus-mediated heme oxygenase transfer inhibits graft arteriosclerosis in rat aortic transplants." Transplant Proc **39**(10): 3446-8.
- Duan, D., P. Sharma, et al. (1998). "Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue." Journal of Virology **72**(11): 8568-77.
- Dudler, J., J. Li, et al. (2006). "Gene transfer of programmed death ligand-1.Ig prolongs cardiac allograft survival." Transplantation **82**(12): 1733-7.
- Dudler, J., E. Simeoni, et al. (2007). "Gene transfer of interleukin-18-binding protein attenuates cardiac allograft rejection." Transpl Int **20**(5): 460-6.
- Duez, H. and B. Staels (2008). "Rev-erb alpha gives a time cue to metabolism." FEBS Letters **582**(1): 19-25.
- Dugast, A. S., T. Haudebourg, et al. (2008). "Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion." J Immunol **180**(12): 7898-906.
- Elster, E. A., H. Xu, et al. (2001). "Primate skin allotransplantation with anti-CD154 monotherapy." Transplant Proc **33**(1-2): 675-6.
- Elster, E. A., H. Xu, et al. (2001). "Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates." Transplantation **72**(9): 1473-8.
- Emambokus, N. R. and J. Frampton (2003). "The glycoprotein IIb molecule is expressed on early murine hematopoietic progenitors and regulates their numbers in sites of hematopoiesis." Immunity **19**(1): 33-45.
- Endharti, A. T., M. Rifa'i, et al. (2005). "Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **175**(11): 7093-7.
- Engelhard, V. H. (1994). "Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules." Annual Review of Immunology **12**: 181-207.
- Evans, R. L., T. J. Faldetta, et al. (1978). "Peripheral human T cells sensitized in mixed leukocyte culture synthesize and express Ia-like antigens." J Exp Med **148**(5): 1440-5.
- Fabian, D., N. Gong, et al. (2007). "The influence of inducible costimulator fusion protein (ICOSIg) gene transfer on corneal allograft survival." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **245**(10): 1515-21.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." Nature Immunology **4**(12): 1206-12.
- Fangmann, J., R. Dalchau, et al. (1992). "Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides." The Journal of experimental medicine **175**(6): 1521-9.

- Farber, J. M. (1993). "HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines." Biochem Biophys Res Commun **192**(1): 223-30.
- Faria, A. M. C. and H. L. Weiner (2006). "Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases." Clinical & Developmental Immunology **13**(2-4): 143-57.
- Federico, M. (1999). "Lentiviruses as gene delivery vectors." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 448-53.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7.
- Feng, G., W. Gao, et al. (2008). "Exogenous IFN-gamma ex vivo shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3+ regulatory T cells." Eur J Immunol **38**(9): 2512-27.
- Feng, G., K. J. Wood, et al. (2008). "Interferon-gamma conditioning ex vivo generates CD25+CD62L+Foxp3+ regulatory T cells that prevent allograft rejection: potential avenues for cellular therapy." Transplantation **86**(4): 578-89.
- Ferber, I., G. Schinrich, et al. (1994). "Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen." Science (New York, N.Y.) **263**(5147): 674-6.
- Ferber, I. A., S. Brocke, et al. (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Immunol **156**(1): 5-7.
- Ferkol, T., E. Eckman, et al. (2000). "Transport of bifunctional proteins across respiratory epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **161**(3 Pt 1): 944-51.
- Ferrant, J. L., C. D. Benjamin, et al. (2004). "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge." Int Immunol **16**(11): 1583-94.
- Ferrari, F. K., T. Samulski, et al. (1996). "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors." Journal of Virology **70**(5): 3227-34.
- Ferrera, R., D. Cuchet, et al. (2005). "Efficient and non-toxic gene transfer to cardiomyocytes using novel generation amplicon vectors derived from HSV-1." J Mol Cell Cardiol **38**(1): 219-23.
- Fields, P. A., D. W. Kowalczyk, et al. (2000). "Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX." Mol Ther **1**(3): 225-35.
- Filaci, G., M. Fravega, et al. (2004). "Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function." Human Immunology **65**(2): 142-56.
- Fischer, K., S. Voelkl, et al. (2005). "Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells." Blood **105**(7): 2828-35.
- Fisher, K. J., G. P. Gao, et al. (1996). "Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis." Journal of Virology **70**(1): 520-32.
- Fisher, K. J., K. Jooss, et al. (1997). "Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy." Nat Med **3**(3): 306-12.
- Fleury, S., J. Li, et al. (2006). "Gene transfer of RANTES and MCP-1 chemokine antagonists prolongs cardiac allograft survival." Gene Ther **13**(14): 1104-9.
- Flotte, t. R. and B. J. Carter (2001). Adeno-Associated Viral Vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations, Anthony Meager.
- Foell, J., S. Strahotin, et al. (2003). "CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice." J Clin Invest **111**(10): 1505-18.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, et al. (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." Nat Immunol **6**(11): 1142-51.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, et al. (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." Immunity **22**(3): 329-41.
- Ford McIntyre, M. S., K. J. Young, et al. (2008). "Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression." J Immunol **181**(4): 2271-5.
- Ford, M. S., K. J. Young, et al. (2002). "The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo." The Journal of Experimental Medicine **196**(2): 261-7.
- Foreman, P. K., M. J. Wainwright, et al. (1998). "Adenovirus-mediated transduction of intestinal cells in vivo." Hum Gene Ther **9**(9): 1313-21.
- Forman, D., R. M. Welsh, et al. (2002). "Viral abrogation of stem cell transplantation tolerance causes graft rejection and host death by different mechanisms." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **168**(12): 6047-56.

- Forster, I., R. Hirose, et al. (1995). "Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen." *Immunity* **2**(6): 573-85.
- Foy, T. M., A. Aruffo, et al. (1996). "Immune regulation by CD40 and its ligand GP39." *Annual Review of Immunology* **14**: 591-617.
- Foy, T. M., D. M. Shepherd, et al. (1993). "In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39." *J Exp Med* **178**(5): 1567-75.
- Freeman, G. J., A. J. Long, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." *The Journal of Experimental Medicine* **192**(7): 1027-34.
- Fudaba, Y., T. R. Spitzer, et al. (2006). "Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: in vivo and in vitro analyses." *Am J Transplant* **6**(9): 2121-33.
- Fuleihan, R., N. Ramesh, et al. (1994). "Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes." *J Clin Invest* **93**(3): 1315-20.
- Furtado, G. C., D. Olivares-Villagomez, et al. (2001). "Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis." *Immunological Reviews* **182**: 122-34.
- Gao, P., X. Y. Zhou, et al. (2003). "The unique target specificity of a nonpeptide chemokine receptor antagonist: selective blockade of two Th1 chemokine receptors CCR5 and CXCR3." *J Leukoc Biol* **73**(2): 273-80.
- Gao, W., G. Demirci, et al. (2003). "Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival." *Transplantation* **76**(6): 994-9.
- Gao, W., P. S. Topham, et al. (2000). "Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection." *J Clin Invest* **105**(1): 35-44.
- Garcia, V. E., P. A. Sieling, et al. (1997). "Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **159**(3): 1328-35.
- Gauchat, J. F., S. Henchoz, et al. (1995). "CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils." *European Journal of Immunology* **25**(3): 863-5.
- Gavin, M. A., S. R. Clarke, et al. (2002). "Homeostasis and anergy of CD4(+)/CD25(+) suppressor T cells in vivo." *Nature Immunology* **3**(1): 33-41.
- Gerosa, F., C. Paganin, et al. (1996). "Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10." *The Journal of Experimental Medicine* **183**(6): 2559-69.
- Ghanekar, A., M. Mendicino, et al. (2004). "Endothelial induction of fgl2 contributes to thrombosis during acute vascular xenograft rejection." *J Immunol* **172**(9): 5693-701.
- Gibbons, C. and M. Sykes (2008). "Manipulating the immune system for anti-tumor responses and transplant tolerance via mixed hematopoietic chimerism." *Immunol Rev* **223**: 334-60.
- Gillessen, S., D. Carvajal, et al. (1995). "Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist." *Eur J Immunol* **25**(1): 200-6.
- Girardi, M., M. A. Sherling, et al. (2003). "Anti-inflammatory effects in the skin of thymosin-beta4 splice-variants." *Immunology* **109**(1): 1-7.
- Glazko, G., V. Veeramachaneni, et al. (2005). "Eighty percent of proteins are different between humans and chimpanzees." *Gene* **346**: 215-9.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, et al. (1999). "Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5177-81.
- Goldman, M., A. Le Moine, et al. (2001). "A role for eosinophils in transplant rejection." *Trends in Immunology* **22**(5): 247-51.
- Gondek, D. C., L.-F. Lu, et al. (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **174**(4): 1783-6.
- Gong, N., U. Pleyer, et al. (2006). "Influence of local and systemic CTLA4Ig gene transfer on corneal allograft survival." *J Gene Med* **8**(4): 459-67.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2000). "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease." *Immunity* **12**(2): 171-81.
- Goulmy, E., J. W. Gratama, et al. (1983). "A minor transplantation antigen detected by MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes during graft-versus-host disease." *Nature* **302**(5904): 159-61.
- Graca, L., S. P. Cobbold, et al. (2002). "Identification of regulatory T cells in tolerated allografts." *The Journal of Experimental Medicine* **195**(12): 1641-6.

- Graca, L., K. Honey, et al. (2000). "Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance." J Immunol **165**(9): 4783-6.
- Graca, L., S. Thompson, et al. (2002). "Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **168**(11): 5558-65.
- Grammer, A. C., R. D. McFarland, et al. (1999). "Expression, regulation, and function of B cell-expressed CD154 in germinal centers." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **163**(8): 4150-9.
- Grattan, M. T., C. E. Moreno-Cabral, et al. (1989). "Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis." JAMA : the journal of the American Medical Association **261**(24): 3561-6.
- Greenwald, R. J., V. A. Boussiotis, et al. (2001). "CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo." Immunity **14**(2): 145-55.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, et al. (2005). "The B7 family revisited." Annual review of immunology **23**: 515-48.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." Annual Review of Immunology **16**: 111-35.
- Grey, S. T., C. Longo, et al. (2003). "Genetic engineering of a suboptimal islet graft with A20 preserves beta cell mass and function." J Immunol **170**(12): 6250-6.
- Griffith, T. S., H. Kazama, et al. (2007). "Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8+ T cells that produce TRAIL." J Immunol **178**(5): 2679-87.
- Grohmann, U., F. Fallarino, et al. (2001). "CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **166**(1): 277-83.
- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
- Grundemann, C., M. Bauer, et al. (2006). "Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **176**(3): 1311-5.
- Guang-Lin, M., S. Hayashi, et al. (1998). "Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4IG gene results in prolonged survival of heart allograft." Transplant Proc **30**(7): 2923-4.
- Guillonneau, C., V. Aubry, et al. (2005). "Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade." Transplantation **80**(4): 546-54.
- Guillonneau, C., V. Aubry, et al. (2005). "Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade." Transplantation **80**(2): 255-63.
- Guillonneau, C., M. Hill, et al. (2007). "CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase." The Journal of Clinical Investigation **117**(4): 1096-106.
- Guillonneau, C., C. Louvet, et al. (2004). "The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **172**(3): 1619-29.
- Guillonneau, C., C. Seveno, et al. (2007). "Anti-CD28 Antibodies Modify Regulatory Mechanisms and Reinforce Tolerance in CD40Ig-Treated Heart Allograft Recipients." J Immunol **179**(12): 8164-8171.
- Guillot, C., C. Guillonneau, et al. (2002). "Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection." J Immunol **168**(4): 1600-9.
- Guma, M., L. K. Busch, et al. (2005). "The CD94/NKG2C killer lectin-like receptor constitutes an alternative activation pathway for a subset of CD8+ T cells." Eur J Immunol **35**(7): 2071-80.
- Günzburg, W. and B. Salmons (1999). Retroviral Vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations. A. Meager, John Wiley & Sons Ltd.
- Guo, F., C. Iclozan, et al. (2008). "CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **181**(4): 2285-91.
- Guo, L., M. Fujino, et al. (2003). "Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation." Transplant immunology **12**(1): 41-8.
- Haanstra, K. G., J. Ringers, et al. (2003). "Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates." Transplantation **75**(5): 637-43.

- Haanstra, K. G., E. A. Sick, et al. (2005). "Costimulation blockade followed by a 12-week period of cyclosporine A facilitates prolonged drug-free survival of rhesus monkey kidney allografts." Transplantation **79**(11): 1623-6.
- Haanstra, K. G., E. A. Sick, et al. (2006). "No synergy between ATG induction and costimulation blockade induced kidney allograft survival in rhesus monkeys." Transplantation **82**(9): 1194-201.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, et al. (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **348**(3): 255-6.
- Hall, B. M., N. W. Pearce, et al. (1990). "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action." The Journal of Experimental Medicine **171**(1): 141-57.
- Hamilton, G., J. D. Colbert, et al. (2008). "Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis." The EMBO Journal **27**(3): 499-508.
- Han, G., H. Shao, et al. (2007). "Suppressor role of rat CD8+CD45RClow T cells in experimental autoimmune uveitis (EAU)." J Neuroimmunol **183**(1-2): 81-8.
- Hancock, W. W., R. Buelow, et al. (1998). "Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes." Nat Med **4**(12): 1392-6.
- Hancock, W. W., W. Gao, et al. (2000). "Chemokines and their receptors in allograft rejection." Curr Opin Immunol **12**(5): 511-6.
- Hancock, W. W., M. H. Sayegh, et al. (1996). "Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(24): 13967-72.
- Hanke, T. (2006). "Lessons from TGN1412." Lancet **368**(9547): 1569-70; author reply 1570.
- Hara, M., C. I. Kingsley, et al. (2001). "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **166**(6): 3789-96.
- Haspot, F., C. Seveno, et al. (2005). "Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells." Am J Transplant **5**(10): 2339-48.
- Hausen, B., J. Klupp, et al. (2001). "Coadministration of either cyclosporine or steroids with humanized monoclonal antibodies against CD80 and CD86 successfully prolong allograft survival after life supporting renal transplantation in cynomolgus monkeys." Transplantation **72**(6): 1128-37.
- Havenga, M. J. E., A. A. C. Lemckert, et al. (2002). "Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease." Journal of Virology **76**(9): 4612-20.
- Hayday, A. and R. Tigelaar (2003). "Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells." Nat Rev Immunol **3**(3): 233-42.
- He, K. M., Y. Ma, et al. (2007). "Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance." European Journal of Immunology **37**(12): 3455-66.
- Henn, V., J. R. Slupsky, et al. (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." Nature **391**(6667): 591-4.
- Henn, V., J. R. Slupsky, et al. (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." Nature **391**(6667): 591-4.
- Herman, A. E., G. J. Freeman, et al. (2004). "CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion." J Exp Med **199**(11): 1479-89.
- Hermonat, P. L. (1991). "Inhibition of H-ras expression by the adeno-associated virus Rep78 transformation suppressor gene product." Cancer Research **51**(13): 3373-7.
- Herodin, F., P. Thullier, et al. (2005). "Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology." Eur Cytokine Netw **16**(2): 104-16.
- Herold, K. C., J. Lu, et al. (1997). "Regulation of C-C chemokine production by murine T cells by CD28/B7 costimulation." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **159**(9): 4150-3.
- Higuchi, T., Y. Aiba, et al. (2002). "Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **168**(1): 9-12.
- Hiratsuka, M., B. N. Mora, et al. (1999). "Gene transfer of heat shock protein 70 protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury." Ann Thorac Surg **67**(5): 1421-7.
- Hodge, D. L., A. Martinez, et al. (2002). "Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control." Molecular and Cellular Biology **22**(6): 1742-53.
- Holtmeier, W. and D. Kabelitz (2005). "gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses." Chemical Immunology and Allergy **86**: 151-83.

- Honey, K., S. P. Cobbold, et al. (1999). "CD40 ligand blockade induces CD4+ T cell tolerance and linked suppression." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **163**(9): 4805-10.
- Hong, S., M. T. Wilson, et al. (2001). "The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice." Nature Medicine **7**(9): 1052-6.
- Hourmant, M., A. Cesbron-Gautier, et al. (2005). "Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **16**(9): 2804-12.
- Houtman, R., A. S. Koster, et al. (2001). "Integrin VLA-5: modulator and activator of mast cells." Clin Exp Allergy **31**(6): 817-22.
- Hu, B. T., S. C. Lee, et al. (1997). "Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **159**(3): 1068-71.
- Hu, D., K. Ikizawa, et al. (2004). "Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice." Nat Immunol **5**(5): 516-23.
- Huang, J., Y. Ito, et al. (2003). "Bcl-xL gene transfer protects the heart against ischemia/reperfusion injury." Biochem Biophys Res Commun **311**(1): 64-70.
- Huang, J. F., Y. Yang, et al. (1999). "TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells." Science (New York, N.Y.) **286**(5441): 952-4.
- Hunig, T. (2007). "Manipulation of regulatory T-cell number and function with CD28-specific monoclonal antibodies." Adv Immunol **95**: 111-48.
- Hunig, T. and K. Dennehy (2005). "CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential." Immunol Lett **100**(1): 21-8.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, et al. (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." Nature **397**(6716): 263-6.
- Imai, A., T. Suzuki, et al. (2007). "A novel fully human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys." Transplantation **84**(8): 1020-8.
- Imai, T., M. Nagira, et al. (1999). "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine." Int Immunol **11**(1): 81-8.
- Inwald, D. P., A. McDowall, et al. (2003). "CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation." Circulation Research **92**(9): 1041-8.
- Ito, M., T. Maruyama, et al. (2006). "Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity." The Journal of Experimental Medicine **203**(2): 289-95.
- Itoh, M., T. Takahashi, et al. (1999). "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." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **162**(9): 5317-26.
- Iwakoshi, N. N., J. P. Mordes, et al. (2000). "Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **164**(1): 512-21.
- Jameson, J., K. Ugarte, et al. (2002). "A role for skin gammadelta T cells in wound repair." Science (New York, N.Y.) **296**(5568): 747-9.
- Jarvinen, L. Z., B. R. Blazar, et al. (2003). "CD154 on the surface of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance." Transplantation **76**(9): 1375-9.
- Jayakumar, J., K. Suzuki, et al. (2001). "Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia-reperfusion injury." Circulation **104**(12 Suppl 1): I303-7.
- Jeffrey, K. L., T. Brummer, et al. (2006). "Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1." Nature Immunology **7**(3): 274-83.
- Jenkins, M. K., P. S. Taylor, et al. (1991). "CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **147**(8): 2461-6.
- Jiang, H., N. S. Braunstein, et al. (2001). "CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(11): 6301-6.
- Jiang, H., H. Kashleva, et al. (1998). "T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(8): 4533-7.

- Jiang, H., S. I. Zhang, et al. (1992). "Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." Science (New York, N.Y.) **256**(5060): 1213-5.
- Jiang, S., O. Herrera, et al. (2004). "New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance." Current opinion in immunology **16**(5): 550-7.
- Jiang, S., S. Tugulea, et al. (1998). "Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro." Human Immunology **59**(11): 690-9.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." The Journal of Experimental Medicine **192**(9): 1213-22.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." The Journal of Experimental Medicine **193**(11): 1285-94.
- Josien, R., P. Douillard, et al. (1998). "A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance." The Journal of Clinical Investigation **102**(11): 1920-6.
- Jowett, J. B., V. Planelles, et al. (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle." Journal of Virology **69**(10): 6304-13.
- Kagaya, F., J. Hori, et al. (2002). "Inhibition of murine corneal allograft rejection by treatment with antibodies to CD80 and CD86." Exp Eye Res **74**(1): 131-9.
- Kalunian, K. C., J. C. Davis, Jr., et al. (2002). "Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **46**(12): 3251-8.
- Kang, S. M., D. B. Schneider, et al. (1997). "Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction." Nat Med **3**(7): 738-43.
- Kanmaz, T., J. J. H. Fechner, et al. (2004). "Monotherapy with the novel human anti-CD154 monoclonal antibody ABI793 in rhesus monkey renal transplantation model." Transplantation **77**(6): 914-20.
- Kaplitt, M. G., A. D. Kwong, et al. (1994). "Preproenkephalin promoter yields region-specific and long-term expression in adult brain after direct in vivo gene transfer via a defective herpes simplex viral vector." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8979-83.
- Karmann, K., C. C. Hughes, et al. (1995). "CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(10): 4342-6.
- Kawai, T., D. Andrews, et al. (2000). "Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand." Nat Med **6**(2): 114.
- Kawai, T., H. Sogawa, et al. (2004). "CD154 blockade for induction of mixed chimerism and prolonged renal allograft survival in nonhuman primates." Am J Transplant **4**(9): 1391-8.
- Kawauchi, M., J. Suzuki, et al. (2000). "Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE-liposome method in mice and nonhuman primates." Circ Res **87**(11): 1063-8.
- Kay, M. A., C. N. Landen, et al. (1994). "In vivo hepatic gene therapy: complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2353-7.
- Ke, B., X. D. Shen, et al. (2004). "Gene therapy for liver transplantation using adenoviral vectors: CD40-CD154 blockade by gene transfer of CD40Ig protects rat livers from cold ischemia and reperfusion injury." Mol Ther **9**(1): 38-45.
- Ke, B., X. D. Shen, et al. (2003). "Cytoprotective and antiapoptotic effects of IL-13 in hepatic cold ischemia/reperfusion injury are heme oxygenase-1 dependent." Am J Transplant **3**(9): 1076-82.
- Kean, L. S., S. Gangappa, et al. (2006). "Transplant tolerance in non-human primates: progress, current challenges and unmet needs." Am J Transplant **6**(5 Pt 1): 884-93.
- Kenyon, N. S., M. Chatzipetrou, et al. (1999). "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(14): 8132-7.
- Khan, Q., J. M. Penninger, et al. (1999). "Regulation of apoptosis in mature alphabeta+CD4-CD8-antigen-specific suppressor T cell clones." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **162**(10): 5860-7.
- Khleif, S. N., T. Myers, et al. (1991). "Inhibition of cellular transformation by the adeno-associated virus rep gene." Virology **181**(2): 738-41.

- Kim, K. S., M. D. Denton, et al. (2001). "CD28-B7-mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection: differential role of B7-1 in initiation versus progression of graft arteriosclerosis." The American journal of pathology **158**(3): 977-86.
- King, C., S. G. Tangye, et al. (2008). "T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses." Annual Review of Immunology **26**: 741-66.
- Kingsley, C. I., M. Karim, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **168**(3): 1080-6.
- Kirk, A., S. Knechtle, et al. (2001). "Preliminary results of the use of humanized anti-CD154 in human renal allotransplantation." Am J Transplant **1**: S191.
- Kirk, A. D. (1999). "Transplantation tolerance: a look at the nonhuman primate literature in the light of modern tolerance theories." Crit Rev Immunol **19**(5-6): 349-88.
- Kirk, A. D., L. C. Burkly, et al. (1999). "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates." Nature Medicine **5**(6): 686-93.
- Kirk, A. D., D. M. Harlan, et al. (1997). "CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(16): 8789-94.
- Kirk, A. D., D. K. Tadaki, et al. (2001). "Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates." Transplantation **72**(3): 377-84.
- Kita, J., E. Kobayashi, et al. (2003). "Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-liposome method." Transpl Immunol **11**(1): 7-14.
- Kiyomoto, T., T. Ito, et al. (2005). "The potent role of graft-derived NKR-P1+TCRalpha+ T (NKT) cells in the spontaneous acceptance of rat liver allografts." Transplantation **80**(12): 1749-55.
- Klaus, G. G., M. S. Choi, et al. (1997). "CD40: a pivotal receptor in the determination of life/death decisions in B lymphocytes." International Reviews of Immunology **15**(1-2): 5-31.
- Klebe, S., D. J. Coster, et al. (2005). "Prolongation of sheep corneal allograft survival by transfer of the gene encoding ovine IL-12-p40 but not IL-4 to donor corneal endothelium." J Immunol **175**(4): 2219-26.
- Klein, J. and A. Sato (2000). "The HLA system. First of two parts." The New England Journal of Medicine **343**(10): 702-9.
- Knosalla, C., B. Gollackner, et al. (2002). "Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism revisited." Transplantation **74**(3): 416-7.
- Ko, H. S., S. M. Fu, et al. (1979). "Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells." J Exp Med **150**(2): 246-55.
- Kobie, J. J., P. R. Shah, et al. (2006). "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **177**(10): 6780-6.
- Koenen, H. J. P. M., M. T. den Hartog, et al. (2004). "A novel bispecific antihuman CD40/CD86 fusion protein with t-cell tolerizing potential." Transplantation **78**(10): 1429-38.
- Koh, D. R., W. P. Fung-Leung, et al. (1992). "Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice." Science (New York, N.Y.) **256**(5060): 1210-3.
- Konieczny, B. T., Z. Dai, et al. (1998). "IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways." J Immunol **160**(5): 2059-64.
- Kotin, R. M., M. Siniscalco, et al. (1990). "Site-specific integration by adeno-associated virus." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2211-5.
- Koyama, I., T. Kawai, et al. (2004). "Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in nonhuman primates." Transplantation **77**(3): 460-2.
- Koyama, T., L. R. Hall, et al. (1987). "Structure of a cytotoxic T-lymphocyte-specific gene shows a strong homology to fibrinogen beta and gamma chains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**(6): 1609-13.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, et al. (2002). "Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition." Nature medicine **8**(3): 233-9.
- Krieg, A. M. (1999). "Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy." J Gene Med **1**(1): 56-63.
- Kronenberg, M. (2005). "Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes." Annual Review of Immunology **23**: 877-900.

- Krummel, M. F. and J. P. Allison (1996). "CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells." The Journal of Experimental Medicine **183**(6): 2533-40.
- Kryczek, I., S. Wei, et al. (2006). "Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells." J Immunol **177**(1): 40-4.
- Kukowska-Latallo, J. F., A. U. Bielinska, et al. (1996). "Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4897-902.
- Kumanogoh, A., X. Wang, et al. (2001). "Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development." J Immunol **166**(1): 353-60.
- Kumar, V. (2004). "Homeostatic control of immunity by TCR peptide-specific Tregs." The Journal of Clinical Investigation **114**(9): 1222-6.
- Kumar, V. and E. E. Sercarz (1993). "The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4+ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease." The Journal of Experimental Medicine **178**(3): 909-16.
- Kurian, K. M., C. J. Watson, et al. (2000). "Retroviral vectors." Molecular Pathology: MP **53**(4): 173-6.
- Kuroda, M. J., J. E. Schmitz, et al. (1999). "Comparative analysis of cytotoxic T lymphocytes in lymph nodes and peripheral blood of simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys." J Virol **73**(2): 1573-9.
- Kwong, A. D. and N. Frenkel (1984). "Herpes simplex virus amplicon: effect of size on replication of constructed defective genomes containing eucaryotic DNA sequences." J Virol **51**(3): 595-603.
- Lafuse, W. P., L. Castle, et al. (1995). "The cytotoxic T lymphocyte gene FIBLP with homology to fibrinogen beta and gamma subunits is also induced in mouse macrophages by IFN-gamma." Cell Immunol **163**(2): 187-90.
- Lamb, J. R. and M. Fledmann (1982). "A human suppressor T cell clone which recognizes an autologous helper T cell clone." Nature **300**(5891): 456-8.
- Lambolez, F., M. Kronenberg, et al. (2007). "Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs." Immunological Reviews **215**: 178-88.
- Lane, P., W. Gerhard, et al. (1993). "Expression and functional properties of mouse B7/BB1 using a fusion protein between mouse CTLA4 and human gamma 1." Immunology **80**(1): 56-61.
- Langer, F., S. B. Ingersoll, et al. (2005). "The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation." Thromb Haemost **93**(6): 1137-46.
- Lanzavecchia, A., S. Abrignani, et al. (1988). "Antibodies as antigens. The use of mouse monoclonal antibodies to focus human T cells against selected targets." The Journal of Experimental Medicine **167**(2): 345-52.
- Larsen, C. P., E. T. Elwood, et al. (1996). "Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways." Nature **381**(6581): 434-8.
- Larsen, C. P., T. C. Pearson, et al. (2005). "Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties." American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **5**(3): 443-53.
- LaSalle, J. M., K. Ota, et al. (1991). "Presentation of autoantigen by human T cells." J Immunol **147**(3): 774-80.
- LaSalle, J. M., P. J. Tolentino, et al. (1992). "Early signaling defects in human T cells anergized by T cell presentation of autoantigen." J Exp Med **176**(1): 177-86.
- Latchman, Y., C. R. Wood, et al. (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." Nature Immunology **2**(3): 261-8.
- Laumonier, T., N. Potiron, et al. (2003). "CTLA4Ig adenoviral gene transfer induces long-term islet rat allograft survival, without tolerance, after systemic but not local intragraft expression." Hum Gene Ther **14**(6): 561-75.
- Le Guiner, C., K. Stieger, et al. (2007). "Immune responses to gene product of inducible promoters." Curr Gene Ther **7**(5): 334-46.
- Le Moine, A., M. Surquin, et al. (1999). "IL-5 mediates eosinophilic rejection of MHC class II-disparate skin allografts in mice." J Immunol **163**(7): 3778-84.
- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells." The Journal of experimental medicine **155**(1): 31-41.

- Lechler, R. I., M. Sykes, et al. (2005). "Organ transplantation--how much of the promise has been realized?" Nature Medicine **11**(6): 605-13.
- Lee, B. P. L., E. Mansfield, et al. (2005). "Expression profiling of murine double-negative regulatory T cells suggest mechanisms for prolonged cardiac allograft survival." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **174**(8): 4535-44.
- Lee, Y.-H., Y. Ishida, et al. (2008). "Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **180**(2): 825-32.
- LeMaoult, J., J. Caumartin, et al. (2007). "Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells." Blood **109**(5): 2040-8.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, et al. (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." Annual review of immunology **14**: 233-58.
- Lenschow, D. J., Y. Zeng, et al. (1995). "Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies." Transplantation **60**(10): 1171-8.
- Lenschow, D. J., Y. Zeng, et al. (1992). "Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig." Science (New York, N.Y.) **257**(5071): 789-92.
- Leveille, C., M. Bouillon, et al. (2007). "CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling." J Biol Chem **282**(8): 5143-51.
- Levisetti, M. G., P. A. Padrid, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation." J Immunol **159**(11): 5187-91.
- Lewis, E. C., M. Mizrahi, et al. (2008). "{alpha}1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16236-41.
- Lewis, E. C., L. Shapiro, et al. (2005). "Alpha1-antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12153-8.
- Lewis, P., M. Hensel, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle." The EMBO Journal **11**(8): 3053-8.
- Li, E., S. L. Brown, et al. (2001). "Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor." Journal of Virology **75**(11): 5405-9.
- Li, J., E. Simeoni, et al. (2006). "Gene transfer of soluble interleukin-17 receptor prolongs cardiac allograft survival in a rat model." European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery **29**(5): 779-83.
- Li, X. C., A. D. Wells, et al. (2000). "The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance." Current Opinion in Immunology **12**(5): 522-7.
- Li, Y., G. Li, et al. (2006). "Transplantation of rat islets transduced with human heme oxygenase-1 gene using adenovirus vector." Pancreas **33**(3): 280-6.
- Li, Y., X. C. Li, et al. (1999). "Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance." Nature Medicine **5**(11): 1298-302.
- Liang, B., C. Workman, et al. (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **180**(9): 5916-26.
- Lin, C.-H. and T. Hünig (2003). "Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist." European Journal of Immunology **33**(3): 626-38.
- Lin, H., S. F. Bolling, et al. (1993). "Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion." The Journal of Experimental Medicine **178**(5): 1801-6.
- Lin, W., D. Haribhai, et al. (2007). "Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3." Nature Immunology **8**(4): 359-68.
- Lindahl, K. F. and D. B. Wilson (1977). "Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors." J. Exp. Med. **145**(3): 508-522.
- Linsley, P. S., P. M. Wallace, et al. (1992). "Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule." Science (New York, N.Y.) **257**(5071): 792-5.
- Liston, A., L.-F. Lu, et al. (2008). "Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function." The Journal of Experimental Medicine **205**(9): 1993-2004.
- Liu, H., I. Shalev, et al. (2008). "The FGL2-FcgammaRIIB pathway: A novel mechanism leading to immunosuppression." Eur J Immunol **38**(11): 3114-26.
- Liu, Y., N. Chen, et al. (2007). "The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation." Transplantation Proceedings **39**(10): 3396-403.

- Liu, Z., A. I. Colovai, et al. (1996). "Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection." The Journal of clinical investigation **98**(5): 1150-7.
- Liu, Z., S. Tugulea, et al. (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." International Immunology **10**(6): 775-83.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- London, C. A., M. P. Lodge, et al. (2000). "Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **164**(1): 265-72.
- Loong, C.-C., H.-G. Hsieh, et al. (2002). "Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection." The Journal of Pathology **197**(3): 322-32.
- Louis, S., C. Braudeau, et al. (2006). "Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance." Transplantation **81**(3): 398-407.
- Ludewig, B., V. Henn, et al. (1996). "Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells." European Journal of Immunology **26**(12): 3137-43.
- Luster, A. D., S. C. Jhanwar, et al. (1987). "Interferon-inducible gene maps to a chromosomal band associated with a (4;11) translocation in acute leukemia cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2868-71.
- Macatonia, S. E., N. A. Hosken, et al. (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." J Immunol **154**(10): 5071-9.
- Mach, F., U. Schinbeck, et al. (1997). "Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(5): 1931-6.
- Maciàn, F., F. García-Cózar, et al. (2002). "Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance." Cell **109**(6): 719-31.
- MacPherson, G. G. and S. E. Christmas (1984). "The role of the macrophage in cardiac allograft rejection in the rat." Immunological Reviews **77**: 143-66.
- Madakamutil, L. T., I. Maricic, et al. (2003). "Regulatory T cells control autoimmunity in vivo by inducing apoptotic depletion of activated pathogenic lymphocytes." J Immunol **170**(6): 2985-92.
- Magnusson, M. K., S. S. Hong, et al. (2002). "Genetic retargeting of adenovirus vectors: functionality of targeting ligands and their influence on virus viability." The Journal of Gene Medicine **4**(4): 356-70.
- Mahato, R. I. (1999). "Non-viral peptide-based approaches to gene delivery." J Drug Target **7**(4): 249-68.
- Mahato, R. I., Y. Takakura, et al. (1997). "Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **14**(2): 133-72.
- Malan Borel, I., A. Racca, et al. (2003). "Gammadelta T cells and interleukin-6 levels could provide information regarding the progression of human renal allograft." Scandinavian Journal of Immunology **58**(1): 99-105.
- Manavalan, J. S., S. Kim-Schulze, et al. (2004). "Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity." International Immunology **16**(8): 1055-68.
- Manavalan, J. S., P. C. Rossi, et al. (2003). "High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells." Transplant Immunology **11**(3-4): 245-58.
- Manoury-Schwartz, B., G. Chiochia, et al. (1997). "High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors." J Immunol **158**(11): 5501-6.
- Marazzi, S., S. Blum, et al. (1998). "Characterization of human fibroleukin, a fibrinogen-like protein secreted by T lymphocytes." J Immunol **161**(1): 138-47.
- Marconi, P., M. Simonato, et al. (1999). "Replication-defective herpes simplex virus vectors for neurotrophic factor gene transfer in vitro and in vivo." Gene Ther **6**(5): 904-12.
- Markees, T. G., N. E. Phillips, et al. (1998). "Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4." The Journal of Clinical Investigation **101**(11): 2446-55.
- Markees, T. G., N. E. Phillips, et al. (1997). "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand." Transplantation **64**(2): 329-35.
- Marra, L. E., Z. X. Zhang, et al. (2004). "IL-10 induces regulatory T cell apoptosis by up-regulation of the membrane form of TNF-alpha." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **172**(2): 1028-35.

- Marsh, S. G. E., E. D. Albert, et al. (2005). "Nomenclature for factors of the HLA system, 2004." Tissue Antigens **65**(4): 301-69.
- Marski, M., S. Kandula, et al. (2005). "CD18 is required for optimal development and function of CD4+CD25+ T regulatory cells." J Immunol **175**(12): 7889-97.
- Martin, E., B. O'Sullivan, et al. (2003). "Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10." Immunity **18**(1): 155-67.
- Mashimo, T., D. Simon-Chazottes, et al. (2008). "Innate resistance to flavivirus infections and the functions of 2'-5' oligoadenylate synthetases." Curr Top Microbiol Immunol **321**: 85-100.
- Masunaga, T., K. Yamashita, et al. (2005). "Dimeric but not monomeric soluble CD40 prolongs allograft survival and generates regulatory T cells that inhibit CTL function." Transplantation **80**(11): 1614-22.
- Matsuo, R., D. N. Herndon, et al. (1997). "CD4- CD8- TCR alpha/beta+ suppressor T cells demonstrated in mice 1 day after thermal injury." The Journal of Trauma **42**(4): 635-40.
- McAdam, A. J., T. T. Chang, et al. (2000). "Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **165**(9): 5035-40.
- McAdam, A. J., A. N. Schweitzer, et al. (1998). "The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells." Immunological reviews **165**: 231-47.
- McConnell, M. J. and M. J. Imperiale (2004). "Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy." Hum Gene Ther **15**(11): 1022-33.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." Immunity **16**(2): 311-23.
- McLellan, A. D., R. V. Sorg, et al. (1996). "Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway." European Journal of Immunology **26**(6): 1204-10.
- McTaggart, S. and M. Al-Rubeai (2002). "Retroviral vectors for human gene delivery." Biotechnol Adv **20**(1): 1-31.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nature Reviews. Immunology **4**(10): 762-74.
- Mestries, J. C., E. K. Kruihof, et al. (1994). "In vivo modulation of coagulation and fibrinolysis by recombinant glycosylated human interleukin-6 in baboons." Eur Cytokine Netw **5**(3): 275-81.
- Metzler, B., P. Gfeller, et al. (2004). "Combinations of anti-LFA-1, everolimus, anti-CD40 ligand, and allogeneic bone marrow induce central transplantation tolerance through hemopoietic chimerism, including protection from chronic heart allograft rejection." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) **173**(11): 7025-36.
- Miao, C. H., R. O. Snyder, et al. (1998). "The kinetics of rAAV integration in the liver." Nat Genet **19**(1): 13-5.
- Miller, D. G., L. M. Petek, et al. (2004). "Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites." Nature Genetics **36**(7): 767-73.
- Miller, D. G., E. A. Rutledge, et al. (2002). "Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration." Nature Genetics **30**(2): 147-8.
- Mingari, M. C., F. Schiavetti, et al. (1996). "Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12433-8.
- Mirabet, M., J. A. Barrabes, et al. (2008). "Platelet pro-aggregatory effects of CD40L monoclonal antibody." Mol Immunol **45**(4): 937-44.
- Mirza, N. and D. Gabrilovich (2007). "Comment on "Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells"." J Immunol **178**(8): 4705-6; author reply 4706.
- Mislick, K. A. and J. D. Baldeschwieler (1996). "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12349-54.
- Mitchison, N. A. (2004). "T-cell-B-cell cooperation." Nat Rev Immunol **4**(4): 308-12.
- Miyamoto, T., T. Kaneko, et al. (2005). "Prolonged skin allograft survival by IL-10 gene-introduced CD4 T cell administration." Int Immunol **17**(6): 759-68.
- Miyara, M. and S. Sakaguchi (2007). "Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression." Trends in Molecular Medicine **13**(3): 108-16.
- Mizutani, K., L. Shibata, et al. (2006). "Detection of HLA and MICA antibodies before kidney graft failure." Clinical transplants: 255-64.

- Mohan, K., E. Cordeiro, et al. (2005). "CXCR3 is required for migration to dermal inflammation by normal and in vivo activated T cells: differential requirements by CD4 and CD8 memory subsets." *Eur J Immunol* **35**(6): 1702-11.
- Moisan, M. P., C. R. Edwards, et al. (1992). "Ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and kidney." *Endocrinology* **130**(1): 400-4.
- Monk, N. J., R. E. Hargreaves, et al. (2003). "Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade." *Nat Med* **9**(10): 1275-80.
- Monk, N. J., R. E. G. Hargreaves, et al. (2003). "Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade." *Nature Medicine* **9**(10): 1275-80.
- Montgomery, S. P., H. Xu, et al. (2002). "Combination induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80, CD86, and CD154 in nonhuman primate renal transplantation." *Transplantation* **74**(10): 1365-9.
- Mordenti, J. (1986). "Dosage regimen design for pharmaceutical studies conducted in animals." *J Pharm Sci* **75**(9): 852-7.
- Moreira, A. P., K. A. Cavassani, et al. (2008). "CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression." *J Immunol* **180**(5): 3049-56.
- Moser, M. (2003). "Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?" *Immunity* **19**(1): 5-8.
- Mullen, J. T. and K. K. Tanabe (2002). "Viral oncolysis." *Oncologist* **7**(2): 106-19.
- Muller, L., O. Saydam, et al. (2005). "Gene transfer into hepatocytes mediated by herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons." *J Virol Methods* **123**(1): 65-72.
- Murphy, C. A., C. L. Langrish, et al. (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." *J Exp Med* **193**(12): 1951-7.
- Nagata, S. and T. Suda (1995). "Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations." *Immunol Today* **16**(1): 39-43.
- Najafian, N., T. Chitnis, et al. (2003). "Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model." *The Journal of Clinical Investigation* **112**(7): 1037-48.
- Nakai, H., E. Montini, et al. (2003). "AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice." *Nature Genetics* **34**(3): 297-302.
- Nakai, H., T. A. Storm, et al. (2000). "Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo." *Journal of Virology* **74**(20): 9451-63.
- Nakai, H., S. R. Yant, et al. (2001). "Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo." *J Virol* **75**(15): 6969-76.
- Nandi, D., J. A. Gross, et al. (1994). "CD28-mediated costimulation is necessary for optimal proliferation of murine NK cells." *J Immunol* **152**(7): 3361-9.
- Nashan, B., R. Moore, et al. (1997). "Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group." *Lancet* **350**(9086): 1193-8.
- Nelson, P. N., P. R. Carnegie, et al. (2003). "Demystified. Human endogenous retroviruses." *Molecular Pathology: MP* **56**(1): 11-8.
- Nguyen, D. H., N. Hurtado-Ziola, et al. (2006). "Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(20): 7765-70.
- Ning, Q., Y. Sun, et al. (2005). "Role of fibrinogen-like protein 2 prothrombinase/fibroleukin in experimental and human allograft rejection." *J Immunol* **174**(11): 7403-11.
- Nishimura, Y., A. Ishii, et al. (1995). "Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells." *J Immunol* **154**(9): 4395-403.
- Nomura, M., K. Yamashita, et al. (2002). "Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD40lg gene therapy in rat liver transplantation." *Transplantation* **73**(9): 1403-10.
- Ody, C., C. Corbel, et al. (2001). "MHC class II beta-chain and alpha11bbeta3 integrin are expressed on T-cell progenitors in embryonic bone marrow." *Mol Immunol* **38**(1): 45-53.
- Oh, K., S. Kim, et al. (2005). "Direct regulatory role of NKT cells in allogeneic graft survival is dependent on the quantitative strength of antigenicity." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **174**(4): 2030-6.
- Ohresser, M., D. Olive, et al. (2006). "Risk in drug trials." *Lancet* **368**(9554): 2205-6.
- Okada, Y., X. J. Zuo, et al. (2006). "Adenovirus mediated IL-10 gene transfer to the airway of the rat lung for prevention of lung allograft rejection." *Transpl Immunol* **16**(2): 95-8.

- Olthoff, K. M., T. A. Judge, et al. (1998). "Adenovirus-mediated gene transfer into cold-preserved liver allografts: survival pattern and unresponsiveness following transduction with CTLA4Ig." Nat Med **4**(2): 194-200.
- Ono, K. and E. S. Lindsey (1969). "Improved technique of heart transplantation in rats." J Thorac Cardiovasc Surg **57**(2): 225-9.
- Ossevoort, M. A., K. Lorre, et al. (1999). "Prolonged skin graft survival by administration of anti-CD80 monoclonal antibody with cyclosporin A." J Immunother **22**(5): 381-9.
- Ossevoort, M. A., J. Ringers, et al. (1999). "Prevention of renal allograft rejection in primates by blocking the B7/CD28 pathway." Transplantation **68**(7): 1010-8.
- Ozawa, K. (2007). "[Gene therapy using AAV]." Uirusu **57**(1): 47-55.
- Ozkaynak, E., W. Gao, et al. (2001). "Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection." Nature Immunology **2**(7): 591-6.
- Ozkaynak, E., L. Wang, et al. (2002). "Programmed death-1 targeting can promote allograft survival." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **169**(11): 6546-53.
- Palmer, D. J. and P. Ng (2005). "Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy." Human Gene Therapy **16**(1): 1-16.
- Pamer, E. and P. Cresswell (1998). "Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing." Annual Review of Immunology **16**: 323-58.
- Pandiyan, P., L. Zheng, et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nature Immunology **8**(12): 1353-62.
- Panoutsakopoulou, V., K. M. Huster, et al. (2004). "Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes." The Journal of Clinical Investigation **113**(8): 1218-24.
- Pantenburg, B., F. Heinzl, et al. (2002). "T cells primed by Leishmania major infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) **169**(7): 3686-93.
- Parham, P. (2003). "Immunogenetics of killer-cell immunoglobulin-like receptors." Tissue Antigens **62**(3): 194-200.
- Parker, D. C., D. L. Greiner, et al. (1995). "Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(21): 9560-4.
- Pearl, J. P., H. Xu, et al. (2007). "CD154 blockade, sirolimus, and donor-specific transfusion prevents renal allograft rejection in cynomolgus monkeys despite homeostatic T-cell activation." Transplantation **83**(9): 1219-25.
- Pearson, T. C., J. Trambley, et al. (2002). "Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques." Transplantation **74**(7): 933-40.
- Penaud-Budloo, M., C. Le Guiner, et al. (2008). "Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle." J Virol **82**(16): 7875-85.
- Peng, G., H. Y. Wang, et al. (2007). "Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway." Immunity **27**(2): 334-48.
- Peng, S. L., M. P. Madaio, et al. (1996). "Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) **157**(12): 5689-98.
- Pereira, D. J. and N. Muzyczka (1997). "The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate Rep protein activation of the adeno-associated virus p19 promoter." Journal of Virology **71**(3): 1747-56.
- Pfeiffer, S., G. L. Iii, et al. (2001). "Monotherapy with anti-CD40 ligand antibody (IDEC 131) for non-human primate allograft heart transplantation." J Heart Lung Transplant **20**(2): 250.
- Pfoertner, S., A. Jeron, et al. (2006). "Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players." Genome Biology **7**(7): R54-R54.
- Pierson, R. N., 3rd, A. C. Chang, et al. (1999). "Prolongation of primate cardiac allograft survival by treatment with ANTI-CD40 ligand (CD154) antibody." Transplantation **68**(11): 1800-5.
- Pierson, R. N., 3rd, J. E. Crowe, Jr., et al. (2001). "CD40-ligand in primate cardiac allograft and viral immunity." Immunol Res **23**(2-3): 253-62.
- Popov, A., Z. Abdullah, et al. (2006). "Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following Listeria monocytogenes infection." The Journal of Clinical Investigation **116**(12): 3160-70.
- Porter, K. A. (1965). "Morphological Aspects of Renal Homograft Rejection." British medical bulletin **21**: 171-5.

- Poston, R. S., M. J. Mann, et al. (1999). "Antisense oligodeoxynucleotides prevent acute cardiac allograft rejection via a novel, nontoxic, highly efficient transfection method." Transplantation **68**(6): 825-32.
- Potiron, N., C. Chagneau, et al. (2005). "Adenovirus-mediated CTLA4Ig or CD40Ig gene transfer delays pancreatic islet rejection in a rat-to-mouse xenotransplantation model after systemic but not local expression." Cell Transplant **14**(5): 263-75.
- Poussier, P., T. Ning, et al. (2002). "A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity." The Journal of Experimental Medicine **195**(11): 1491-7.
- Prasad, D. V. R., T. Nguyen, et al. (2004). "Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) **173**(4): 2500-6.
- Prasad, D. V. R., S. Richards, et al. (2003). "B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation." Immunity **18**(6): 863-73.
- Preston, E. H., H. Xu, et al. (2005). "IDEC-131 (anti-CD154), sirolimus and donor-specific transfusion facilitate operational tolerance in non-human primates." American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **5**(5): 1032-41.
- Prilliman, K., D. Lawlor, et al. (1996). "Characterization of baboon class I major histocompatibility molecules. Implications for baboon-to-human xenotransplantation." Transplantation **61**(7): 989-96.
- Qin, L., K. D. Chavin, et al. (1995). "Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Immunosuppression with TGF-beta 1 or vIL-10." Transplantation **59**(6): 809-16.
- Qin, L., K. D. Chavin, et al. (1996). "Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival." J Immunol **156**(6): 2316-23.
- Qin, L., Y. Ding, et al. (1996). "Gene transfer of transforming growth factor-beta 1 prolongs murine cardiac allograft survival by inhibiting cell-mediated immunity." Hum Gene Ther **7**(16): 1981-8.
- Randall, T. D., A. W. Heath, et al. (1998). "Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers." Immunity **8**(6): 733-42.
- Ranheim, E. A. and T. J. Kipps (1993). "Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal." The Journal of Experimental Medicine **177**(4): 925-35.
- Ranheim, E. A. and T. J. Kipps (1995). "Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD54 on human B cells by activated T cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L." Cellular Immunology **161**(2): 226-35.
- Rasmuson, I. (2006). "Immune modulation by mesenchymal stem cells." Exp Cell Res **312**(12): 2169-79.
- Rehman, K. K., S. Bertera, et al. (2007). "Immunomodulation by adenoviral-mediated SCD40-Ig gene therapy for mouse allogeneic islet transplantation." Transplantation **84**(3): 301-7.
- Reinwald, S., C. Wiethe, et al. (2008). "CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) **180**(9): 5890-7.
- Rifa'i, M., Y. Kawamoto, et al. (2004). "Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis." The Journal of Experimental Medicine **200**(9): 1123-34.
- Rifa'i, M., Z. Shi, et al. (2008). "CD8+CD122+ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I-alpha-betaTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells." International Immunology **20**(7): 937-47.
- Ritter, T., G. Schroder, et al. (2000). "Ischemia/reperfusion injury-mediated down-regulation of adenovirus-mediated gene expression in a rat heart transplantation model is inhibited by co-application of a TNFRp55-Ig chimeric construct." Gene Ther **7**(14): 1238-43.
- Ritter, T., J. Yang, et al. (2007). "Effects of interleukin-12p40 gene transfer on rat corneal allograft survival." Transpl Immunol **18**(2): 101-7.
- Rivera, V. M., G.-p. Gao, et al. (2005). "Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer 10.1182/blood-2004-06-2501." Blood **105**(4): 1424-1430.
- Robinson, C. M., K. A. Shirey, et al. (2003). "Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha." J Interferon Cytokine Res **23**(8): 413-21.
- Rocha, B., P. Vassalli, et al. (1991). "The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation." The Journal of Experimental Medicine **173**(2): 483-6.

- Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, et al. (2001). "Type 1 T regulatory cells." Immunological Reviews **182**: 68-79.
- Rosengard, B. R., C. A. Ojikutu, et al. (1992). "Selective breeding of miniature swine leads to an increased rate of acceptance of MHC-identical, but not of class I-disparate, renal allografts." J Immunol **149**(3): 1099-103.
- Rothman, S., H. Tseng, et al. (2005). "Oral gene therapy: a novel method for the manufacture and delivery of protein drugs." Diabetes Technol Ther **7**(3): 549-57.
- Rothstein, D. M., M. F. Livak, et al. (2001). "Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **166**(1): 322-9.
- Rothstein, D. M. and M. H. Sayegh (2003). "T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance." Immunol Rev **196**: 85-108.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, et al. (1953). "Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) **84**(3): 570-3.
- Rulifson, I. C., A. I. Sperling, et al. (1997). "CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **158**(2): 658-65.
- Saadi, S., R. A. Holzknecht, et al. (1995). "Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium." The Journal of experimental medicine **182**(6): 1807-14.
- Saitoh, O., N. Abiru, et al. (2007). "CD8+CD122+ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model." Endocrinology **148**(12): 6040-6.
- Salama, A. D., X. Yuan, et al. (2003). "Interaction between ICOS-B7RP1 and B7-CD28 costimulatory pathways in alloimmune responses in vivo." American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **3**(4): 390-5.
- Sallusto, F., C. R. Mackay, et al. (1997). "Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells." Science **277**(5334): 2005-7.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." Immunity **12**(4): 431-40.
- Salone, B., Y. Martina, et al. (2003). "Integrin alpha3beta1 is an alternative cellular receptor for adenovirus serotype 5." Journal of Virology **77**(24): 13448-54.
- Salveti, A., S. Orave, et al. (1998). "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production." Human Gene Therapy **9**(5): 695-706.
- Samaniego, L. A., N. Wu, et al. (1997). "The herpes simplex virus immediate-early protein ICP0 affects transcription from the viral genome and infected-cell survival in the absence of ICP4 and ICP27." J Virol **71**(6): 4614-25.
- Sanchez-Fueyo, A., C. Domenig, et al. (2002). "The complement dependent cytotoxicity (CDC) immune effector mechanism contributes to anti-CD154 induced immunosuppression." Transplantation **74**(6): 898-900.
- Sánchez-Fueyo, A., M. Weber, et al. (2002). "Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **168**(5): 2274-81.
- Sanders, D. A. (2002). "No false start for novel pseudotyped vectors." Curr Opin Biotechnol **13**(5): 437-42.
- Sandner, S. E., M. R. Clarkson, et al. (2005). "Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **174**(6): 3408-15.
- Sawitzki, B., C. I. Kingsley, et al. (2005). "IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo." J Exp Med **201**(12): 1925-35.
- Schebesch, C., V. Kodelja, et al. (1997). "Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro." Immunology **92**(4): 478-86.
- Scheipers, P. and H. Reiser (1998). "Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(17): 10083-8.
- Schuler, W., M. Bigaud, et al. (2004). "Efficacy and safety of ABI793, a novel human anti-human CD154 monoclonal antibody, in cynomolgus monkey renal allotransplantation." Transplantation **77**(5): 717-26.

- Schultz, B. R. and J. S. Chamberlain (2008). "Recombinant adeno-associated virus transduction and integration." *Mol Ther* **16**(7): 1189-99.
- Schwartz, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." *Science (New York, N.Y.)* **248**(4961): 1349-56.
- Schwartz, R. H. (1996). "Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?" *The Journal of Experimental Medicine* **184**(1): 1-8.
- Schweitzer, A. N. and A. H. Sharpe (1998). "Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **161**(6): 2762-71.
- Scully, R., S. P. Cobbold, et al. (1997). "A role for Th2 cytokines in the suppression of CD8+ T cell-mediated graft rejection." *European Journal of Immunology* **27**(7): 1663-70.
- Sedy, J. R., M. Gavieli, et al. (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." *Nature immunology* **6**(1): 90-8.
- Seino, K. I., K. Fukao, et al. (2001). "Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(5): 2577-81.
- Senolt, L., M. Grigorian, et al. (2006). "S100A4 (Mts1): is there any relation to the pathogenesis of rheumatoid arthritis?" *Autoimmun Rev* **5**(2): 129-31.
- Seo, S., M. Ichikawa, et al. (2006). "Structure and function of cas-L and integrin-mediated signaling." *Crit Rev Immunol* **26**(5): 391-406.
- Seo, S. K., J. H. Choi, et al. (2004). "4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis." *Nature Medicine* **10**(10): 1088-94.
- Shalev, I., H. Liu, et al. (2008). "Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**(1): 249-60.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nature reviews. Immunology* **2**(2): 116-26.
- Shears, L. L., N. Kawaharada, et al. (1997). "Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis." *J Clin Invest* **100**(8): 2035-42.
- Shendure, J. (2008). "The beginning of the end for microarrays?" *Nat Methods* **5**(7): 585-7.
- Shestopalov, I. A. and J. K. Chen (2008). "Chemical technologies for probing embryonic development." *Chem Soc Rev* **37**(7): 1294-307.
- Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, et al. (2006). "The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells." *Immunological Reviews* **212**: 60-73.
- Shi, Y., E. Seto, et al. (1991). "Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein." *Cell* **67**(2): 377-88.
- Shi, Z., M. Rifa'i, et al. (2008). "Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8+CD122+ regulatory T cells." *Immunology* **124**(1): 121-8.
- Shiao, S. L., J. M. McNiff, et al. (2007). "Immunomodulatory properties of FK734, a humanized anti-CD28 monoclonal antibody with agonistic and antagonistic activities." *Transplantation* **83**(3): 304-13.
- Shimotohno, K. and H. M. Temin (1982). "Loss of intervening sequences in genomic mouse alpha-globin DNA inserted in an infectious retrovirus vector." *Nature* **299**(5880): 265-8.
- Shin, S., R. El-Diwany, et al. (2005). "Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors." *Science (New York, N.Y.)* **308**(5719): 252-5.
- Shirasugi, N., A. B. Adams, et al. (2002). "Prevention of chronic rejection in murine cardiac allografts: a comparison of chimerism- and nonchimerism-inducing costimulation blockade-based tolerance induction regimens." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**(5): 2677-84.
- Shirwan, H. (1999). "Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role?" *Transplantation* **68**(6): 715-26.
- Sica, G. L., I. H. Choi, et al. (2003). "B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity." *Immunity* **18**(6): 849-61.
- Simeoni, E., J. Dudler, et al. (2007). "Gene transfer of a soluble IL-1 type 2 receptor-Ig fusion protein improves cardiac allograft survival in rats." *Eur J Cardiothorac Surg* **31**(2): 222-8.
- Sindhi, R., J. S. Manavalan, et al. (2005). "Reduced immunosuppression in pediatric liver-intestine transplant recipients with CD8+CD28- T-suppressor cells." *Human Immunology* **66**(3): 252-7.
- Singer, G. G. and A. K. Abbas (1994). "The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice." *Immunity* **1**(5): 365-71.

- Sloan-Lancaster, J., T. H. Steinberg, et al. (1996). "Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands." The Journal of Experimental Medicine **184**(4): 1525-30.
- Smith, K. A. (1988). "Interleukin-2: inception, impact, and implications." Science **240**(4856): 1169-76.
- Smith, R. H. and R. M. Kotin (2000). "An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA." Journal of Virology **74**(7): 3122-9.
- Snyder, R. O., S. K. Spratt, et al. (1997). "Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice." Human Gene Therapy **8**(16): 1891-900.
- Song, S., J. Embury, et al. (2001). "Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors." Gene Ther **8**(17): 1299-306.
- Song, S., K. Goudy, et al. (2004). "Recombinant adeno-associated virus-mediated alpha-1 antitrypsin gene therapy prevents type I diabetes in NOD mice." Gene Ther **11**(2): 181-6.
- Song, S., M. Scott-Jorgensen, et al. (2002). "Intramuscular administration of recombinant adeno-associated virus 2 alpha-1 antitrypsin (rAAV-SERPINA1) vectors in a nonhuman primate model: safety and immunologic aspects." Mol Ther **6**(3): 329-35.
- Sonntag, K. C., D. W. Emery, et al. (2001). "Tolerance to solid organ transplants through transfer of MHC class II genes." J Clin Invest **107**(1): 65-71.
- Sonoda, K.-H., M. Taniguchi, et al. (2002). "Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **168**(4): 2028-34.
- Southern, E. M. (1974). "An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose." Anal Biochem **62**(1): 317-8.
- Spinozzi, F., E. Agea, et al. (1995). "Local expansion of allergen-specific CD30+Th2-type gamma delta T cells in bronchial asthma." Molecular Medicine (Cambridge, Mass.) **1**(7): 821-6.
- Stalder, T., S. Hahn, et al. (1994). "Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **152**(3): 1127-33.
- Stassen, M., S. Fondel, et al. (2004). "Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells." European Journal of Immunology **34**(5): 1303-11.
- Stassen, M., S. Fondel, et al. (2004). "Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells." Eur J Immunol **34**(5): 1303-11.
- Steimle, V., C. A. Siegrist, et al. (1994). "Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA." Science **265**(5168): 106-9.
- Stephens, L. A. and D. Mason (2000). "CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **165**(6): 3105-10.
- Strauss, S. E. (1984). Adenovirus infections in humans. The Adenoviruses, Plenum Press: 451?496-451?496.
- Su, L. T., K. Gopal, et al. (2005). "Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector." Circulation **112**(12): 1780-8.
- Sugimoto, N., T. Oida, et al. (2006). "Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis." International Immunology **18**(8): 1197-209.
- Suh, W.-K., B. U. Gajewska, et al. (2003). "The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses." Nature Immunology **4**(9): 899-906.
- Suh, W. K., B. U. Gajewska, et al. (2003). "The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses." Nat Immunol **4**(9): 899-906.
- Sumida, S. M., D. M. Truitt, et al. (2004). "Neutralizing antibodies and CD8+ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors." J Virol **78**(6): 2666-73.
- Sun, M., S. Richards, et al. (2002). "Characterization of mouse and human B7-H3 genes." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **168**(12): 6294-7.
- Sun, Y., H. M. Chen, et al. (2002). "Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease." Nat Med **8**(12): 1405-13.
- Sun, Y., X. Lin, et al. (2002). "Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **168**(3): 1457-65.
- Sun, Y., S. K. Subudhi, et al. (2003). "Co-stimulation agonists as a new immunotherapy for autoimmune diseases." Trends Mol Med **9**(11): 483-9.

- Suntharalingam, G., M. R. Perry, et al. (2006). "Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412." The New England Journal of Medicine **355**(10): 1018-28.
- Surosky, R. T., M. Urabe, et al. (1997). "Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome." Journal of Virology **71**(10): 7951-9.
- Suzuki, H., T. M. KÅndig, et al. (1995). "Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta." Science (New York, N.Y.) **268**(5216): 1472-6.
- Suzuki, J., M. Isobe, et al. (2000). "Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts." Cardiovasc Res **45**(3): 783-7.
- Suzuki, N., M. Ichino, et al. (1998). "Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **41**(2): 344-53.
- Swain, S. L., A. D. Weinberg, et al. (1990). "IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **145**(11): 3796-806.
- Swallow, M. M., J. J. Wallin, et al. (1999). "B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha." Immunity **11**(4): 423-32.
- Swenson, K. M., B. Ke, et al. (1998). "Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats: effects on allograft survival." Transplantation **65**(2): 155-60.
- Swiatek-de Lange, M., W. Rist, et al. (2008). "Comment on "MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells"." J Immunol **180**(6): 3625; author reply 3626.
- Sykes, M., D. H. Sachs, et al. (1993). "Specific prolongation of skin graft survival following retroviral transduction of bone marrow with an allogeneic major histocompatibility complex gene." Transplantation **55**(1): 197-202.
- Taams, L. S., E. P. Boot, et al. (2000). "'Anergic' T cells modulate the T-cell activating capacity of antigen-presenting cells." Journal of Autoimmunity **14**(4): 335-41.
- Tabin, C. J., J. W. Hoffmann, et al. (1982). "Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene." Molecular and Cellular Biology **2**(4): 426-36.
- Tafari, A., A. Shahinian, et al. (2001). "ICOS is essential for effective T-helper-cell responses." Nature **409**(6816): 105-9.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." The Journal of Experimental Medicine **192**(2): 303-10.
- Tanaka, K., M. J. Albin, et al. (2007). "PDL1 is required for peripheral transplantation tolerance and protection from chronic allograft rejection." J Immunol **179**(8): 5204-10.
- Tang, J. L., V. M. Subbotin, et al. (2001). "Interleukin-17 antagonism inhibits acute but not chronic vascular rejection." Transplantation **72**(2): 348-50.
- Tang, Q. and J. A. Bluestone (2008). "The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." Nature Immunology **9**(3): 239-44.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, et al. (2003). "Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **171**(7): 3348-52.
- Tang, X., I. Maricic, et al. (2007). "Anti-TCR antibody treatment activates a novel population of nonintestinal CD8 alpha alpha+ TCR alpha beta+ regulatory T cells and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **178**(10): 6043-50.
- Tang, X., I. Maricic, et al. (2006). "Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **177**(11): 7645-55.
- Taylor, P. A., C. J. Lees, et al. (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." Blood **99**(10): 3493-9.
- Taylor, P. A., R. J. Noelle, et al. (2001). "CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade." J Exp Med **193**(11): 1311-8.
- Terabe, M., S. Matsui, et al. (2000). "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway." Nature Immunology **1**(6): 515-20.
- Terasaki, P. I. and M. Ozawa (2005). "Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial." Transplantation **80**(9): 1194-7.
- They, C., L. Duban, et al. (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." Nat Immunol **3**(12): 1156-62.

- Thomas, M. and A. M. Klibanov (2003). "Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery." Appl Microbiol Biotechnol **62**(1): 27-34.
- Toyofuku, A., Y. Yasunami, et al. (2006). "Natural killer T-cells participate in rejection of islet allografts in the liver of mice." Diabetes **55**(1): 34-9.
- Trono, D. (2003). "Virology. Picking the right spot." Science (New York, N.Y.) **300**(5626): 1670-1.
- Tsai, M.-K., H.-N. Ho, et al. (2004). "The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis." Transplantation **77**(1): 48-54.
- Tsang, J. Y. S., J. G. Chai, et al. (2003). "Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion?" Blood **101**(7): 2704-10.
- Tsui, T. Y., X. Wu, et al. (2003). "Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer." Circulation **107**(20): 2623-9.
- Valujskikh, A., B. Pantenburg, et al. (2002). "Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice." American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **2**(6): 501-9.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." Journal of Leukocyte Biology **67**(1): 2-17.
- van Rijen, M. M. L., M. L. Kuijf, et al. (2002). "CD154 is expressed during treatment with calcineurin inhibitors after organ transplantation." Transplantation **73**(10): 1666-72.
- VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, et al. (2000). "Human allograft acceptance is associated with immune regulation." The Journal of Clinical Investigation **106**(1): 145-55.
- VanBuskirk, A. M., M. E. Wakely, et al. (1996). "Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection." Transplantation **62**(2): 229-38.
- Vanhove, B., G. Laflamme, et al. (2003). "Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody." Blood **102**(2): 564-70.
- Vassalli, G., E. Simeoni, et al. (2006). "Lentiviral gene transfer of the chemokine antagonist RANTES 9-68 prolongs heart graft survival." Transplantation **81**(2): 240-6.
- Veldhoen, M. and B. Stockinger (2006). "TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells." Trends Immunol **27**(8): 358-61.
- Venuprasad, K., P. Parab, et al. (2001). "Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression." European journal of immunology **31**(5): 1536-43.
- Verma, N., X. Y. He, et al. (2001). "Interleukin 12 delays allograft rejection: effect mediated via nitric oxide." Transplant Proc **33**(1-2): 416-7.
- Vermeire, K., H. Heremans, et al. (1997). "Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice." J Immunol **158**(11): 5507-13.
- Vierboom, M. P., M. Ossevoort, et al. (2003). "Induction of allograft tolerance through costimulatory blockade: first selection of drugs in vitro." Transpl Immunol **11**(2): 215-22.
- Vignali, D. (2008). "How many mechanisms do regulatory T cells need?" European Journal of Immunology **38**(4): 908-11.
- Villinger, F., S. S. Brar, et al. (1995). "Comparative sequence analysis of cytokine genes from human and nonhuman primates." J Immunol **155**(8): 3946-54.
- Vincenti, F. and A. D. Kirk (2008). "What's next in the pipeline." Am J Transplant **8**(10): 1972-81.
- Vincenti, F., R. Kirkman, et al. (1998). "Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group." The New England Journal of Medicine **338**(3): 161-5.
- Vodanovic-Jankovic, S. and W. R. Drobyski (2006). "?? T CELLS DO NOT REQUIRE FULLY FUNCTIONAL CYTOTOXIC PATHWAYS OR THE ABILITY TO RECOGNIZE RECIPIENT ALLOANTIGENS IN ORDER TO PREVENT GRAFT REJECTION." Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation **12**(11): 1125?1134-1125?1134.
- Voisset, C. and M. Andrawiss (2000). "Retroviruses at a glance." Genome Biology **1**(3): 4015.1.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nature Immunology **6**(4): 338-44.
- von der Leyen, H. E., G. H. Gibbons, et al. (1995). "Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1137-41.

- Waibler, Z., L. Y. Sender, et al. (2008). "Signaling signatures and functional properties of anti-human CD28 superagonistic antibodies." *PLoS ONE* **3**(3): e1708.
- Wakkach, A., N. Fournier, et al. (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." *Immunity* **18**(5): 605-17.
- Walker, L. S. and A. K. Abbas (2002). "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery." *Nat Rev Immunol* **2**(1): 11-9.
- Walker, W., M. Aste-Amezaga, et al. (1999). "IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **162**(10): 5894-901.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker, et al. (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." *The Journal of Experimental Medicine* **183**(6): 2541-50.
- Wan, B., H. Nie, et al. (2006). "Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis." *J Immunol* **177**(12): 8844-50.
- Wang, J., J. Xie, et al. (2007). "Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(32): 13104-9.
- Wang, L., A. Kamath, et al. (2001). "Antibacterial effect of human V gamma 2V delta 2 T cells in vivo." *The Journal of Clinical Investigation* **108**(9): 1349-57.
- Wang, L., K. Pino-Lagos, et al. (2008). "Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(27): 9331-6.
- Wang, Q., N. Li, et al. (2007). "Membrane protein hMYADM preferentially expressed in myeloid cells is up-regulated during differentiation of stem cells and myeloid leukemia cells." *Life Sciences* **80**(5): 420-9.
- Wang, T., C. Dong, et al. (2002). "Overexpression of soluble fas attenuates transplant arteriosclerosis in rat aortic allografts." *Circulation* **106**(12): 1536-42.
- Wang, Y. (2006). "HSV-1 amplicon vectors are an efficient gene transfer system for skeletal muscle cells." *Curr Gene Ther* **6**(3): 371-81.
- Wang, Y., H. Dai, et al. (2006). "Neutralizing IL-7 promotes long-term allograft survival induced by CD40/CD40L costimulatory blockade." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **6**(12): 2851-60.
- Wang, Z., J. Hong, et al. (2006). "Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs." *J Clin Invest* **116**(9): 2434-41.
- Watanabe, N., M. Gavrieli, et al. (2003). "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." *Nature immunology* **4**(7): 670-9.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, et al. (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." *Nature* **356**(6367): 314-7.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunological Reviews* **182**: 207-14.
- Wekerle, T., M. H. Sayegh, et al. (1999). "Anti-CD154 or CTLA4Ig obviates the need for thymic irradiation in a non-myeloablative conditioning regimen for the induction of mixed hematopoietic chimerism and tolerance." *Transplantation* **68**(9): 1348-55.
- Wells, A. D., X. C. Li, et al. (1999). "Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance." *Nat Med* **5**(11): 1303-7.
- Welsh, R. M., T. G. Markees, et al. (2000). "Virus-induced abrogation of transplantation tolerance induced by donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody." *Journal of Virology* **74**(5): 2210-8.
- Weston, L. E., A. F. Geczy, et al. (2006). "Production of IL-10 by alloreactive sibling donor cells and its influence on the development of acute GVHD." *Bone Marrow Transplantation* **37**(2): 207-12.
- Wickham, T. J., P. Mathias, et al. (1993). "Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment." *Cell* **73**(2): 309-19.
- Wickham, T. J., D. M. Segal, et al. (1996). "Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies." *Journal of Virology* **70**(10): 6831-8.
- Wiener, A. S., W. W. Socha, et al. (1974). "Homologous of the human A-B-O blood groups in apes and monkeys." *Haematologia (Budap)* **8**(1-4): 195-216.
- Williams, G. M., D. M. Hume, et al. (1968). "'Hyperacute' renal-homograft rejection in man." *The New England journal of medicine* **279**(12): 611-8.

- Williams, L. M. and A. Y. Rudensky (2007). "Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3." Nature Immunology **8**(3): 277-84.
- Williams, M. A., J. Trambley, et al. (2000). "Genetic characterization of strain differences in the ability to mediate CD40/CD28-independent rejection of skin allografts." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **165**(12): 6849-57.
- Williams, N. S. and V. H. Engelhard (1996). "Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **156**(1): 153-9.
- Willis, R. A., W. J. Bowers, et al. (2001). "Dendritic cells transduced with HSV-1 amplicons expressing prostate-specific antigen generate antitumor immunity in mice." Hum Gene Ther **12**(15): 1867-79.
- Wilson, D. C., S. Matthews, et al. (2008). "IL-12 signaling drives CD8+ T cell IFN-gamma production and differentiation of KLRG1+ effector subpopulations during Toxoplasma gondii Infection." J Immunol **180**(9): 5935-45.
- Woerly, G., N. Roger, et al. (1999). "Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes." The Journal of experimental medicine **190**(4): 487-95.
- Wolf, A. M., D. Wolf, et al. (2004). "Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease." Clin Immunol **113**(1): 47-55.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.
- Wong, W., J. S. Billing, et al. (2003). "Retroviral transfer of donor MHC class I or MHC class II genes into recipient bone marrow cells can induce operational tolerance to alloantigens in vivo." Hum Gene Ther **14**(6): 577-90.
- Wong, W., P. J. Morris, et al. (1997). "Pretransplant administration of a single donor class I major histocompatibility complex molecule is sufficient for the indefinite survival of fully allogeneic cardiac allografts: evidence for linked epitope suppression." Transplantation **63**(10): 1490-4.
- Wood, K. J. and B. Sawitzki (2006). "Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo." Trends Immunol **27**(4): 183-7.
- Woodward, J. E., A. L. Bayer, et al. (1998). "T-cell alterations in cardiac allograft recipients after B7 (CD80 and CD86) blockade." Transplantation **66**(1): 14-20.
- Worthington, J. E., S. Martin, et al. (2003). "Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome." Transplantation **75**(7): 1034-40.
- Wortmann, A., S. Vřhringer, et al. (2008). "Fully detargeted polyethylene glycol-coated adenovirus vectors are potent genetic vaccines and escape from pre-existing anti-adenovirus antibodies." Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy **16**(1): 154-62.
- Wrobel, I. and D. Collins (1995). "Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis." Biochim Biophys Acta **1235**(2): 296-304.
- Wu, C. J., M. Lovett, et al. (1992). "Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts." Transplantation **54**(2): 326-32.
- Wu, J., T. Zhou, et al. (1994). "Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-lpr/lpr mice." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2344-8.
- Wu, Z., A. Asokan, et al. (2006). "Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy." Mol Ther **14**(3): 316-27.
- Xiao, X., J. Li, et al. (1996). "Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector." Journal of Virology **70**(11): 8098-108.
- Xie, G. H., S. J. Wang, et al. (2008). "Fas Ligand gene transfer enhances the survival of tissue-engineered chondrocyte allografts in mini-pigs." Transpl Immunol **19**(2): 145-51.
- Xu, H., F. Arnaud, et al. (2001). "Human platelets activate porcine endothelial cells through a CD154-dependent pathway." Transplantation **72**(11): 1858-61.
- Xu, H., E. Elster, et al. (2001). "Effects of dose and duration of anti-CD154 antibody therapy in preventing renal allograft rejection in a nonhuman primate model." Transplant Proc **33**(1-2): 223-4.
- Xu, H., S. P. Montgomery, et al. (2003). "Studies investigating pretransplant donor-specific blood transfusion, rapamycin, and the CD154-specific antibody IDEC-131 in a nonhuman primate model of skin allotransplantation." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **170**(5): 2776-82.

- Xu, H., D. K. Tadaki, et al. (2002). "Humanized anti-CD154 antibody therapy for the treatment of allograft rejection in nonhuman primates." Transplantation **74**(7): 940-3.
- Xu, H., X. Zhang, et al. (2006). "Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154." J Clin Invest **116**(3): 769-74.
- Xystrakis, E., P. Cavailles, et al. (2004). "Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **173**(5): 3140-7.
- Xystrakis, E., A. S. Dejean, et al. (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." Blood **104**(10): 3294-301.
- Yamaguchi, Y., N. Miyanari, et al. (1998). "Infiltrating CD45RC- T cells are associated with immunologic unresponsiveness induced by donor class I major histocompatibility complex antigens in rats." Hepatology (Baltimore, Md.) **28**(2): 450-8.
- Yamashita, K., T. Masunaga, et al. (2003). "Long-term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40lg plus CTLA4lg gene therapies." Transplantation **76**(7): 1089-96.
- Yan, Z., Y. Zhang, et al. (2000). "Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(12): 6716-21.
- Yang, J., A. Reutzel-Selke, et al. (2003). "Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40, and vIL-10 ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of macrophages by overexpression of IFN-gamma accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model." J Am Soc Nephrol **14**(1): 214-25.
- Yang, Z., S. Rostami, et al. (1999). "Cardiac allograft tolerance induced by intra-arterial infusion of recombinant adenoviral CTLA4lg." Transplantation **67**(12): 1517-23.
- Yasunami, Y., S. Kojo, et al. (2005). "Valpha14 NK T cell-triggered IFN-gamma production by Gr-1+CD11b+ cells mediates early graft loss of syngeneic transplanted islets." The Journal of Experimental Medicine **202**(7): 913-8.
- Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, et al. (1999). "T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS." Nature **402**(6763): 827-32.
- Yoshizumi, T., Y. Yonemitsu, et al. (2006). "Tumor necrosis factor- α antisense transfer remarkably improves hepatic graft viability." Liver Int **26**(4): 451-6.
- Young, K. J., B. DuTemple, et al. (2003). "Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **171**(1): 134-41.
- Young, K. J., L. Yang, et al. (2002). "Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells." Blood **100**(9): 3408-14.
- Yu, S. S., J. M. Kim, et al. (2000). "High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences." Gene Therapy **7**(9): 797-804.
- Zang, X., P. n. Loke, et al. (2003). "B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(18): 10388-92.
- Zarek, P. E., C.-T. Huang, et al. (2008). "A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells." Blood **111**(1): 251-9.
- Zavasnik-Bergant, T. and B. Turk (2006). "Cysteine cathepsins in the immune response." Tissue Antigens **67**(5): 349-55.
- Zeng, D., D. Lewis, et al. (1999). "Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease." The Journal of Experimental Medicine **189**(7): 1073-81.
- Zhai, Y., L. Meng, et al. (2002). "Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **169**(8): 4667-73.
- Zhai, Y., L. Meng, et al. (2006). "CD4+ T regulatory cell induction and function in transplant recipients after CD154 blockade is TLR4 independent." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **176**(10): 5988-94.
- Zhang, J. (2007). "Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease." The Journal of Clinical Investigation **117**(4): 871-3.
- Zhang, J. L., J. Cai, et al. (2005). "Tolerance by selective in vivo expansion of foreign major histocompatibility complex-transduced autologous bone marrow." Transplantation **80**(3): 362-9.

- Zhang, Y., R. Apilado, et al. (2001). "Interferon gamma stabilizes the T helper cell type 1 phenotype." The Journal of Experimental Medicine **194**(2): 165-72.
- Zhang, Z.-X., W. L. Stanford, et al. (2002). "Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells." European Journal of Immunology **32**(6): 1584-92.
- Zhang, Z. X., L. Yang, et al. (2000). "Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression." Nature Medicine **6**(7): 782-9.
- Zhao, D.-M., A. M. Thornton, et al. (2006). "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes." Blood **107**(10): 3925-32.
- Zhao, Z., S. Yu, et al. (2008). "IL-12R beta 2 promotes the development of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **181**(6): 3870-6.
- Zheng, S. G., J. D. Gray, et al. (2002). "Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors." J Immunol **169**(8): 4183-9.
- Zhou, X. and L. Huang (1994). "DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action." Biochim Biophys Acta **1189**(2): 195-203.
- Zhou, X., L. T. Jeker, et al. (2008). "Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity." J. Exp. Med. **205**(9): 1983-1991.
- Zingoni, A., H. Soto, et al. (1998). "The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells." J Immunol **161**(2): 547-51.
- Zlotnik, A., O. Yoshie, et al. (2006). "The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution." Genome Biol **7**(12): 243.
- Zou, W. and L. Chen (2008). "Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment." Nature Reviews. Immunology **8**(6): 467-77.
- Zuklys, S., G. Balciunaite, et al. (2000). "Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **165**(4): 1976-83.
- Zuraff-Perryman, L. A., R. C. Duke, et al. (2002). "Murine heart transgenic Fas ligand expression protects against allograft rejection." Transplant Proc **34**(8): 3396-8.
- Zwacka, R. M., W. Zhou, et al. (1998). "Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation." Nat Med **4**(6): 698-704.

Annexe 1: Production de cellules productrices d'insuline à partir de cellules souches embryonnaires murines

Selon la définition de l'OMS, « le diabète est un état d'hyperglycémie, c'est-à-dire de concentration excessive de glucose dans le sang, qui peut résulter de nombreux facteurs génétiques et environnementaux agissant souvent de concert ». Les complications chroniques du diabète sont la conséquence des lésions au niveau des petits vaisseaux (néphropathie, rétinopathie, neuropathie, pied diabétique) et des grands vaisseaux (maladies cardio-vasculaires, cérébro-vasculaires et au niveau des membres inférieurs) entraînant une diminution de la qualité de vie du patient voir sa mort prématurée. Plus de 180 millions de personnes sont touchées par cette maladie à travers le monde et ce chiffre sera probablement doublé en 2025. Chez le patient diabétique de type I, le remplacement du tissu endocrine pancréatique lors d'une greffe de pancréas ou d'une greffe d'îlots de Langerhans présente l'avantage sur le traitement substitutif par injections d'insuline de rétablir un contrôle physiologique de la glycémie. Hormis les problèmes immunologiques (rejet, récurrence de la maladie diabétique) cette approche reste limitée par la quantité de matériel cellulaire disponible.

La possibilité de produire des cellules β à partir de cellules souches a été envisagée à partir de différentes sources. Si la présence de cellules souches dans le pancréas adulte reste discutée et les potentialités de transdifférenciation beaucoup plus limitées que certains résultats préliminaires ne le suggéraient, la différenciation à partir des cellules souches embryonnaires bien que théoriquement certaine est dans la pratique loin d'être maîtrisée. En absence de modification génétique, Lumelsky *et al* (Lumelsky, Blondel *et al.* 2001) ont décrit un protocole de différenciation chez la souris, dérivé d'un protocole de production de neurones qui permet d'obtenir des amas de cellules contenant des hormones pancréatiques dont l'insuline, le glucagon et la somatostatine. Ces résultats restent très controversés et semblent limités en terme de quantité de cellules et d'insuline produites.

Pour être efficace, il est nécessaire de mettre au point un protocole de production *in vitro* reproductible, capable de générer des cellules stables et fonctionnelles. La connaissance de l'organogenèse du pancréas représente un outil crucial pour la mise au point d'un tel protocole. L'identification des facteurs intrinsèques et extrinsèques, des mécanismes d'activation des facteurs de transcription régulant le développement du pancréas est fondamentale. Le pancréas dérive de l'endoderme embryonnaire. Durant son développement, l'endoderme prépancréatique reçoit des signaux permissifs (incluant des activines et des BMPs) qui vont permettre l'activation des deux facteurs de transcription tels que *pdx1* (Guz, Montminy *et al.* 1995) et *hb9* (Harrison, Thaler *et al.* 1999) au niveau de cette région. La capacité à répondre à ces signaux est fournie par des facteurs exprimés plus largement dans l'endoderme et précédant *pdx1* et *hb9* tels que *hnf3b* (*Foxa2*) (Monaghan, Kaestner *et al.* 1993), *hnf4a* (Duncan, Manova *et al.* 1994), *gata4* (Arceci, King *et al.* 1993) ... Le facteur de transcription pro-endocrine neurogenin 3 est exprimé brièvement dans quelques cellules de l'épithélium pancréatique et non dans les cellules endocrines différenciées (Apelqvist, Li *et al.* 1999). Ces cellules épithéliales représentent les précurseurs endocrines (Gu, Dubauskaite *et al.* 2002). *ngn3* active le promoteur du facteur de transcription *neurod1*. Contrairement à *ngn3*, l'expression de *neurod1* persiste et permet l'expression de nombreux produits des cellules

endocrines différenciées tels l'insuline (Ohneda, Ee et al. 2000). Les cellules n'exprimant pas *ngn3* peuvent prendre part au pancréas exocrine. D'autres facteurs, comme *p48* sont par ailleurs impliqués dans le destin exocrine de ces précurseurs.

Une fois *ngn3* activé, les cellules sont destinées à prendre part au pancréas endocrine. Les facteurs participant à cette voie peuvent être divisés en 2 groupes : les facteurs précoces (*pax4*, *nkx2.2* et *nkx6.1*) co-exprimés au niveau des précurseurs avec *ngn3* et les facteurs tardifs (*pax6*, *isl1*, *hb9* et *pdx*) présents dans les cellules plus matures. *pax4* est nécessaire au développement normal des cellules β et δ , et est peu présent voir absent dans le pancréas mature (Dohrmann, Gruss et al. 2000). *ngn3* se lie directement sur le promoteur du gène *pax4* et l'active en coopération avec certains facteurs exprimés plus largement comme *hnf1* et *hnf4* (Smith and Kotin 2000). *nkx2.2* est exprimé largement dans le bourgeon pancréatique jusqu'à ce qu'il soit restreint aux progéniteurs *ngn3*+. Contrairement à *pax4*, *nkx2.2* persiste dans plusieurs lignées de cellules endocrines dont les cellules β . Le mode d'expression de *nkx6.1* est similaire à celui de *nkx2.2* excepté qu'il est absent des cellules non β (Oster, Jensen et al. 1998). L'absence d'expression de *nkx6.1* dans les animaux mutants pour *nkx2.2* suggère que *nkx2.2* agit en amont de *nkx6.1*. Après son expression précoce dans l'endoderme prépancréatique et les bourgeons pancréatiques, *pdx1* diminue. Au niveau des progéniteurs endocrines *ngn3*+, *pdx1* est absent (Schwitzgebel, Scheel et al. 2000) mais est réactivé dans les cellules β et δ différenciées. De nombreux produits de ces cellules β et δ sont régulés par *pdx1* dont Glut2, la pro-convertase et la somatostatine. Les facteurs de transcriptions *isl1* et *pax6* sont également exprimés dans les îlots matures en régulant les dernières étapes de la différenciation des îlots. (Figure 106)

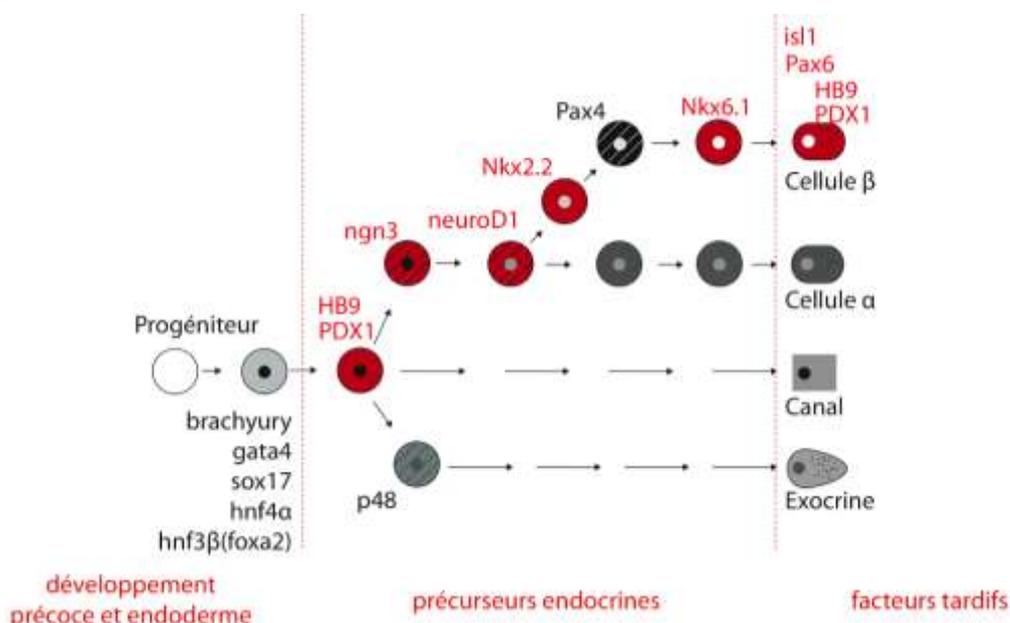


Figure 106. Facteurs de transcriptions intervenant dans le développement du pancréas

En rouge, les facteurs communs au développement du pancréas et au développement neuronal. Adaptée de (Wilson, Scheel et al. 2003)

L'objectif de ma première année de thèse a été d'améliorer le protocole de Lumelsky, et après analyse des ARNm exprimés au cours des conditions de culture par RT-PCRq, d'enrichir les cultures de façon très précoce en précurseurs endodermaux.

– Le protocole Lumelsky (Figure 107)

1. Expansion des cellules souches embryonnaires murines (ES)

Pour proliférer, les cellules souches embryonnaires nécessitent un tapis nourricier constitué de cellules fibroblastiques murines. Les fibroblastes STO-1 sont traités à la mitomycine c etensemencés sur une boîte de culture préalablement recouvertes de gélatine à 0.1%. Les cellules ES sont semées sur le tapis nourricier dans du milieu KO (Gibco) contenant du 15% de SVF ES cell Qualified (Gibco), et 1400U/ml de Leukemia Inhibitory Factor (Chemicon international). Le milieu est supplémenté en Leukemia inhibitory factor (LIF) quotidiennement afin de maintenir les cellules souches dans leur état indifférencié.

2. Stade 2 : formation des corps embryoïdes

Les cellules ES sont ensuite semées sur boîtes de Pétri (plastique non traité pour la culture) dans du milieu KO-ES. En suspension, et en absence de LIF, les cellules vont former des corps embryoïdes.

3. Stade 3 : sélection des cellules nestine positives

Les corps embryoïdes sont transférés dans des boîtes de culture cellulaire. Après 24h, une partie des cellules a adhéré au plastique et le milieu est changé pour du milieu de sélection dit ITSf (Lumelsky, Blondel et al. 2001). Ce milieu est du DMEM/F12 (Gibco) contenant 5mg/l Insuline, 30 nM Selenium, 50 mg/l Transferrine, 5 µg/ml fibronectine (Invitrogen), 1.55 g/l Glucose, 73 mg/ml.Glutamine (Gibco), 2.4 g/l NaHCO₃, 100 U/ml Pénicilline, 100 mg/ml Streptomycine.

4. Stade 4 : Expansion des cellules

Les cellules sont semées dans des boîtes recouvertes avec de la poly-L-ornithine (Sigma-Aldrich)/laminine (BD Biosciences) dans du milieu dit N2. Ce milieu est constitué de DMEM/F12 (Gibco), supplémenté en N2 (R&D systems) soit 25 µg/ml insuline 16.11 µg/ml putrescine, 52 ng/ml putrescine - 63 ng/ml progestérone additionné de 15 mg/ml d'insuline (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, danemark), 10 ng/ml basic FGF (R&D systems) (Zulewski, Abraham et al. 2001), 1X B27 (Gibco) (Brewer, Torricelli et al. 1993). Tous les 2 jours, du bFGF est ajouté (10 ng/ml) en alternance avec un renouvellement de milieu complet.

5. Stage 5 : Différenciation en cellules sécrétrices d'insuline

La différenciation est induite en enlevant le bFGF du milieu de culture. Toujours en présence de N2 et B27, on ajoute du nicotinamide (10mM, Sigma-Aldrich), un agent de différenciation des cellules productrices d'insuline (Otonkoski, Beattie et al. 1993). Les cellules sont maintenues en culture 6-10 jours.

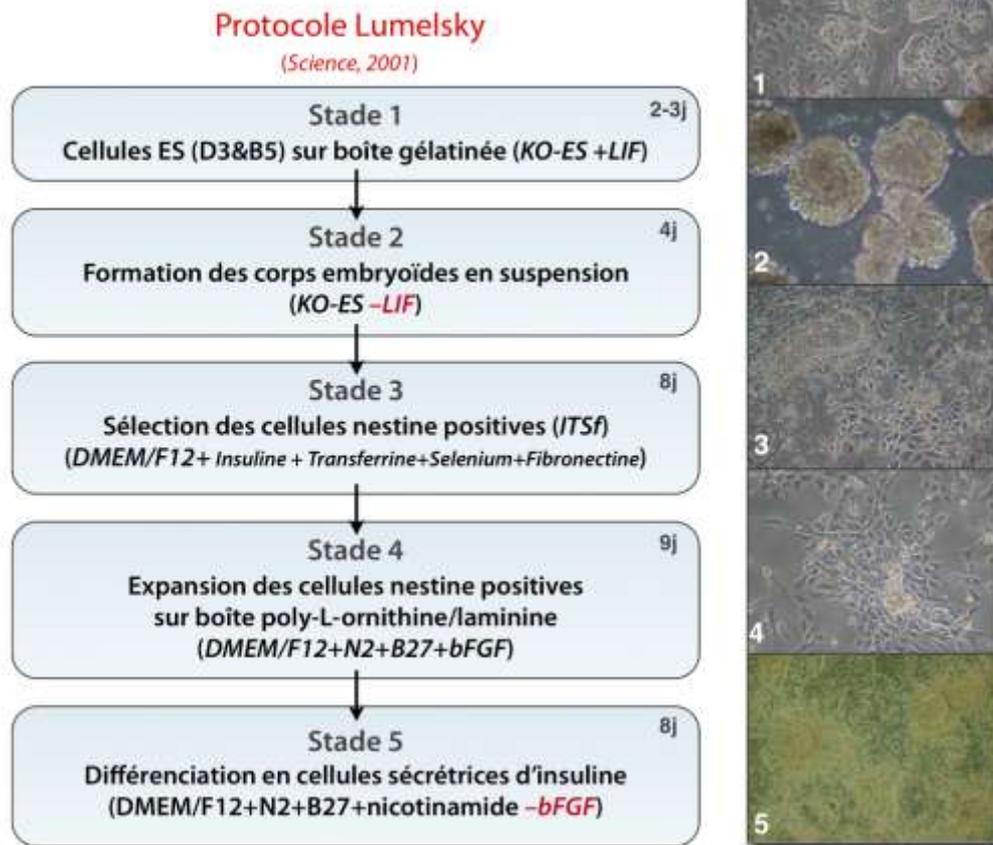


Figure 107. Le protocole Lumelsky

Le protocole Lumelsky de différenciation des cellules souches embryonnaires murines en cellules productrices d'insuline compte cinq stades. À droite, des photos illustrant ces différents stades.

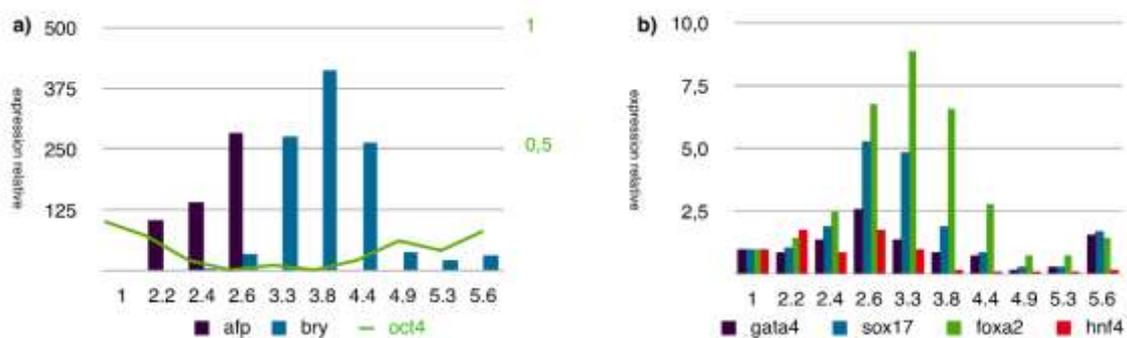


Figure 108. Analyse de l'expression des ARNm codants pour les facteurs de transcription exprimés dans le développement précoce du pancréas (stade 2-3)

Au cours des trois premiers stades, le niveau d'ARNm d'oct4 (un marqueur des cellules indifférenciées) chute constamment (Figure 108a), indiquant la différenciation des cellules souches initialement cultivées. De façon surprenante, l'expression d'oct4 redémarre de manière significative à partir du stade 4. Le marqueur du méso-endoderme brachyury voit son expression augmenter pendant le stade 3 pour diminuer au stade 4. L'alpha-foetoprotéine (afp) est présente durant les premiers stades et disparaît au stade 3, en accord avec son statut de marqueur très précoce.

Gata4, dont l'expression est activée dès l'endoderme primitif et maintenue dans l'endoderme pariétal et viscéral durant la gastrulation voit son expression augmentée durant les premiers stades de la culture pour diminuer, et finalement réapparaître à la fin de la culture. La cinétique d'expression du marqueur de l'endoderme sox17 est équivalente à celle de Gata4. L'expression de HNF4a et HNF3b (Foxa2), impliqués dans la différenciation précoce de l'endoderme, augmente dans les premiers stades avec un pic d'expression durant le stade 3 pour disparaître.

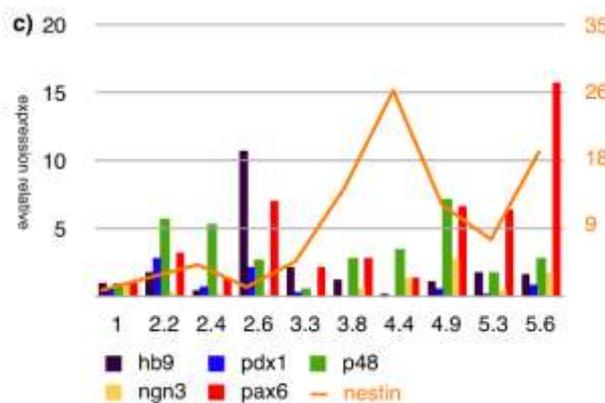


Figure 109. Analyse de l'expression des ARNm codants pour les facteurs de transcription exprimés durant la différenciation pancréatique

L'expression des gènes des précurseurs de cellules endocrines est plus difficile à caractériser. Les facteurs les plus spécifiques du pancréas ne sont pas augmentés lors de la différenciation. Pax 4 et l'Insuline 1 ne sont pas détectables. L'insuline 2 est très faiblement exprimée. Comme attendu, l'expression de la nestine augmente durant le stade 3. La nestine a été initialement décrite dans les cellules souches neurales (Lendahl, Zimmerman et al. 1990); sa présence a également été démontrée dans une faible population de cellules pancréatiques qui pourrait représenter les cellules souches du pancréas (Zulewski, Abraham et al. 2001).

A la différence de l'insuline 1, l'insuline 2 est préférentiellement exprimée dans le cerveau murin en développement (Deltour, Leduque et al. 1993). De nombreux facteurs impliqués dans le développement du pancréas peuvent être retrouvés durant le développement du système nerveux central (Figure 106). Ainsi pdx1 est également exprimé dans les précurseurs neuronaux de différentes régions du cerveau (Schwartz, Perez-Villamil et al. 2000). ngn3 semble jouer un rôle dans le développement de certains types d'interneurones et dans la différenciation de la glie (Sommer, Ma et al. 1996), neuroD est largement exprimé dans le système nerveux en développement (Lee, Hollenberg et al. 1995). isl1 se trouve également être un marqueur des motoneurones en développement (Ericson, Thor et al. 1992) De plus nous n'avons pas détecté la présence de pax4, un facteur spécifique du développement pancréatique (Sosa-Pineda 2004). Contrairement à (Moritoh, Yamato et al. 2003), (Shiroi, Yoshikawa et al. 2002), (Kim, Gu et al. 2003) aucun marqueur des îlots matures tels glut2, et le glucagon n'a été identifié.

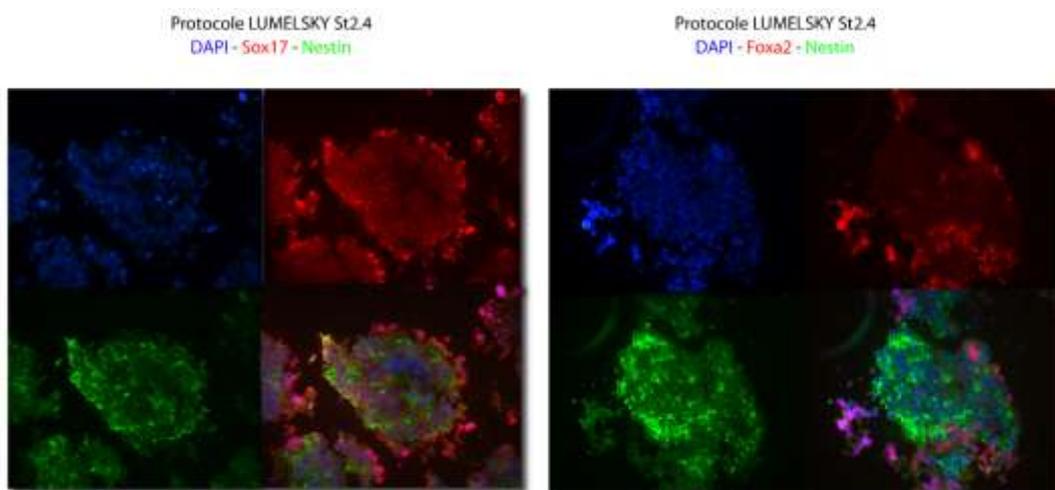


Figure 110. Immunomarquage par fluorescence de corps embryoïdes durant le protocole Lumelsky

Par immunomarquage, nous avons constaté que les cellules des corps embryoïdes exprimant la Nestine et Foxa 2 sont différentes. De même, sox17 et la Nestine sont présentes dans des cellules différentes. Les cellules exprimant Nestine, initialement décrite dans les cellules souches neurales (Lendahl, Zimmerman et al. 1990), ne semblent donc pas exprimer les marqueurs de l'endoderme précoce Sox17 et Foxa2. En accord avec l'étude de Sipione (Sipione, Eshpeter et al. 2004), Il est tout à fait possible que, durant nos cultures les cellules souches embryonnaires s'engagent dans le développement neuronal et non pancréatique.

Afin de favoriser la différenciation endodermale dans le protocole Lumelsky, nous avons utilisé du chlorure de lithium dans nos cultures.

En l'absence de signal Wnt, la β -caténine cytoplasmique est phosphorylée par la glycogène synthase kinase puis dégradée par le protéasome. En présence de Wnt, la GSK3B est inactivée et la β -caténine est transloquée vers le noyau, et va activer la transcription des gènes cibles. Parmi ces gènes on retrouve les gènes de différenciation de l'endoderme.

En inhibant GSK3B, le chlorure de lithium va favoriser la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation WNT/ β -caténine et pourrait favoriser la différenciation endodermale.

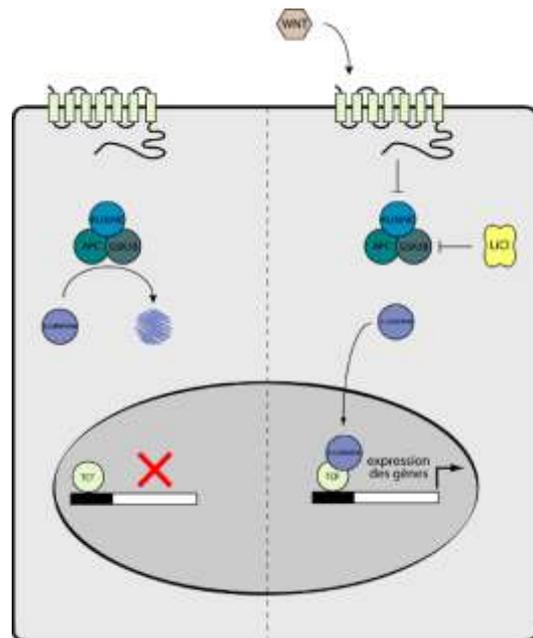


Figure 111. Mécanisme de l'action du Chlorure de Lithium

En ajoutant du chlorure de lithium dans notre culture, l'expression des mRNA du développement pancréatique et de l'endoderme ne montre pas de modification. Seul Brachyury est significativement augmenté, ce qui pourrait correspondre à la présence d'une population "mesendodermale".

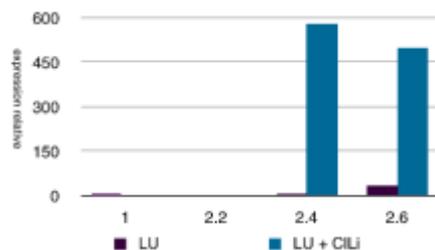


Figure 112. Effet du lithium sur l'expression de Brachyury

Kubo (Kubo, Shinozaki et al. 2004). et Ku (Ku, Zhang et al. 2004) ont décrit des protocoles de culture de cellules embryonnaires murines permettant d'enrichir les cultures en endoderme définitif ou en cellules pancréatiques endocrines précoces via l'utilisation d'un sérum synthétique (le Sérum Replacement) (Figure 113). Nous avons voulu tester l'efficacité de ces protocoles.

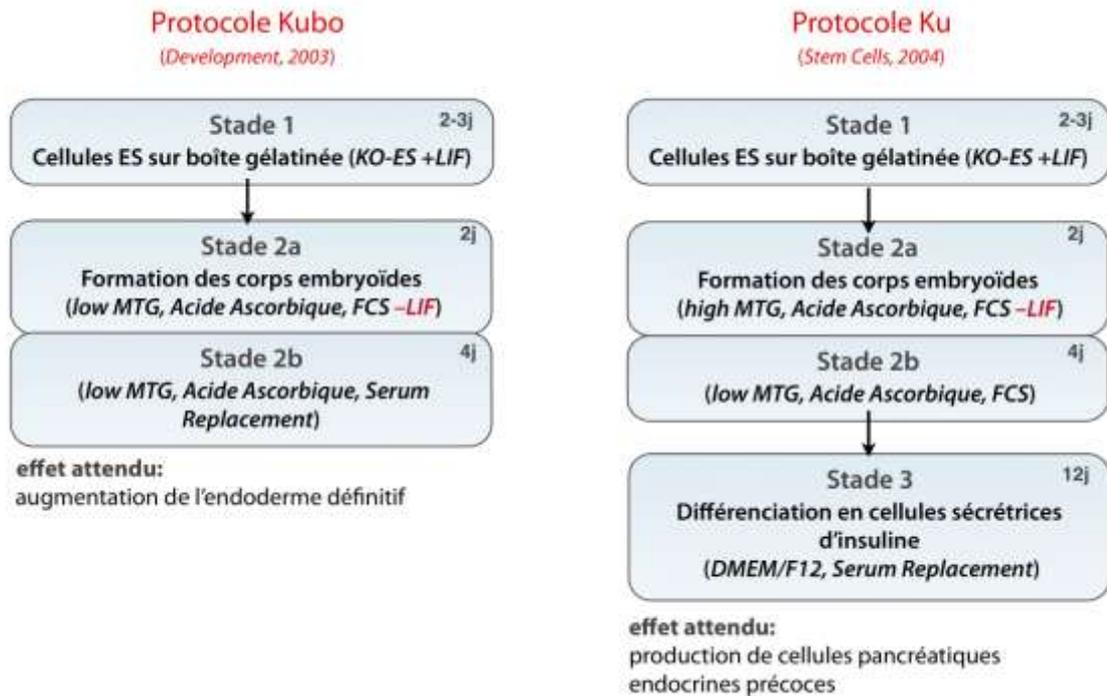


Figure 113. Les protocoles Kubo et Ku

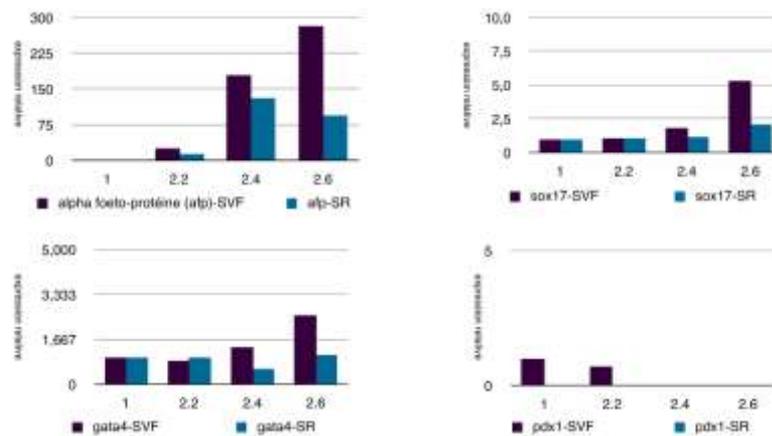


Figure 114. Effet du « Serum Replacement » ajouté à un stade précoce dans le protocole Kubo

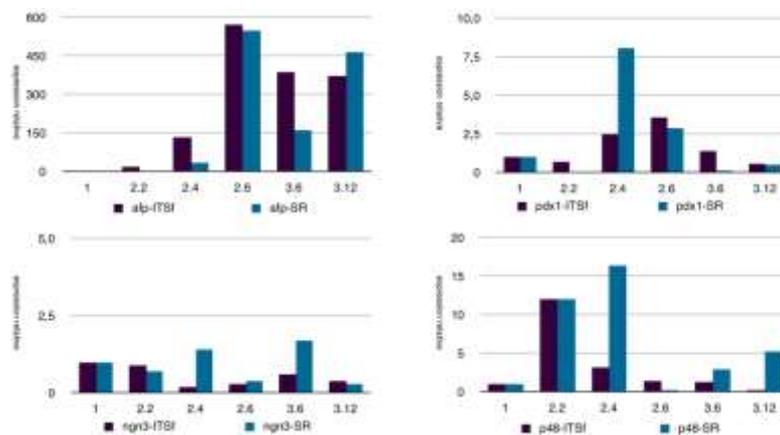


Figure 115. Effet du « Serum Replacement » ajouté à un stade tardif dans le protocole Ku

Dans le protocole Kubo, la formation des corps embryoides en présence de « Serum Replacement » ne semble pas favoriser la différenciation des précurseurs endodermes. Dans le protocole Ku, l'utilisation du « Serum Replacement » de manière plus tardive montre peu d'effet sur les transcrits de l'endoderme et les transcrits pancréatiques précoces. L'effet le plus important observé est pour *pdx1*, *ngn3* et *p48*. On note une augmentation importante de l'expression de *pdx1* au cours du stade 2, qui diminue à la fin de ce stade. L'expression de *ngn3* est fortement augmentée et cyclique : son expression augmente au cours du stade 2 pour revenir normale à la fin de ce stade, puis augmente à nouveau au cours du stade 3 pour revenir normale. *p48* est fortement surexprimé au cours du stade 2 pour diminuer à la fin de ce stade, puis augmente fortement au cours du stade 3 comparativement à la condition de culture utilisant un sérum normal. Cet effet est visible dès la formation des corps embryoides (stade 2) et serait plutôt dû au MTG et à l'acide ascorbique utilisés dans le protocole de Ku (Ku, Zhang et al. 2004).

Cette étude, réalisée en 2005, confirme la faible efficacité des protocoles publiés à générer des cellules pancréatiques différenciées, des précurseurs pancréatiques ou même des précurseurs endodermes. Il est donc particulièrement important d'enrichir les cultures en endoderme dès les phases précoces. Comme le CILi ne semble pas avoir d'effet majeur, nous avons envisagé d'utiliser plusieurs facteurs allant dans ce sens comme Nodal, l'activine A ou l'acide rétinolique. L'inhibition de Sonic Hedgehog pourrait ensuite être critique pour favoriser la différenciation pancréatique.

L'équipe de Baetge s'est efforcée de reproduire les différentes étapes de l'embryogenèse des cellules bêta et a ainsi pu obtenir des cellules de l'endoderme définitif (D'Amour, Agulnick et al. 2005), de l'intestin antérieur, des cellules de précurseurs pancréatiques et endocrines (D'Amour, Bang et al. 2006) et finalement des cellules sécrétrices d'insuline (D'Amour, Bang et al. 2006) à partir de cellules souches embryonnaires humaines. Après avoir greffé ces cellules sécrétrices d'insuline chez des souris, ces cellules montrent plusieurs propriétés propres aux cellules bêta, dont l'expression des facteurs de transcription critiques, le traitement de la proinsuline, et la présence de granules de sécrétion endocrines matures (Kroon, Martinson et al. 2008). Finalement l'implantation de ces cellules enrichies en endoderme chez des souris hyperglycémiques a permis de mettre en évidence chez des souris normoglycémiques la production d'insuline de façon régulée par le glucose, ce qui démontre la capacité de ces cellules répondre à une stimulation glucidique *in vivo* (Kroon, Martinson et al. 2008). Il est intéressant de noter que le protocole utilisé par cette équipe utilise plusieurs facteurs que nous avons envisagés (Figure 116)(Activine A, Wnt un inhibiteur de Sonic Hedgehog, l'acide rétinolique). Ces résultats sont encourageants et doivent être confirmés par d'autres expérimentateurs.

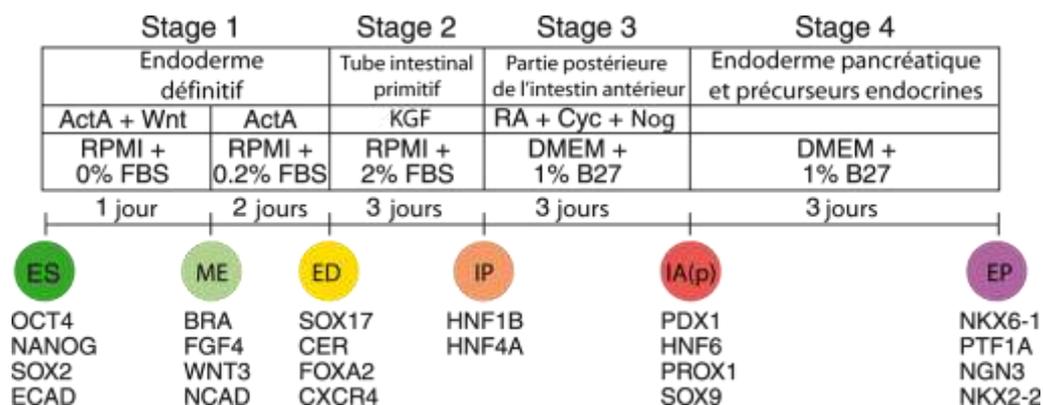


Figure 116. Protocole utilisé par l'équipe de Baetge pour produire des cellules productrices d'insuline à partir de cellules souches embryonnaires humaines

ES : cellule souche embryonnaire, ME : mésendoderme ; ED : endoderme définitif, IP : intestin primitif, IA(p) : partie postérieure de l'intestin antérieur, EP : endoderme pancréatique.

BIBLIOGRAPHIE ANNEXE 1

- Apelqvist, A., H. Li, et al. (1999). "Notch signalling controls pancreatic cell differentiation." Nature **400**(6747): 877-81.
- Arceci, R. J., A. A. King, et al. (1993). "Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart." Mol Cell Biol **13**(4): 2235-46.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, et al. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-76.
- D'Amour, K. A., A. D. Agulnick, et al. (2005). "Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm." Nat Biotechnol **23**(12): 1534-41.
- D'Amour, K. A., A. G. Bang, et al. (2006). "Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **24**(11): 1392-401.
- Deltour, L., P. Leduque, et al. (1993). "Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 527-31.
- Dohrmann, C., P. Gruss, et al. (2000). "Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas." Mech Dev **92**(1): 47-54.
- Duncan, S. A., K. Manova, et al. (1994). "Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7598-602.
- Ericson, J., S. Thor, et al. (1992). "Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*." Science **256**(5063): 1555-60.
- Gu, G., J. Dubauskaite, et al. (2002). "Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors." Development **129**(10): 2447-2457.
- Guz, Y., M. R. Montminy, et al. (1995). "Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny." Development **121**(1): 11-8.
- Harrison, K. A., J. Thaler, et al. (1999). "Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlx9-deficient mice." Nat Genet **23**(1): 71-5. http://www.nature.com/journalData/genetics/ng0999_71.fulltext
- Kim, D., Y. Gu, et al. (2003). "In vivo functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell." Pancreas **27**(2): e34-41.
- Kroon, E., L. A. Martinson, et al. (2008). "Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo." Nat Biotechnol **26**(4): 443-52.
- Ku, H. T., N. Zhang, et al. (2004). "Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro." Stem Cells **22**(7): 1205-17.
- Kubo, A., K. Shinozaki, et al. (2004). "Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture." Development **131**(7): 1651-62.
- Lee, J. E., S. M. Hollenberg, et al. (1995). "Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein." Science **268**(5212): 836-44.
- Lendahl, U., L. B. Zimmerman, et al. (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." Cell **60**(4): 585-95.
- Lumelsky, N., O. Blondel, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." Science **292**(5520): 1389-94.
- Monaghan, A. P., K. H. Kaestner, et al. (1993). "Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm." Development **119**(3): 567-78.
- Moritoh, Y., E. Yamato, et al. (2003). "Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells." Diabetes **52**(5): 1163-8.
- Ohneda, K., H. Ee, et al. (2000). "Regulation of insulin gene transcription." Semin Cell Dev Biol **11**(4): 227-33.

-
- Oster, A., J. Jensen, et al. (1998). "Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1)." *J Histochem Cytochem* **46**(6): 707-15.
- Otonkoski, T., G. M. Beattie, et al. (1993). "Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells." *J Clin Invest* **92**(3): 1459-66.
- Schwartz, P. T., B. Perez-Villamil, et al. (2000). "Pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 expressed in developing brain regulates somatostatin gene transcription in embryonic neural cells." *J Biol Chem* **275**(25): 19106-14.
- Schwitzgebel, V. M., D. W. Scheel, et al. (2000). "Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas." *Development* **127**(16): 3533-42.
- Shiroi, A., M. Yoshikawa, et al. (2002). "Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone." *Stem Cells* **20**(4): 284-92.
- Sipione, S., A. Eshpeter, et al. (2004). "Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells." *Diabetologia* **47**(3): 499-508.
- Smith, R. H. and R. M. Kotin (2000). "An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA." *Journal of Virology* **74**(7): 3122-9.
- Sommer, L., Q. Ma, et al. (1996). "neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS." *Mol Cell Neurosci* **8**(4): 221-41.
- Sosa-Pineda, B. (2004). "The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development." *Mol Cells* **18**(3): 289-94.
- Wilson, M. E., D. Scheel, et al. (2003). "Gene expression cascades in pancreatic development." *Mechanisms of Development* **120**(1): 65-80.
- Zulewski, H., E. J. Abraham, et al. (2001). "Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes." *Diabetes* **50**(3): 521-33.

Annexe 2: Liste des 349 gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} extraits d'animaux tolérants et d'animaux naïfs

Entrez Gene ID	Fold change	Nom	Description
24615	4,961	42A; 18A2; CAPL; MTS1; P9ka; PEL98; RNP9KA	S-100-related protein; Rat S-100 related protein mRNA, complete cds, clone 42A/eX15.
83684	5,49	5T4	Rattus norvegicus 5T4 oncofetal antigen homolog (5T4) mRNA, complete cds.
289453	2,052	Abcg3; MGC114213	Rattus norvegicus ABC transporter ABCG3 mRNA, complete cds.
25366	0,339	Acvr2b	R.norvegicus activin type IIB receptor mRNA.
297408	2,024	Alms1_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA, 14 ESTs, 1 Protein; PREDICTED: Rattus norvegicus Alstrom syndrome 1 (predicted) (Alms1_predicted), mRNA.
299266	2,019	Asb2	Rattus norvegicus ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 2, mRNA (cDNA clone MGC:94662 IMAGE:7191983), complete cds.
81509	2,084	b1bkr	Rattus norvegicus mRNA for B1 bradykinin receptor.
56822	2,405	B7-2	Ig super family sequence analogue of CD86; Rattus norvegicus mRNA for membrane glycoprotein, complete cds.
170929	2,028	Bcl2a1	Rattus norvegicus BCL2-related protein A1 (Bcl2a1) mRNA, complete cds.
64457	2,266	Bdm1; Ndr4; smap8	Rattus norvegicus development-related protein mRNA, complete cds.
501624	5,212	Bex4	brain expressed X-linked 4; Rattus norvegicus brain expressed X-linked 4 (Bex4), mRNA.
499356	0,342	Blink	Rattus norvegicus B-cell linker, mRNA (cDNA clone MGC:112831 IMAGE:7375523), complete cds.
306956	2,768	Btn1a1	Rattus norvegicus butyrophilin mRNA, partial cds.
85247	4,076	cacy	Rattus norvegicus mRNA for calcyclin.
29154	3,153	Capn2	Rattus norvegicus calpain II 80 kDa subunit mRNA, complete cds.
114555	2,245	Casp11	protease; Rattus norvegicus caspase 11 (Casp11) mRNA, complete cds.
25109	0,492	Cd1; Cd1d	Rattus norvegicus mRNA for CD1 antigen precursor, complete cds.
null	2,775	Cd74	Rattus norvegicus clone +14KATI kynurenine aminotransferase I mRNA, partial sequence.
361226	5,083	Cd83_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 4 mRNAs, 36 ESTs, 2 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus CD83 antigen (predicted) (Cd83_predicted), mRNA.
25110	2,137	Cd94	Type II integral membrane protein.; Rattus norvegicus CD94 (Cd94) mRNA, complete cds.
498079	2,068	Cd96	Rattus norvegicus CD96 antigen, mRNA (cDNA clone MGC:108908 IMAGE:7380788), complete cds.
313838	4,205	Cdc42ep3_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 EST; PREDICTED: Rattus norvegicus CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3 (predicted) (Cdc42ep3_predicted), mRNA.
266731	2,543	cdig1U	Rattus norvegicus cdig1U mRNA for hypothetical protein, complete cds.
114851	6,289	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; synonyms: Cip1, Waf1; cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21); Rattus norvegicus cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cdkn1a), mRNA.
308958	2,284	Cdr2	synonym: RGD1310578; Rattus norvegicus cerebellar degeneration-related 2, mRNA (cDNA clone MGC:116181 IMAGE:7456103), complete cds.
117029	9,637	Ckr5; Cmkbr5	R.norvegicus mRNA for chemokine co-receptor CKR5.
296566	2,901	Clic3	Rattus norvegicus chloride intracellular channel 3, mRNA (cDNA clone MGC:109225 IMAGE:7308966), complete cds.
94272	5,259	Clic5	CLIC5; Rattus norvegicus chloride intracellular channel 5 mRNA, complete cds.
290905	2,023	Col4a1	Rattus norvegicus procollagen, type IV, alpha 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:7304280), partial cds.

360949	2,238	Cpeb2_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 3 mRNAs, 95 ESTs, 7 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 (predicted) (Cpe)
81813	2,014	cpg20	Rattus norvegicus zinc finger transcription factor homolog CPG20 (cpg20) mRNA, complete cds.
171109	2,805	cpg21	CPG21; dual-specificity phosphatase; Rattus norvegicus MAP-kinase phosphatase (cpg21) mRNA, complete cds.
25415	2,467	Crmp1	similar to 62 kDa chick collapsin response mediator protein; Rattus norvegicus rCRMP-1 mRNA, complete cds.
288067	4,639	Csta_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 3 ESTs, 2 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus cystatin A (stefin A) (predicted) (Csta_predicted), mRNA.
361704	2,002	Ctsf	Rattus norvegicus cathepsin F, mRNA (cDNA clone MGC:124702 IMAGE:7933625), complete cds.
290257	3,93	Ctsg_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 2 ESTs, 36 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus cathepsin G (predicted) (Ctsg_predicted), mRNA.
308666	3,876	Cyip1_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 16 mRNAs, 135 ESTs, 9 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus cytoplasmic FMR1 interacting protein 1 (predicted) (Cyip1_predicted)
306722	2,184	Dapk1_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 6 mRNAs, 49 ESTs, 7 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus death associated protein kinase 1 (predicted) (Dapk1_predicted), mRNA.
84380	2,047	Dhh	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA, 15 ESTs, 11 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus desert hedgehog homolog (Drosophila) (Dhh), mRNA.
361272	2,326	Dhtkd1	Rattus norvegicus dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1, mRNA (cDNA clone MGC:116097 IMAGE:7441857), complete cds.
311406	2,501	Dusp2	Rattus norvegicus dual specificity phosphatase 2, mRNA (cDNA clone MGC:108907 IMAGE:7380627), complete cds.
364601	0,351	Efha2	Rattus norvegicus EF hand domain family, member A2, mRNA (cDNA clone IMAGE:7312992), partial cds.
25385	10,31	FasI; Tnfsf6; Apt1Lg1	a member of TNF-family; apoptosis-inducing capacity; typeII-transmembrane protein; ligand for receptor; Rattus norvegicus Fas antigen ligand mRNA, complete cds.
29369	2,315	Fgf18	Rattus norvegicus mRNA for fibroblast growth factor (FGF-18), complete cds.
25444	2,912	Fgf9	Rattus norvegicus mRNA for FGF-9, complete cds.
84586	2,432	Fgl2	Rattus norvegicus fibrinogen-like 2, mRNA (cDNA clone IMAGE:7098857), partial cds.
117279	3,375	Flip; MGC108616	Rattus norvegicus FLIP short form mRNA, complete cds.
89833	0,444	Ftcd	golgi membrane associated 58K protein; Rattus norvegicus formiminotransferase-cyclodeaminase mRNA, complete cds.
298693	2,053	G1p2_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 9 ESTs, 2 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K) (predicted) (G1p2_predicted)
83585	3,906	GAH	hydrolase; guanine deaminase; guanase; GDA; similar to yeast ORF_YDL238c and Escherichia coli ORF_o439; Rattus norvegicus guanine aminohydrolase (GAH) mRNA, complete cds.
83781	2,011	gal-3; MGC105387	IgE binding protein; Rat IgE binding protein mRNA, complete cds.
366061	5,281	Galnt3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3; synonym: MGC124508; Rattus norvegicus UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (Galnt3), mRNA.
245708	0,438	GC-G	orphan receptor; Rattus norvegicus guanylyl cyclase-G (GC-G) mRNA, complete cds.
297902	3,784	Gem_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 11 ESTs, 10 Proteins; overriding stop codons; PREDICTED: Rattus norvegicus GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal mu
89788	2,329	Gna15	Rattus norvegicus mRNA for GTP binding protein alpha 15, complete cds.
84475	2,552	Gpr9	Rattus norvegicus chemokine receptor CXCR3 mRNA, complete cds.
312790	3,78	Gprc5a	synonym: Rai3; Rattus norvegicus G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A, mRNA (cDNA clone IMAGE:7125833), partial cds.
64045	2,13	Grx	Rattus norvegicus glutaredoxin (Grx) mRNA, complete cds.
29165	5,807	Gzmk	Rattus norvegicus tryptase 2 mRNA, complete cds.
29252	2,354	Gzmm	Rattus norvegicus serine protease mRNA, complete cds.

29415	2,294	H218; GPCR18; Gpcr13; snGPCR18	Rattus norvegicus G-protein coupled receptor pH218 mRNA, complete cds.
113990	2,105	Hmgn3	Rattus norvegicus high mobility group nucleosomal binding domain 3, mRNA (cDNA clone MGC:95173 IMAGE:7130894), complete cds.
24817	2,458	HNF1; Lfb1; Hnf1a; LF-B1	LF-B1 protein; Rat liver specific transcription factor (LF-B1) gene, complete cds.
171160	5,828	Hod	synonyms: Obl, Gllg15b; Rattus norvegicus homeobox only domain, mRNA (cDNA clone MGC:91403 IMAGE:7098349), complete cds.
292905	3,081	Hrc	Rattus norvegicus histidine-rich calcium binding protein (Hrc) mRNA, complete cds.
25116	6,887	Hsd11b1	corticosteroid 11-beta-dehydrogenase; Rat corticosteroid 11-beta-dehydrogenase (DHII) mRNA, complete cds.
25464	2,71	Icam1	synonyms: ICAM, CD54; Rattus norvegicus intercellular adhesion molecule 1, mRNA (cDNA clone MGC:93596 IMAGE:7122397), complete cds.
25261	2,096	Idb1; ID125A; MGC156482	Rattus norvegicus inhibitor of DNA binding mRNA, complete cds.
294091	2,401	Ifit2	Rattus norvegicus interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2, mRNA (cDNA clone MGC:114424 IMAGE:7446350), complete cds.
25712	3,859	IFN-gamma	Rattus norvegicus interferon gamma (IFN-gamma) mRNA, complete cds.
367586	5,34	IgG-2a; MGC109083; MGC109134	Rat anti-acetylcholine receptor antibody gene, rearranged Ig gamma-2a chain, VDJC region, complete cds.
299352	4,629	Igh-1a	Rattus norvegicus immunoglobulin heavy chain 1a (serum IgG2a), mRNA (cDNA clone MGC:109069 IMAGE:7374685), complete cds.
500169	2,076	IgK	Rat anti-neuropeptide substance P IgK chain NC1/34HL mRNA V-region.
24511	2,009	integrin beta-1	Rattus norvegicus integrin beta-1 subunit (integrin beta-1) mRNA, complete cds.
25599	5,937	INVG34	unnamed protein product; invariant chain gamma (AA 1 - 216); Rat mRNA for MHC-associated invariant chain gamma.
245920	2,582	IP-10	chemoattractant cytokine; Rattus norvegicus interferon inducible protein 10 (IP-10) mRNA, complete cds.
407761	2,019	Kb21	type II keratin Kb21; Rattus norvegicus type II keratin Kb21 (Kb21), mRNA.
93662	2,092	KIAA1775	KIAA1775 protein; Rattus norvegicus mRNA for KIAA1775 protein (MT-protocadherin), complete cds.
315740	2,093	Kif23_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 3 mRNAs, 22 ESTs, 3 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus kinesin family member 23 (predicted) (Kif23_predicted), mRNA.
300053	0,489	KIFC2	Rattus norvegicus mRNA for KIFC2 protein.
246274	0,493	Lfg; NMP35; MGC105316	NMP35; Rattus norvegicus neural membrane protein 35 mRNA, complete cds.
64355	0,43	Lisch7; MGC124592	Rattus norvegicus lipolysis-stimulated remnant receptor alpha subunit mRNA, complete cds.
286911	2,073	LOC286911	trypsinogen (EC 3.4.21.4); Rat pancreatic cationic trypsinogen mRNA, complete cds.
310721	2,271	LOC310721	Rattus norvegicus similar to 4930431B09Rik protein, mRNA (cDNA clone MGC:93859 IMAGE:7111947), complete cds.
317588	0,357	LOC317588; Ac1-163	liver regeneration related protein LRRG187; Rattus norvegicus Ac1-163 mRNA, complete cds.
499510	0,398	LOC499510	Rattus norvegicus similar to spermatogenic Zip 1, mRNA (cDNA clone MGC:94369 IMAGE:7133509), complete cds.
499971	0,311	LOC499971	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein 4931409K22, mRNA (cDNA clone MGC:94909 IMAGE:7111961), complete cds.
502372	2,483	LOC502372	Rattus norvegicus hypothetical protein LOC502372, mRNA (cDNA clone MGC:95271 IMAGE:7134037), complete cds.
296619	2,918	LRRGT00147	liver regeneration-related; Rattus norvegicus LRRGT00147 mRNA, complete cds.
297666	2,378	Ly49i1	formerly Ly-49.9 antigen; Rattus norvegicus Ly49 inhibitory receptor 1 (Ly49i1) mRNA, complete cds.
494204	2,35	Ly49i4	killer cell lectin-like receptor family A member; KLRA; Rattus norvegicus Ly49 inhibitory receptor 4 (Ly49i4) mRNA, complete cds.
266768	3,607	Ly49s3	killer cell lectin-like receptor subfamily A member; KLRA; receptor for nonclassical MHC Class I-encoded target ligands; initiates NK cell-mediated responses; alternatively spliced; Rattus norvegicus Ly49 stimulatory receptor 3 variant (Ly49s3) mRNA, comp
300839	3,026	Lysmd2_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 2 mRNAs, 39 ESTs, 4 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2 (predicted)
54267	2,925	Maf2; cMaf	maf-related bZip transcription factor. Rat cMaf homolog; Rattus norvegicus transcription factor Maf2 mRNA, complete cds.
58975	3,847	mafa	R.norvegicus mafa mRNA for mast cell function associated antigen.
25587	2,115	MGC105494	Rattus norvegicus mRNA for ID2 protein, complete cds.

302884	2,019	MGC105649	Rattus norvegicus hypothetical LOC302884, mRNA (cDNA clone MGC:105649 IMAGE:7301704), complete cds.
499108	0,491	MGC108974	Rattus norvegicus similar to replication protein-binding trans-activator RBT1, mRNA (cDNA clone MGC:108974 IMAGE:7321753), complete cds.
171528	4,196	MGC156565	Rat natural killer cell protease 1 (RNKP-1) precursor; Rat natural killer (NK) cell protease 1 (RNKP-1) mRNA, complete cds.
171528	4,093	MGC156565	R.norvegicus mRNA for granzyme-like protein III.
171528	2,227	MGC156565	R.norvegicus mRNA for granzyme-like protein I.
116637	2,981	MIP-1 beta	Rattus norvegicus macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP-1 beta) mRNA, complete cds.
29457	2,243	Mtap6	Rattus norvegicus mRNA for STOP protein.
369016	3,691	Myadm	Rattus norvegicus myeloid-associated differentiation marker, mRNA (cDNA clone MGC:94064 IMAGE:7123822), complete cds.
171296	0,402	myo9a	Rattus norvegicus mRNA for myosin-RhoGAP protein Myr 7.
360034	0,34	Myrip	Slac2c; Slac2-c; exophilin 8; rab effector MYRIP; Rattus norvegicus myosin VIIA and Rab interacting protein (Myrip) mRNA, complete cds.
117955	3,124	NBC	Rattus norvegicus putative sodium bicarbonate cotransporter (NBC) mRNA, complete cds.
291044	3,316	Nedd9	Rattus norvegicus neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9, mRNA (cDNA clone MGC:94019 IMAGE:7121465), complete cds.
25338	2,022	Ninj1	plasma membrane protein; gene up-regulated after nerve injury in neurons and Schwann cells; Rattus norvegicus ninjurin1 mRNA, complete cds.
29683	3,885	NKG2A	type II integral membrane protein; C-type lectin superfamily; Rattus norvegicus natural killer cell protein group 2-A (NKG2A) mRNA, partial cds.
29684	5,736	NKG2C	type II integral membrane protein; C-type lectin superfamily member; Rattus norvegicus natural killer cell protein group 2-C (NKG2C) mRNA, complete cds.
171062	3,828	Nkg7	similar to Homo sapiens GMP-17/ NKG7/ GIG-1; expressed by NK, CD8+, activated T, and macrophage R2 cells; four-pass granule membrane protein; Rattus norvegicus type III multi-pass transmembrane protein mRNA, complete cds.
58853	3,228	NOR-2	thyroid/steroid receptor superfamily; Rattus norvegicus mRNA for NOR-1, complete cds.
289419	5,976	Nuak2	synonyms: Snark, 1200013b22rik; Rattus norvegicus NUA family, SNF1-like kinase, 2, mRNA (cDNA clone MGC:93817 IMAGE:7110518), complete cds.
64709	2,145	NUCKS	Rattus norvegicus mRNA for nuclear casein kinase and cyclin dependent kinase substrate (NUCKS gene).
192281	2,233	Oas1g; MGC93097	R.norvegicus mRNA for 2'5' oligoadenylate synthetase.
113937	2,624	Ocil	OCIL; Rattus norvegicus osteoclast inhibitory lectin (Ocil) mRNA, complete cds.
24904	0,482	Oct1; Orct1; Roct1; MGC93570	R.norvegicus mRNA for cation transporter.
405362	2,097	Olr1073_predicted	olfactory receptor 1073 (predicted); synonym: Olr1073; olfactory receptor gene Olr1073; Rattus norvegicus olfactory receptor 1073 (predicted) (Olr1073_predicted), mRNA.
405384	0,415	Olr283_predicted	olfactory receptor 283 (predicted); synonym: Olr283; olfactory receptor gene Olr283; Rattus norvegicus olfactory receptor 283 (predicted) (Olr283_predicted), mRNA.
309221	2,862	Olr318_predicted	olfactory receptor 318 (predicted); synonym: Olr318; olfactory receptor gene Olr318; Rattus norvegicus olfactory receptor 318 (predicted) (Olr318_predicted), mRNA.
404802	2,46	Olr757_predicted	olfactory receptor 757 (predicted); synonym: Olr757; olfactory receptor gene Olr757; Rattus norvegicus olfactory receptor 757 (predicted) (Olr757_predicted), mRNA.
405207	0,497	Olr837	Rattus norvegicus isolate QFG-TN1 olfactory receptor mRNA, partial cds.
25380	3,047	p35; Anx1	calpactin II; Rat calpactin II (LCI) mRNA, complete cds.
24631	2,075	Pem	homeobox transcription factor; RHOX5; placenta and embryo oncofetal (Pem) homeobox; Rattus norvegicus reproductive homeobox on X chromosome 5 mRNA, complete cds.
298107	0,366	PGCL6	Rattus norvegicus mRNA for alpha-2u globulin, complete cds, clone:PGCL7.
290636	0,388	Pgls_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 5 mRNAs, 38 ESTs, 3 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus 6-phosphogluconolactonase (predicted) (Pgls_predicted), mRNA.
170913	3,36	Pgy1	ATP-binding cassette transport protein; Abcb1a; Rattus norvegicus multidrug resistance protein 1a (Pgy1) mRNA, complete cds.
309419	2,683	Pip5k1a	Rattus norvegicus phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 alpha, mRNA (cDNA clone MGC:105713 IMAGE:7311399), complete cds.
24655	2,758	Plcd1	phospholipase C, delta 1; synonym: Plc1; Phospholipase C-delta1; Rattus norvegicus phospholipase C, delta 1 (Plcd1), mRNA.
298906	3,435	Pqlc3	synonym: RGD1306818; Rattus norvegicus PQ loop repeat containing 3, mRNA (cDNA clone MGC:93745 IMAGE:7108131), complete cds.
286988	2,122	Prol2	Rattus norvegicus proline rich protein mRNA, complete cds.
24686	4,583	PrP; Prn	prion-related protein; Rat prion-related protein (PrP) mRNA, 3' end.

303887	2,169	pSMC	Heterodimeric complex composed of a mucin subunit, ASGP-1, which is predominantly O-glycosylated, and a cysteine-rich transmembrane subunit, ASGP-2, which is predominantly N-glycosylated; Rattus norvegicus Fisher 344 pre-sialomucin complex (pSMC) mRNA, re
498407	2,127	pur-beta	Rattus norvegicus pur-beta mRNA for transcription factor Pur-beta, complete cds.
84385	0,242	PXR; MGC108643	Rattus norvegicus pregnane X receptor mRNA, complete cds.
308003	2,085	Rab11fip2_predicted	Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7457459.
56820	2,907	Ramp3	Rattus norvegicus mRNA for receptor activity modifying protein 3, complete cds.
312664	0,422	Rasgef1a_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA, 57 ESTs, 1 Protein; PREDICTED: Rattus norvegicus RasGEF domain family, member 1A (predicted) (Rasgef1a_predicted), mRNA.
313488	2,48	Reck_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 31 ESTs, 2 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (predicted) (Reck_pr
252917	2,388	REV-ERBAALPHA	Rat Rev-ErbA-alpha protein mRNA, complete cds.
361988	2,035	RGD1304593_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 5 mRNAs, 201 ESTs, 3 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to expressed sequence C77668 (predicted) (RGD1304593_predicte
289727	2,495	RGD1305719_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 2 mRNAs, 152 ESTs, 4 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to putative N-acetyltransferase Camello 2 (predicted) (RGD130
312303	0,468	RGD1306209	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA, 69 ESTs, 1 Protein; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ31413 (RGD1306209), mRNA.
293613	2,249	RGD1309350_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA, 18 ESTs, 2 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to transthyretin (4L369) (predicted) (RGD1309350_predicted), mR
308561	2,073	RGD1309564	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 4933405K07, mRNA (cDNA clone MGC:94396 IMAGE:7134052), complete cds.
315579	2,052	RGD1310357_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 6 mRNAs, 28 ESTs, 5 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 2810457I06 (predicted) (RGD1310357_predicted), m
293949	0,397	RGD1310475_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 57 ESTs, 1 Protein; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 0610010D20 (predicted) (RGD1310475_predicted), mRNA.
297077	2,347	RGD1310725	synonym: 0610011i04rik; Rattus norvegicus hypothetical LOC297077, mRNA (cDNA clone MGC:112703 IMAGE:7323021), complete cds.
317051	2,165	RGD1311317_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 15 ESTs, 4 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 4930507C10 (predicted) (RGD1311317_predicted), mRNA.
300870	2,245	RGD1311381_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA, 119 ESTs, 15 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ20037 (predicted) (RGD1311381_pred
299354	3,078	RGD1359539	Rattus norvegicus similar to Ig gamma-1, chain C region, mRNA (cDNA clone MGC:109111 IMAGE:7379698), complete cds.
499668	2,184	RGD1562025_predicted	similar to leucine rich repeat neuronal 6D (predicted)
308742	2,768	RGD1562967_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 3 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to multiple C2-domains with two transmembrane regions 2 (predicted) (RGD1562967_
499756	2,273	RGD1564362_predicted	similar to lipocalin (predicted)
499535 499534	7,499	RGD1564743_predicted	RGD1564743 (predicted)
361541	2,038	RGD1565712_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 Protein; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Hypothetical protein MGC59495 (predicted) (RGD1565712_predicted), mRNA.
308341	0,375	RGD1565772_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 12 ESTs, 8 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein A430110N23 (predicted) (RGD1565772_predicted),

304020	2,811	RGD1565927_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 2 mRNAs, 79 ESTs, 7 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 4631422O05Rik protein (predicted) (RGD1565927_predicted), m
364304	2,184	Rnase1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic); synonym: Rib1; ribonuclease 1 pancreatic; ribonuclease RNase A family 1; pancreatic ribonuclease; Rattus norvegicus ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic) (Rnase1), mRNA.
171290	4,152	RNKP-4	serine protease, granzyme; Rattus norvegicus natural killer cell protease 4 (RNKP-4) mRNA, complete cds.
300807	5,642	Rora_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 8 mRNAs, 140 ESTs, 17 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus RAR-related orphan receptor alpha (predicted) (Rora_predicted), mRNA
300807	3,915	Rora_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 8 mRNAs, 140 ESTs, 17 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus RAR-related orphan receptor alpha (predicted) (Rora_predicted), mRNA
361715	2,218	Rps6ka4_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA, 89 ESTs, 52 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 4 (predicted) (Rps6ka4_predic
309622	3,324	RT1-Bb	synonyms: RT1.B-BETA1, RT1-B beta, RT1.B, RT1.Bbeta; Rattus norvegicus RT1 class II, locus Bb, mRNA (cDNA clone MGC:94124 IMAGE:7126686), complete cds.
294269	15,62	RT1-Daa	Rattus Norvegicus mRNA for MHC class II RT1-D alpha chain haplotype a.
294273	5,094	RT1-DMb; RT1.DMb	R.norvegicus mRNA for RT1.Mb.
445415	3,138	S100a11	S100A11; calgizzarin; Rattus norvegicus S100 calcium-binding protein A11 mRNA, complete cds.
81780	4,755	Scya5; Rantes	Rattus norvegicus Long Evans RANTES mRNA, complete cds.
290562	2,268	Sema3G	CSG53; Rattus norvegicus Sema3G mRNA for semaphorin 3G, partial cds.
313057	0,307	Serinc2	synonym: Tde2l; Rattus norvegicus serine incorporator 2, mRNA (cDNA clone MGC:116219 IMAGE:7457983), complete cds.
79431	3,006	SHARP-2	contains basic helix-loop-helix structure; Sharp-2; Rattus norvegicus enhancer-of-split and hairy-related protein 2 (SHARP-2) mRNA, complete cds.
365398	2,033	Slc22a12	solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 12; synonyms: Rst, Slc22a12, MGC124974; solute carrier family 22 (organic cation transporter)-like 2; Rattus norvegicus solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member
303380	2,104	Slfn2_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 14 ESTs, 5 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus schlafen 2 (predicted) (Slfn2_predicted), mRNA.
315344	2,216	Smug1	Rattus norvegicus single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase (Smug1) mRNA, complete cds.
365396	0,487	Ssh3	Rattus norvegicus slingshot homolog 3 (Drosophila), mRNA (cDNA clone MGC:94343 IMAGE:7133065), complete cds.
83783	2,361	Stm; Stp1; ASTIV; Mx-ST; PST-1; St1a1; Sult1a3	Rat minoxidil sulfotransferase mRNA, complete cds.
292483	4,163	Stx11	Rattus norvegicus syntaxin 11, mRNA (cDNA clone MGC:116325 IMAGE:7381603), complete cds.
292301	6,374	T_predicted	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 1 EST, 25 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus T, brachyury homolog (mouse) (predicted) (T_predicted), mRNA.
25066	3,191	Tage4	Ig-related sequence; Rattus norvegicus tumor-associated glycoprotein E4 (Tage4) mRNA, complete cds.
304109	2,296	Tiam1	Derived by automated computational analysis using gene prediction method: GNOMON. Supporting evidence includes similarity to: 34 ESTs, 2 Proteins; PREDICTED: Rattus norvegicus T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 (Tiam1), mRNA.
353229	2,401	Tmem23	synonym: Mob; Rattus norvegicus transmembrane protein 23, mRNA (cDNA clone MGC:93062 IMAGE:7113038), complete cds.
362490	2,046	Tmem55a	synonyms: MGC114565, RGD1306225; Rattus norvegicus transmembrane protein 55A, mRNA (cDNA clone MGC:114565 IMAGE:7461463), complete cds.
24835	2,42	TNFa	Rattus norvegicus mRNA for tumor necrosis factor alpha propeptide.
353218	9,529	Tnfsf9	TNFSF9; receptor 4-1BB ligand; Rattus norvegicus tumor necrosis factor superfamily member 9 (Tnfsf9) mRNA, complete cds.
304884	2,278	Tor3a	Rattus norvegicus torsin family 3, member A, mRNA (cDNA clone MGC:105766 IMAGE:7318816), complete cds.
116596	2,234	Tpl-2	Rattus norvegicus serine/threonine protein kinase (Tpl-2) mRNA, exons 1-7 and complete cds.
259237	3,847	trg	R.norvegicus trg mRNA.
287824	0,355	Trim47_predicted	synonym: Trim47; Rattus norvegicus tripartite motif protein 47 (predicted), mRNA (cDNA clone IMAGE:7134879), partial cds.

29168	8,438	ubd	Rattus norvegicus mRNA for diubiquitin (ubd gene).
29545	0,282	Uchl1	neuron-specific isoform; Rattus norvegicus mRNA for ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase PGP9.5, complete cds.
null	2,806	UV118	Rattus norvegicus ultraviolet B radiation-activated UV118 mRNA, partial sequence.
192225	2,249	Wmp1; RSD-3	Rattus norvegicus fertility related protein WMP1 mRNA, complete cds.
497101	0,367	XRG2	XRG2; Rattus norvegicus XK-related protein 2 mRNA, complete cds.
362325	8,023		
309621	7,892		
60463	6,605		
null	5,814		
364049	5,525		
null	5,193		
501069	5,161		
305679	4,748		
301044	4,583		
500170	4,545		Rattus norvegicus clone 122.33 immunoglobulin kappa light chain variable region mRNA, partial cds.
58834	4,149		
498951	4,055		
408234	3,963		
null	3,92		
171333	3,733		
null	3,666		
null	3,61		
304982	3,573		
null	3,566		
null	3,515		
303511	3,447		
303412	3,394		
309866	3,379		
367218	3,227		
305142	3,166		
85384	3,022		
301365	2,968		
null	2,94		
266731	2,875		
313806	2,861		
361543	2,854		
360932	2,854		
null	2,816		
310917	2,804		
300228	2,796		
363058	2,756		
null	2,749		
361604	2,699		
null	2,685		
499486	2,649		
116696	2,648		
null	2,644		
null	2,642		
null	2,641		
null	2,621		
null	2,605		

503027	2,593		
25713	2,579		
266688	2,573		
null	2,553		
null	2,553		
null	2,534		
498016	2,524		
308142	2,498		
296257	2,487		
null	2,47		
291448	2,464		
null	2,447		
null	2,394		
null	2,391		
null	2,388		
246097	2,381		NGF/TNF-receptor-related protein; Rattus norvegicus mRNA for Fas antigen.
317219	2,377		
297096	2,376		
null	2,37		
null	2,368		
365394	2,355		
303252	2,355		
313484	2,345		
361128	2,336		
502529 4996 08 310390 49 9609	2,316		
291540	2,315		
304005	2,314		
252971	2,29		
305073	2,263		
null	2,258		
315352	2,255		
293823	2,247		
367315	2,243		
null	2,241		
314384	2,236		
282585	2,233		liver regeneration-related protein LRRG197; Rattus norvegicus Ab2-450 mRNA, complete cds.
266611	2,227		
362485	2,201		
367236	2,201		
502306	2,193		
null	2,185		
502334	2,174		
null	2,17		
304522	2,154		
304289	2,15		
25227	2,146		
null	2,143		
null	2,139		
null	2,136		
null	2,123		

null	2,111		
313027	2,091		
null	2,089		
null	2,089		
null	2,088		
null	2,088		
null	2,084		
362873	2,074		
290646	2,07		
362275	2,069		
null	2,067		
306782	2,055		
304818	2,048		
502760	2,048		
null	2,046		
365793	2,045		
494339	2,043		
null	2,039		
null	2,037		
83718	2,031		
null	2,028		
null	2,027		V-J region; Rattus norvegicus T cell receptor mRNA, partial cds.
171334	2,027		
null	2,024		
null	2,021		
null	0,496		
503568	0,494		
null	0,492		
null	0,473		
null	0,473		
null	0,472		
361113	0,465		
null	0,46		
null	0,455		
500248	0,446		
null	0,443		
290156	0,442		
null	0,418		
308910	0,416		
293509	0,413		
287478	0,412		
null	0,407		
null	0,4		
null	0,398		
null	0,382		
null	0,376		
null	0,356		
501170	0,351		
null	0,35		
null	0,347		
null	0,342		

null	0,342		
null	0,339		
361452	0,326		
null	0,321		
362633	0,32		
null	0,286		
311633	0,27		
null	0,261		

Annexe 3 : Comparison of islet CTLA4-Ig production using recent viral vectors.

M Angin, F Boeffard, J Kerr-Conte, N Benrezak, F Pattou, I Anegon, B Le Mauff

Manuscript

Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) U643 and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France.

Corresponding author: B. Le Mauff, e-mail: lemauff-b@chu-caen.fr.

Abstract

Genetic engineering using recombinant adenoviruses offers an opportunity to modify islet grafts in order to prevent allograft rejection or improve graft protection. We have already shown that Ad-CTLA4Ig transduced islets had a prolonged survival in allograft rat recipients. However the vector associated toxicity limited the optimal use of this strategy. In order to improve this strategy we tested the efficiency of various other viral vectors derived from adeno-associated-virus or lentivirus to transduce rat or human islets using vectors coding for GFP or CTLA4Ig. AAV1 was the most efficient in rat islets while AAV2 was better for human islets. In terms of production of CTLA4Ig these vectors were far less potent than adenovirus with roughly 4 times less secretion of CTLA4Ig by transduced islets. Furthermore at the MOI of 1×10^7 ip/islet of AAV1 there was a limited but significant impairment of rat islet response to glucose stimulation. In addition when transplanted in syngeneic recipients, no graft function could be obtained. In conclusion, neither AAV nor lentivirus transduction in conditions compatible with islet function could reach the level obtained with adenovirus. Consequently ex-vivo transduction of islets using viral vectors might not allow the analysis of the benefit of local production of a costimulation inhibitor such as CTLA4Ig at least in a rat model.

Introduction

Islet transplantation is a potential solution for the restoration of β cell function in diabetic patients but chronic immunosuppression and high rates of rejection remain obstacles for a wider application of this therapeutic strategy. The in vitro manipulation of islets after isolation offers the opportunity for genetic engineering to protect them from rejection. Consistent gene transfer had been obtained using adenoviral gene vectors [Becker, 1994 #92; Csete, 1995 #21; Sigalla, 1997 #54] allowing with appropriate targeted gene to delay graft rejection [Feng, 1999 #25; Giannoukakis, 2000 #80; Laumonier, 2003 #39; Machen, 2004 #139; Rehman 2007]. More recently alternative vectors have been developed to prevent the limitations of adenoviral technology such as shortness of expression or immunogenicity. Adeno-associated virus (AAV) and lentivirus provide some clues to these problems. AAV have been shown to allow efficient gene delivery in islets [Prasad, 2000 #91; Flotte, 2001 #79; Rehman, 2005 #201] as well as lentivirus [Gallichan, 1998 #28; Giannoukakis, 1999 #29; Kobinger, 2004 #124; Fernandes, 2004 #185]. Nevertheless, no extensive comparison of the efficacy of all these vectors in local transgene production is available allowing defining the more powerful strategy to apply in vivo. Indeed using adenovirus-mediated gene delivery of CTLA4Ig into islets to obtain local production of CTLA4Ig we have observed delayed rejection in a rat allograft model. However this effect remained limited in comparison to systemic production [Laumonier, 2003 #39]. Increasing the MOI of the adenoviral vector did not allow to reach an efficient level of CTLA4Ig as the vector induced toxicity prevents islet function. In this study we decided to compare all available vectors to transduce islets in order to select the most potent vector to target CTL4Ig production and to evaluate the effect of the local production of this costimulation signaling inhibitor in rat islet allograft survival.

Materials and methods

Animals. Male inbred Lewis rats were obtained from Janvier (CERJ, Le Genest St.Isle, France). Animals were allowed unlimited access to food and water.

Viral vectors. Recombinant adenoviruses derived from serotype 5 were constructed, propagated, purified and titered as previously described [David, 1998 #652]. Recombinant AAVs were manufactured as described [Chenuaud, 2004 #33], purified by cesium chloride density gradients and extensive dialysis against phosphate buffered saline (PBS). Vector stocks were titered using dot blot assays to determine the number of vector genome/ml. AAV with different serotypes were prepared using the cassette of interest designed with AAV2 ITR and encapsidated with the selected capsids (AAV1, AAV2, AAV4 5 or 8). For AAV5, an AAV5 cassette was also available (AAV5/5).

Lentiviral vectors (HIV and SIV) were generated as previously described and the cell supernatants were recovered 2 and 3 days post-transfection, filtered through 0.45 μm membranes and ultracentrifuged. Pellets were resuspended in PBS. Vectors were pseudotyped with VSV-G and contained the cis-acting cPPT from HIV-1. The posttranscriptional regulatory element from the woodchuck hepatitis virus was inserted in HIV derived vectors.

Adenovirus and AAV vectors were available with a GFP reporter gene under the transcriptional control of a human CMV promoter. Some AAV (AAV1, 2, 2/5) were also available with a PGK promoter. In HIV-lentivirus GFP was also under the control of PGK promoter while SIV vectors contained a CMV promoter. A cassette encoding for CTLA4Ig comprising the extracellular portion of mouse CTLA4 fused to the Fc portion of the human IgG1 gene under the transcriptional control of a human CMV promoter [Guillot, 2000 #649] was used. Another cassette was prepared with deletion of intronic sequences of the IgG1 Fc, under the control of either CMV or PGK promoters for HIV-lentiviral vector.

Pancreatic islet isolation and transduction. Rat islets were prepared by intraductal collagenase digestion and ficoll gradient purification using standard techniques [Lacy, 1967 #372], as previously described [Laumonier, 2003 #954]. After handpicking islets were maintained in culture overnight in Iscove medium with 10% heat inactivated FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin-fungizone and 2 mM glutamine (all from Sigma) at 30°C, 5% CO₂. (30° ou 37°C?)

Human islets were prepared from pancreas collected according to the Biomedicine Agency rules of transplant assignation using standardized techniques certified ISO 9001:2000. Purified islets were maintained in CMRL/0.625% human serum albumin Steam Ease 1% and transferred from lab to lab within 24h.

Islet transduction. Islets were centrifuged, washed and incubated in 100 µl of adenoviral preparation, in Iscove/1% FCS for 45 min at 37°C, 5% CO₂. The multiplicity of infection (MOI) was calculated assuming 1000 cells per islet, at 10³ or 10⁴ infectious particles (ip)/islet. AAV were added in Iscove/10% FCS for 6h from 3x10³ to 3x10⁷ vg/islet and lentiviruses from 1x10³ to 10x10³ ip/islet. After incubation, 700 µl of complete medium were added.

GFP assessment. Cultures were examined using a fluorescent microscope (Zeiss Axiovert25) and microphotographed with a Nikon Coolpix 4500. FACS analysis was performed on a FASCalibur (Becton-Dickinson) after dissociation using trypsin-EDTA.

Quantification of CTLA4Ig. CTLA4Ig was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described [Guillot, 2000 #649]. Plates (Maxisorp, Nunc, Denmark) were coated with 50 µl of hamster anti-murine CTLA4 specific antibody (4F10, kindly provided by Dr J. Bluestone, UCSF, CA) and saturated with PBS-0.5% Tween for 1 hr at 37°C. Duplicates of supernatant were serially diluted in blocking buffer, were incubated for 1h30 at 37°C. After washing a biotin conjugated donkey anti-human IgG (Fcγ specific, Jackson Laboratories) were added for 90 min followed by peroxidase labeled streptavidin for 1 hr at 37°C. The reaction was developed using ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonat-6, Roche) and absorbance was read at 405nm (MRX, Dynatech).

In vitro islet function. Fifteen islets control or transduced (6 replicates respectively) were washed extensively, and incubated for 1 hr in Krebs Ringer Bicarbonate solution with 0.5% albumin and 3 mM

or 18 mM glucose or 18 mM glucose and 20 mM arginine. Supernatants were then collected and insulin assayed by RIA (Insulin CT, ORIS Industrie, Gif-sur-Yvette, France). The results were standardized to the number of islets and expressed as mean \pm SD (pg/islet/hr). The stimulation index (insulin secretion by islet incubated with 20 mM arginine/insulin secretion by islet incubated with 3.3 mM glucose) was calculated.

Pancreatic islet transplantation. Transduced rat islets were grafted in syngeneic recipients rendered diabetic by a single 170 mg/kg ip injection of streptozotocin (Sigma) one week before transplantation. Only rats with blood sugar levels (BSL) > 400 mg/dl were used. Under isoflurane anesthesia, approximately 3000 LEW islets were placed under the left renal capsule. Graft function was monitored by BSL measurement using a glucose monitor system (ref??). Successful islet engraftment was defined as BSL < 200 mg/dl for at least 48h.

Statistics. Results from glucose stimulation assay were performed using a non-parametric ANOVA (Kruskall-Wallis) with post-test if $p < 0.05$. Values were considered significantly different when $p < 0.05$.

Results

Assessment of transduction of islet using GFP

Adenoviruses were the first viral vectors successfully used to transduce islets. More recently AAV and lentivirus have been developed. We compared all types of vectors on rat islets. AAV were tested from 3×10^3 to 3×10^7 /islet with no saturation effect. AAV1 was the most potent followed by AAV4 and 8 (fig1). These results were confirmed by fluorescence measurement using a fluorimeter (data not shown). With higher MOI of AAV4 there was a tendency to alteration of islet structure with dissociation and loss of viability. Lentiviral vectors were tested from 1×10^3 to 1×10^4 ip/islet. SIV vectors were less efficient than HIV vectors (fig1). The kinetics of expression of GFP expression after AAV was slower than with Ad, but was already significant at d3 and increased during the following 3 weeks and then remained stable during the following month. In contrast, with lentivirus expression was faster remained stable during 3 weeks and then decreased. In contrast, after Ad transduction expression was already strong at 24h (data not shown) and peaked at d7 but tend to decrease after 3 weeks. At this time islet viability of Ad transduced was more altered even with suboptimal MOI (1×10^3 or 1×10^4 ip/ilot *10 fois moins que pfu*) .

These results were confirmed by FACS analysis of transduced islets after cell dissociation. In these conditions, almost 80% of the cells were detected as positive whereas 20 % were positive after AAV1 transduction and almost 40 % with HIV. (Fig 2)

In contrast with rat islets AAV2 was the most efficient of the AAV tested for human islets transduction with 10% of positive cells and 15% with HIV lentivirus. (Fig3)

As lentivirus and AAV did not used the same promoters, we compared the efficiency of PGK and CMV when AAV were available with either promoters. Using AAV1, 4 and 8 expression of GFP was always stronger when driven by CMV promoter rather than PGK (data not shown) and thus used for AAV vectors prepared for CTLA4Ig.

Levels of CTLA4Ig production after transduction.

In order to compare more precisely the efficacy of these vectors we transduced islets with vectors encoding for CTLA4Ig and measured the production of the protein in cell supernatants. We observed that AAV1 vectors allowed the production of 7 times more CTLA4Ig than AAV8 did, but was consistently less efficient (3 times) than Ad vector (fig 4A). In contrast to GFP expression we observed that HIV could not induce the production of CTLA4Ig. This was also seen with human islets which produced roughly the same amount of CTLA4Ig that rat islets after Ad transduction and a significant amount with AAV2 but not after HIV-lentivirus transduction.

To eliminate a possible effect of the presence of introns in the coding sequence of CTLA4Ig we tested a cassette where these sequences were deleted without significant effect on the production (data not shown).

Effect of transduction on islet function.

After transduction the function of rat islets was measured after glucose stimulation. Transduced islets either by AAV1 or HIV were able to produce a significant amount of insulin after glucose or glucose+arginine. However, there was a trend to reduced production of insulin when islets were transduced by AAV1 vectors (fig5).

Furthermore, when tested in vivo, no normalization of glycemia could be obtained with AAV1 (n=6) or HIV vectors (n=3) in contrast to the efficacy of Ad vectors.

Discussion

Local production of immunomodulatory molecules after islet transduction by viral vectors has been shown to delay graft rejection. Among them AdCTLA4Ig has been shown to be efficient in various transplantation models including islet allo [Chahine, 1995 #16; Hayashi, 2005 #216; Potiron, in press #179] or xenotransplantation. [Chahine, 1995 #16; Hayashi, 2005 #216; Potiron, in press #179]. However optimal islet transduction could not be obtained in rat islets using adenoviral vectors [Laumonier, 2003 #39]. Consequently we compared AAV and lentivirus to adenovirus in their ability to transduce rat and human islets.

In rat islets, AAV1 was the most efficient among the various AAV serotypes. This was in agreement with results from loiler and wang although AAV6 had been shown to be more efficient (wang).

In contrast in human islets AAV2 was more efficient. The kinetics of AAV was slower than the one observed with Ad but the possibility to use double stranded AAV than shortened significantly the lag time of transgene expression. In contrast to adenovirus the expression was more stable in culture mainly due to preservation of islet viability.

HIV-Lentiviral vectors were more efficient than SIV derived vectors and allowed a rapid and important GFP expression. However we could not obtain a significant production when CTLA4Ig coding sequences were used, despite the elimination of intronic sequences suggesting that the absence of production was not related to the presence of non coding sequences. This problem was not specific of islets as the vectors were tested on other cells in vitro with very poor efficacy as compared to the adenoviral vectors.

With none of these vectors were the levels of production observed after adenovirus transduction obtained, suggesting that the requirement for higher production will not be reached with these new tools. In addition the potential advantage on islet viability was not observed as in vitro function was slightly impaired after AAV transduction. Furthermore no graft function could be obtained in syngeneic transplantation of AAV or HIV transduced islets. Indeed the MOI used were very high but were selected to obtain as high levels of transgene as possible. Nevertheless even in these conditions they remained lower than with adenovirus.

In contrast to the mouse model, rat islet might be more sensitive to vector toxicity. This toxicity might be the consequence of an inflammatory and immune response elicited by the adenovirus, subjecting the islets to the effects of many cytokines and/or O₂ or NO derivatives to which rat islets are highly sensitive [Hadjivassiliou, 1998 #822; Eizirik, 1996 #821; Kroncke, 1993 #825].

Altogether, these results suggest that the in vitro manipulation remain a delicate procedure with still limited efficacy. The attempts to target islet specifically after in vivo injection of AAV6 or AAV8 (wang / rehman) are not devoid of interest but will not be applicable to islet modification for transplantation .

Acknowledgements. This work was financed in part by the Agence de la Biomedecine and CPER. We thank people of the animal facility for animals' care and **J Ashton** for correcting the English. We are grateful to researchers who contributed with reagents and to the Gene Vector Production Network of the Association Française contre les Myopathies at the Centre Hospitalier Universitaire de Nantes for producing recombinant viruses.

Legends

Figure 1. Expression of GFP by transduced rat islets. Islets were transduced, with 1×10^7 ip/islet of AAV 1, 2, 4, 5, 8, 5/5, 1×10^3 ip/islet of Ad, and 10 vg of HIV or SIV-lentiral vectors. Islets were maintained in culture and microphotographies were realized at different times. Here are shown data from D7 and 20.

Figure 2. FACS analysis of GFP expression. After transduction as described in fig 1 islets were kept in culture for 6 days and dissociated before FACS analysis. Percentage of positive cells are indicated as well as the mean florescence intensity of positive cells (MFI).

Figure 3. Expression of GFP by transduced human islets. Islets were transduced, with 1×10^7 ip/islet of AAV 1, 2, 4, 5, 8, 1×10^3 ip/islet of Ad, and 10 vg of HIV-lentiral vectors. Islets were maintained in culture and microphotographies were realized at different times. Here are shown data from D13 and 20

Figure 4 Levels of circulating CTLA4Ig. Islets were transduced, with 1×10^7 ip/islet of AAV 1, 2, 5, 8, 1×10^3 ip/islet of Ad, and 10 vg of HIV-lentiral vectors encoding for CTLA4Ig. After 14 days, supernatants were collected and cumulative CTLA4Ig production measured by ELISA.

Figure 5 In vitro rat islet function. After AAV1- and HIV-GFP transduction islets were kept in culture for 2 days. Replicates of 15 islets (n=-6) were then submitted to glucose stimulation (3mM, 18mM 18mM+Arginin 20mM) for 1h and supernatants were collected for insulin measurement using radio-immunoassay.

Figure 1

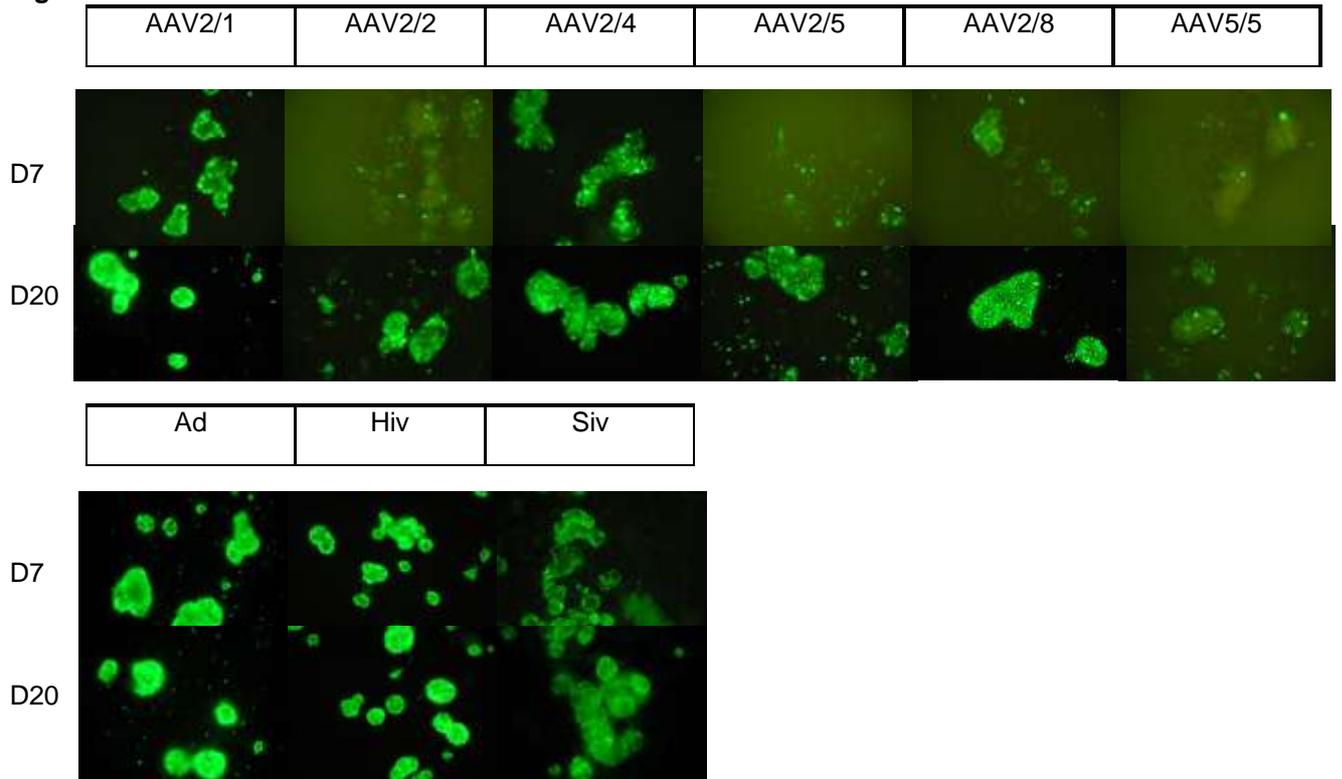


Figure 2

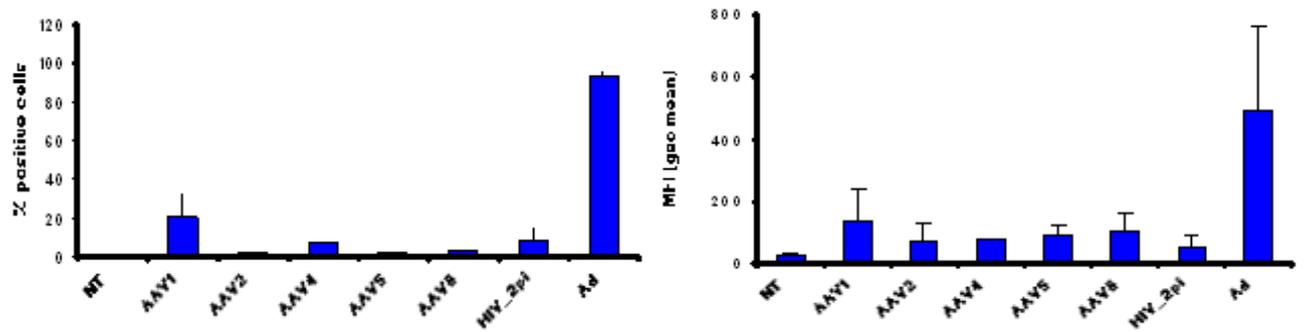


Figure 3

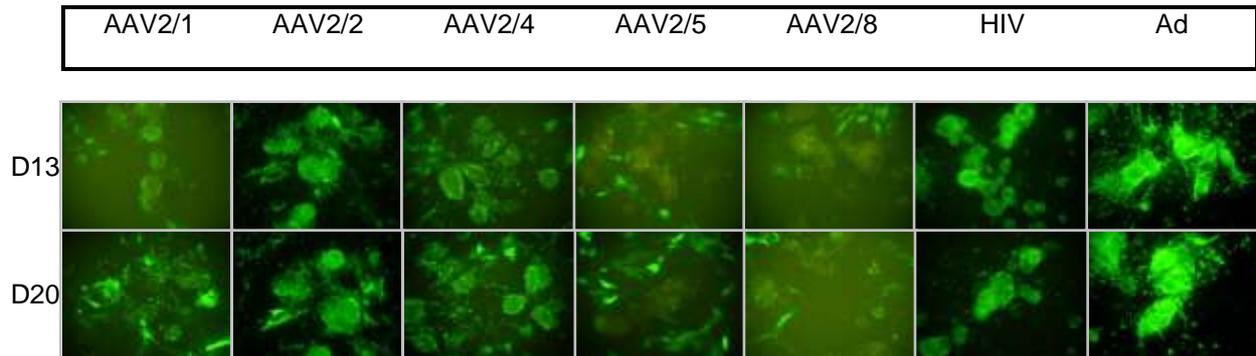
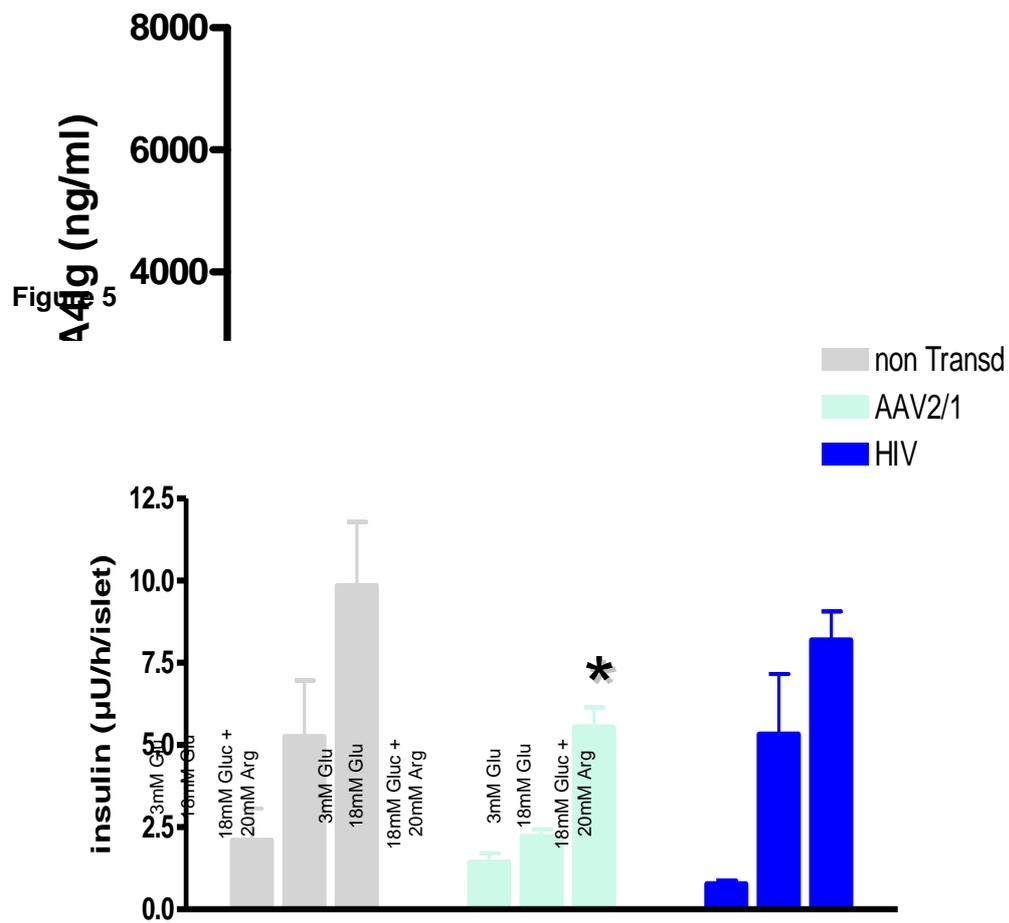


Figure 4



Annexe 4 : Promises and Obstacles for the Blockade of CD40–CD40L Interactions in Allotransplantation

Xian-Liang Li, Séverine Ménoret, Brigitte Le Mauff, Mathieu Angin, and Ignacio Anegón
Transplantation 2008;86: 10–15

MINI REVIEW

Promises and Obstacles for the Blockade of CD40–CD40L Interactions in Allotransplantation

Xian-Liang Li, Séverine Ménoret, Brigitte Le Mauff, Mathieu Angin, and Ignacio Anegón

Although clinical trials using anti-CD40L mAb have been halted, blockade of CD40–CD40L interactions has given promising results in rodent and nonhuman primate models. Recently, new insights into the consequences of blocking CD40–CD40L interactions have led to the possibility of overcoming the thromboembolic complications previously associated with this strategy and may pave the way for successful tolerance induction. This mini review will address the issues relating to CD40–CD40L blockade in allotransplantation.

Keywords: Costimulation, Transplantation, Tolerance, CD40, CD154, CD8⁺ Treg.

(*Transplantation* 2008;86: 10–15)

The costimulatory function of CD40 is critical not only for the function of antigen presenting cell (1) but also for that of activated CD4⁺ (2) and memory CD8⁺ T cells (3). A functional CD40–CD40L pathway is critical for effective T-cell activation and recruitment of leukocytes into the allograft, and for promoting the development of Th1 responses. Th1 cytokines promote macrophage-dependent cell-mediated immune responses which have been implicated in chronic graft rejection. Ligation of CD40 on B cells induces B cells proliferation and augments the antigen presenting capacities of B cells and antibody production (4), which promotes the humoral immune response and is critical for both acute and chronic rejection. Interaction of CD40–CD40L are also important for the activation of dendritic cells (DCs), endothelial cells (ECs), fibroblasts, and platelets, which are also critical mediators of allograft rejection (1).

CD40L (or CD154) has been shown to be constitutively expressed by several cell types and to increase upon activation—as a result of de novo synthesis but also because of preformed cytoplasmic stores (Table 1). CD40L was first identified on the surface of activated CD4⁺ T cells and has subsequently been detected in platelets, B cells, CD8⁺ T cells, DCs, and ECs. Its expression does not seem to be limited to the cell surface or

cytoplasm because it also exists as a soluble extracellular protein (Table 1). The expression levels of CD40L can be decreased after interactions with CD40-expressing cells (5). Coexpression of CD40 and CD40L has been detected in B cells, T cells, ECs, DCs, and macrophages (Table 1), suggesting a possible paracrine and T-DCs bidirectional interaction.

Blockade of the CD40–CD40L pathway has been shown to promote allograft acceptance in several animal models (Table 2). These mechanisms include deletion of alloreactive CD8⁺ (6) and CD4⁺ (7) T cells by apoptosis and Fc region-dependent direct deletion (8), anergy of CD4⁺ T cells (9), and the development of CD4⁺CD25⁺ (10–13) or CD8⁺CD45RC^{low} T regulatory cells (Tregs) (14) (Table 2). In a model of skin transplantation tolerance induced by anti-CD40L mAb and donor specific blood transfusion (DST), mast cells generated as a result of IL-9 production by CD4⁺CD25⁺ Tregs were shown to be essential mediators of tolerance (15) and mast cells were also documented in long-surviving grafts after CD40L treatment (16). Thus, interfering with CD40–CD40L interaction results not only in passive immunosuppression but also in the induction of active tolerogenic mechanisms. Alloantibody production was inhibited or delayed in all models analyzed and this is an important mechanism by which CD40–CD40L blockade inhibits both acute and chronic rejection (Table 2). The inhibition of B cells activation and maturation directly or indirectly through inhibition of CD4⁺ help may explain the inhibition of alloantigen production.

Following CD40–CD40L blockade, several downstream molecules were shown to be responsible for prolonged graft survival, such as CTLA4 (6, 17), IFN γ (14, 17) and heme oxygenase-1 (HO-1) (18). Using the fusion molecule CD40Lg, long-term cardiac survival was dependent on CD8⁺CD45RC^{low} Tregs producing IFN γ and acting through indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) but not HO-1 (14).

Although blockade of CD40–CD40L interactions can prevent acute rejection of hearts and kidneys in rodents, they are not as efficient at inhibiting skin rejection in rodents (19)

This work was partly funded by the Foundation Progreffe and the Agence de la Biomédecine.

Xian-Liang Li is awarded The Transplantation Society Research Fellowship in 2006.

INSERM, U643, Nantes, 44093 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, 44093 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, 44093 France.

Address correspondence to: Ignacio Anegón, M.D., INSERM, U643, Nantes, 44093 France.

E-mail: ignacio.anegon@univ-nantes.fr

Received 21 January 2008. Revision requested 25 February 2008.

Accepted 10 April 2008.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/08/8601-10

DOI: 10.1097/TP.0b013e31817c4b97

TABLE 1. Expression characteristics of CD40-CD40L molecules

Cell types	CD40			CD40L			Forms of CD40L	References
	Resting	Activated	References	Resting	Activated	References		
CD4 ⁺ T cells	-	+++	(1, 2)	+	+++	(5, 65-67)	Membrane, soluble, cytoplasmic	(5, 66, 68, 69)
CD8 ⁺ T cells	-	+++	(1, 3)	+	+++	(65, 70)	Membrane	(65)
B cells	+++	+++	(71)	++	+++	(71, 72)	Membrane	(72)
DCs	-	+++	(73)	+	++	(74)	Membrane	(74)
ECs	+	+++	(75-77)	+	+++	(77)	Membrane	(77)
Platelets	++	+++	(54)	-	++	(52, 78)	Membrane, soluble, cytoplasmic	(52, 79)
Macrophages	+	+++	(77)	+	+++	(77)	Membrane	(77)

-, no expression; +, weak expression; ++, moderate expression; +++, strong expression. ECs, endothelial cells; DCs, dendritic cells.

or kidney rejection in primates (Table 2). The fact that rodents from clean animal facilities have less memory cells and that virus-infected mice with more memory cells are more resistant to tolerance induction by CD40-CD40L blockade (20), together with the fact that CD40-CD40L interactions are essential for naïve but not for memory T-cell activation (21), suggest that the poorer results after blockade of CD40-CD40L in primates might be explained by higher numbers of antiviral memory T cells cross-reactive with donor antigens.

To overcome these poor results in certain models and because the CD40-CD40L costimulatory pathway cooperates with other costimulatory pathway to activate T cells (1), it was logical to attempt blockade of more than one pathway. Promising results came from the combination of anti-CD40L with CTLA4Ig, which acted synergistically to induce long-term survival of skin and cardiac allografts in mice (19) and kidney allografts in primates (22-24). Furthermore, belatacept, a modified version of CTLA4-Ig with increased avidity resulting in a 10-fold increase of potency, was also shown to synergize with anti-CD40 antibodies to prolong islet allograft survival (25). Nevertheless, the effects of combined blockade of the CD40-CD40L and CD28/B7 pathways are complex because anti-CD40L and anti-CD86 mAb-induced cardiac allograft survival was abolished by anti-CTLA4 mAb treatment (26, 27). These results indicate that active inhibitory mechanisms acting through CTLA4, such as inhibitory signals in T cells (28) or induction of IDO in DCs (29) need to be preserved and are the basis of new reagents that selectively block CD28 and not CTLA-4, such as a single-chain Fv anti-CD28 fusion antibody (30, 31).

Another adjunctive treatment that improved the effect of anti-CD40L was the inclusion of donor DST, which was first tested in a model of islet (32) and then in heart transplantation (33). However, even when combined with CTLA4Ig and DST treatment, blockade of CD40-CD40L did not prevent chronic rejection (34, 35). Chronic rejection could be prevented by the induction of donor macrochimerism through bone marrow transplantation (36). Similarly, CD40Ig treatment combined with anti-CD28 antibodies significantly reduced chronic rejection in a rat model (31). This combination abrogated the generation of CD8⁺ Tregs but generated other tolerogenic mechanisms involving non T cells (30). Chronic rejection lesions after CD40Ig treatment were also significantly prevented by blockade of ICOS-ICOSL interactions (37).

The effects of different immunosuppressive drugs are probably explained by both their effects on CD40L expression by activated T cells and on T-cell apoptosis. CD40L-mediated signaling seems to be calcium dependent and sensitive to perturbations in calcineurin-dependent signal transduction pathway (7). The addition of cyclosporine A (CsA) not only limits CD40L surface expression (38), but also inhibits the proliferation, apoptosis, and subsequent deletion of alloreactive T cells, which are necessary for the costimulation blockade-dependent peripheral tolerance (39). In this regard, rapamycin, which does not alter early T-cell receptor signaling and permits cells cycle-dependent apoptosis, synergizes with costimulation blockade and should be a rational choice for combination regimens to promote long-term allograft survival.

Adverse effects of calcineurin inhibitors (CNI) on the tolerogenic effects of CD40-CD40L blockade have been demonstrated in mice and nonhuman primate studies (19, 22, 40), but the addition of CsA did not alter the long-term rat liver allograft survival obtained with anti-CD40L mAb treatment (41). Moreover, administration of CNI late after kidney transplantation (day 42) in primates after anti-CD40 plus anti-CD86 mAb treatment indefinitely prolonged graft survival in some cases (42) and CsA abrogated the induction *in vitro* of human anergic T cells by anti-CD40L plus anti-CD86 when added at the initiation of the culture but not when was added after the induction of anergy (43). Thus, timing and choice of immunosuppressors might be critical for the induction of CD40-CD40L blockade-based tolerance.

There is some evidence that rapamycin may be more advantageous than CNI for association with CD40-CD40L blockade. For example, costimulation blockade using CTLA4Ig and anti-CD40L mAb associated with rapamycin resulted in massive apoptosis of alloreactive T cells and led to skin allograft tolerance in mice, whereas association with CsA abolished tolerance induction (39). Rapamycin was also shown to improve the efficacy of anti-CD40L mAb combined with DST in a primate kidney transplantation model (44).

Several other combination treatments have shown promising results, such as anti-LFA-1 (45), a Src kinase inhibitor (46), anti-CD45RB antibody (47), and anti-IL7 antibody (48). Others have provided conflicting data. For example, an association with antithymocyte globulin prolonged graft survival in one study (49) but not in other (50).

An unanticipated incidence of thromboembolic complications put a shadow on the clinical trials of anti-CD40L

TABLE 2. CD40-CD40L blockade therapy in allograft transplantation

Treatment	Models	Results	Mechanisms	References
Single treatment				
Anti-CD40L	Monkey/kidney	Prevented acute rejection	Delayed alloantibody production	(23)
CD40lg	Rat/heart	Long-term graft survival	CD8 ⁺ CD45RC ^{low} Treg, IDO dependent	(14)
CD40lg or monomeric CD40	Rat/heart	Only CD40lg prolonged graft survival	Suppressed CTL	(13)
CD40lg	Mouse/islet	Prolonged graft survival	Decreased leukocyte graft infiltration	(80)
Anti-CD40L	Mouse/heart	Tolerance induction	CD4 ⁺ Treg, TLR4-independent	(12)
Anti-CD40L	Mouse/heart	Prolonged graft survival	Generation of CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	(10)
Anti-CD40L	Mouse/skin	Did not prolong of graft survival	Not applicable	(19)
With other costimulation blockade				
Anti-CD40L + CTLA4lg	Monkey/kidney	Prevented acute rejection	Synergistically prevented T cell proliferation	(22)
Anti-CD40 + belatacept	Monkey/islet	Prolonged graft survival	Synergistically promoted graft acceptance, inhibition of alloantibodies	(25)
CD40lg + anti-CD28	Rat/heart	Inhibited chronic rejection	Inhibition of alloantibodies	(31)
CD40lg + anti-ICOS	Rat/heart	Inhibited chronic rejection	Inhibition of alloantibodies and development of tolerogenic cells	(37)
Anti-CD40L + anti-ICOS	Mouse/islet	Prolonged graft survival	Induced CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg	(81)
Anti-CD40L + anti-LFA-1 + donor bone marrow Tx	Mouse/skin	Prevented acute and chronic rejection	Allogeneic chimerism	(45)
With conventional immunosuppressants				
Anti-CD40 + anti-CD86 + CsA	Monkey/kidney	Long-term drug free survival	Induction of TGFβ producing cells	(42)
Anti-CD40L + Sirolimus + DST	Monkey/kidney	Prevented acute rejection	Facilitation of operational tolerance	(44, 82)
Anti-CD40L + CsA	Rat/liver	Long-term graft survival	Inhibition of proinflammatory cytokines	(41)
Anti-CD40 + Tacrolimus	Monkey/kidney	Prolonged graft survival	Synergistically promoted graft acceptance	(60)
Anti-CD40L + Rapamycin	Mouse/skin	Long-term graft survival	Selective depletion of activated T cells	(8)
With other bioreagents				
Anti-CD40 + anti-CD86 + ATG	Monkey/kidney	Prolonged graft survival	No synergy with costimulation blockade	(50)
Anti-CD40L + DST	Mouse/heart	Long-term graft survival	Up-regulated T _H 2 cytokine, HO-1 dependent	(18)
Anti-CD40L + DST	Mouse/skin	Prolonged graft survival	Deletion of CD8 ⁺ T cells, CTLA4 dependent	(6)
Anti-CD40L + DST	Mouse/skin	Long-term graft survival	Generated CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	(9, 17)
Anti-CD40L + Sec inhibitor	Mouse/heart	Prolonged graft survival	Reduced cellular infiltration	(46)
Anti-CD40L + anti-CD45B	Mouse/islet, skin	Long-term graft survival	Inhibited T _H 1 and up-regulated T _H 2 cytokines	(47)

DST, donor-specific blood transfusion; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; CsA, cyclosporine A; ATG, antithymocyte globulin; HO-1, heme oxygenase-1; Tx, transplantation; CTL, cytotoxic T lymphocytes; Treg, regulatory T cells; TLR4, Toll-like receptor 4.

treatment in autoimmune diseases (51). Platelets express preformed CD40L during the process of thrombus formation (52). Subsequently, the binding of CD40L to $\beta 3$ integrin stabilizes thrombus formation (53). Preformed CD40 protein is also constitutively expressed on platelets. Ligation of CD40 causes platelets activation and enhances platelet-leukocyte adhesion (54). Thus, the CD40–CD40L interaction is critical in thrombus formation and stabilization. Nevertheless, anticoagulation prophylaxis by heparin significantly decreased (55) and inhibition of prostaglandin synthesis, (56) completely prevented thrombosis formation when combined with anti-CD40L treatment. CD40L from platelets activate ECs through CD40 (52) and CD40L expressed by activated platelets is sufficient to induce organ rejection in CD40L-deficient recipients (57). Although the exact mechanisms underlying the thromboembolic events described above are not understood, such complications could be circumvented by the development of novel CD40–CD40L blocking agents, such as CD40Ig, which needs to be tested in primates in combination with anticoagulation prophylaxis and anti-CD40 mAb.

As a potential alternative to CD40L therapy, blocking or partially agonistic anti-CD40 mAb might preserve the action of CD40L on thrombi stabilization. Recent experiments seem to confirm this hypothesis. An anti-CD40 antibody, Chi220, prolonged survival of renal allografts (58), and that of islets when administered in combination with belatacept in primates, without thromboembolic complications (25). Another antihuman CD40 antibody, 4D11, significantly prolonged kidney graft survival in primates when used as a monotherapy (59) and synergized with the CNI tacrolimus (60), again without thromboembolism.

Finally, CD40–CD40L interactions are critical for the maintenance of self-tolerance, as shown in CD40L deficient mice (61) and this could be an obstacle for the long-term application of CD40–CD40L blockade. Nevertheless, in an analogous situation, although CD28–B7 interactions are necessary for CD4⁺CD25⁺ Treg development in mice (62), patients treated for up to 4 years with belatacept did not show modifications in the numbers of CD4⁺CD25⁺ Treg (63, 64).

CONCLUSIONS

Although more work is needed on the downstream mechanisms initiated by reagents targeting CD40–CD40L interactions both in rodents and nonhuman primates, it is reasonable to expect new clinical trials in the near future. Even though monotherapy with CD40–CD40L blockade may not be sufficient to achieve tolerance in nonhuman primates and humans, it is a strategy that should be used in combinatorial treatments. It could be expected that combination of CD40–CD40L blockade with non-CNI immunosuppressors, such as rapamycin, and blockade of other costimulation pathways, such as selective blockers of CD28, will lead in future clinical trials to the generation of tolerogenic mechanisms.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge B. Vanhove for critical review of this manuscript.

REFERENCES

- Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. The CD154–CD40 costimulation pathway in organ transplantation. *Transplant Reviews* 2004; 18: 10.
- Munroe ME, Bishop GA. A costimulatory function for T cell CD40. *J Immunol* 2007; 178: 671.
- Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science* 2002; 297: 2060.
- Van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 330.
- Lesley R, Kelly LM, Xu Y, et al. Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive B cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10717.
- Iwakoshi NN, Mordes JP, Markes TG, et al. Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8⁺ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner. *J Immunol* 2000; 164: 512.
- Blair PJ, Riley JL, Harlan DM, et al. CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med* 2000; 191: 651.
- Monk NJ, Hargreaves RE, Marsh JE, et al. Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat Med* 2003; 9: 1275.
- Quezada SA, Bennett K, Blazar BR, et al. Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: The interplay of clonal anergy and immune regulation. *J Immunol* 2005; 175: 771.
- Van Maurik A, Herber M, Wood KJ, et al. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8⁺ T cell-mediated graft rejection: Implications for anti-CD154 immunotherapy. *J Immunol* 2002; 169: 5401.
- Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, et al. Tolerizing effects of costimulation blockade rest on functional dominance of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Transplantation* 2005; 79: 147.
- Zhai Y, Meng L, Gao F, et al. CD4⁺ T regulatory cell induction and function in transplant recipients after CD154 blockade is TLR4 independent. *J Immunol* 2006; 176: 5988.
- Masunaga T, Yamashita K, Sakihama H, et al. Dimeric but not monomeric soluble CD40 prolongs allograft survival and generates regulatory T cells that inhibit CTL function. *Transplantation* 2005; 80: 1614.
- Guillonnet C, Hill M, Hubert FX, et al. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8⁺CD45RC^{low} T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007; 117: 1096.
- Lu LF, Lind EF, Gondek DC, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 2006; 442: 997.
- Guillot C, Guillonnet C, Mathieu P, et al. Prolonged blockade of CD40–CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 2002; 168: 1600.
- Markes TG, Phillips NE, Gordon EJ, et al. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon- γ , and CTLA4. *J Clin Invest* 1998; 101: 2446.
- Yamashita K, Ollinger R, McDaid J, et al. Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *Faseb J* 2006; 20: 776.
- Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996; 381: 434.
- Adams AB, Williams MA, Jones TR, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2003; 111: 1887.
- Borrow P, Tough DF, Eto D, et al. CD40 ligand-mediated interactions are involved in the generation of memory CD8(+) cytotoxic T lymphocytes (CTL) but are not required for the maintenance of CTL memory following virus infection. *J Virol* 1998; 72: 7440.
- Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, et al. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8789.

23. Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, et al. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 1999; 5: 686.
24. Haanstra KG, Ringers J, Sick EA, et al. Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation* 2003; 75: 637.
25. Adams AB, Shirasugi N, Jones TR, et al. Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival. *J Immunol* 2005; 174: 542.
26. Tsai MK, Ho HN, Chien HF, et al. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: A crosscheck hypothesis. *Transplantation* 2004; 77: 48.
27. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, et al. CTLA-4 engagement and regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells independently control CD8⁺-mediated responses under costimulation blockade. *J Immunol* 2006; 176: 5240.
28. Fallarino F, Fields PE, Gajewski TF. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J Exp Med* 1998; 188: 205.
29. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3: 1097.
30. Vanhove B, Laflamme G, Coulon F, et al. Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody. *Blood* 2003; 102: 564.
31. Guillonnet C, Seveno C, Dugast AS, et al. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 2007; 179: 8164.
32. Lin H, Bolling SF, Linsley PS, et al. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med* 1993; 178: 1801.
33. Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, et al. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13967.
34. Guillonnet C, Louvet C, Renaudin K, et al. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 2004; 172: 1619.
35. Shirasugi N, Adams AB, Durham MM, et al. Prevention of chronic rejection in murine cardiac allografts: A comparison of chimerism- and nonchimerism-inducing costimulation blockade-based tolerance induction regimens. *J Immunol* 2002; 169: 2677.
36. Exner BG, Acholonu IN, Bergheim M, et al. Mixed allogeneic chimerism to induce tolerance to solid organ and cellular grafts. *Acta Hematol* 1999; 101: 78.
37. Guillonnet C, Aubry V, Renaudin K, et al. Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation* 2005; 80: 255.
38. Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, et al. Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J Clin Invest* 1994; 93: 1315.
39. Li Y, Li XC, Zheng XX, et al. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5: 1298.
40. Larsen CP, Knechtle SJ, Adams A, et al. A new look at blockade of T-cell costimulation: A therapeutic strategy for long-term maintenance immunosuppression. *Am J Transplant* 2006; 6 (5 Pt 1): 876.
41. Bartlett AS, McCall JL, Ameratunga R, et al. Intra-graft gene and protein expression in rat liver allografts treated with costimulatory blockade alone or in combination with CyA. *J Surg Res* 2003; 115: 1.
42. Haanstra KG, Sick EA, Ringers J, et al. Costimulation blockade followed by a 12-week period of cyclosporine A facilitates prolonged drug-free survival of rhesus monkey kidney allografts. *Transplantation* 2005; 79: 1623.
43. Koenen HJ, Fasse E, Joosten I. Cyclosporine preserves the anergic state of human T cells induced by costimulation blockade in vitro. *Transplantation* 2005; 80: 522.
44. Preston EH, Xu H, Dhanireddy KK, et al. IDEC-131 (anti-CD154), sirolimus and donor-specific transfusion facilitate operational tolerance in non-human primates. *Am J Transplant* 2005; 5: 1032.
45. Metzler B, Gfeller P, Bigaud M, et al. Combinations of anti-LFA-1, everolimus, anti-CD40 ligand, and allogeneic bone marrow induce central transplantation tolerance through hemopoietic chimerism, including protection from chronic heart allograft rejection. *J Immunol* 2004; 173: 7025.
46. Zhang Q, Fairchild RL, Reich MB, et al. Inhibition of Src kinases combined with CD40 ligand blockade prolongs murine cardiac allograft survival. *Transplantation* 2005; 80: 1112.
47. Rothstein DM, Livak MF, Kishimoto K, et al. Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models. *J Immunol* 2001; 166: 322.
48. Wang Y, Dai H, Liu Z, et al. Neutralizing IL-7 promotes long-term allograft survival induced by CD40/CD40L costimulatory blockade. *Am J Transplant* 2006; 6: 2851.
49. Azimzadeh AM, Pfeiffer S, Wu G, et al. Alloimmunity in primate heart recipients with CD154 blockade: Evidence for alternative costimulation mechanisms. *Transplantation* 2006; 81: 255.
50. Haanstra KG, Sick EA, Ringers J, et al. No synergy between ATG induction and costimulation blockade induced kidney allograft survival in rhesus monkeys. *Transplantation* 2006; 82: 1194.
51. Sidiropoulos PI, Boumpas DT. Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2004; 13: 391.
52. Henn V, Slupsky JR, Graf M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591.
53. Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8: 247.
54. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, et al. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 2003; 92: 1041.
55. Kawai T, Andrews D, Colvin RB, et al. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* 2000; 6: 114.
56. Koyama I, Kawai T, Andrews D, et al. Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in nonhuman primates. *Transplantation* 2004; 77: 460.
57. Xu H, Zhang X, Mannon RB, et al. Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154. *J Clin Invest* 2006; 116: 769.
58. Pearson TC, Trambley J, Odom K, et al. Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques. *Transplantation* 2002; 74: 933.
59. Imai A, Suzuki T, Sugitani A, et al. A novel fully human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 2007; 84: 1020.
60. Uno M ST, Aoyagi T. Immunosuppression by a novel anti-CD40 mAb, 4D11, is not abrogated by combined treatment with tacrolimus for renal transplantation in cynomolgus monkeys. *Am J Transplant* 2007; 7(Suppl): 202.
61. Kumanogoh A, Wang X, Lee I, et al. Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: A role of CD40 in regulatory T cell development. *J Immunol* 2001; 166: 353.
62. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431.
63. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005; 353: 770.
64. Chavez H, Beaudreuil S, Abbed K, et al. Absence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell expansion in renal transplanted patients treated in vivo with Belatacept mediated CD28-CD80/86 blockade. *Transpl Immunol* 2007; 17: 243.
65. Gauchat JF, Aubry JP, Mazzei G, et al. Human CD40-ligand: Molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. *FEBS Lett* 1993; 315: 259.
66. Castle BE, Kishimoto K, Stearns C, et al. Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993; 151: 1777.
67. Ludewig B, Henn V, Schroder JM, et al. Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4⁺ CD45RA⁺ T cells with dendritic cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 3137.
68. Koguchi Y, Thauland TJ, Slifka MK, et al. Preformed CD40 ligand exists in secretory lysosomes in effector and memory CD4⁺ T cells and is quickly expressed on the cell surface in an antigen-specific manner. *Blood* 2007; 110: 2520.
69. Matthies KM, Newman JL, Hodzic A, et al. Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells. *Cell Immunol* 2006; 241: 47.
70. Hermann P, Van-Kooten C, Gaillard C, et al. CD40 ligand-positive CD8⁺ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2972.

71. Grammer AC, McFarland RD, Heaney J, et al. Expression, regulation, and function of B cell-expressed CD154 in germinal centers. *J Immunol* 1999; 163: 4150.
72. Grammer AC, Bergman MC, Miura Y, et al. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J Immunol* 1995; 154: 4996.
73. McLellan AD, Sorg RV, Williams LA, et al. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40:CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1204.
74. Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, et al. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J Immunol* 1996; 157: 4363.
75. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, et al. CD40 on human endothelial cells: Inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4342.
76. Chai H, Yan S, Wang H, et al. CD40 ligand increases expression of its receptor CD40 in human coronary artery endothelial cells. *Surgery* 2006; 140: 236.
77. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1931.
78. Hermann A, Rauch BH, Braun M, et al. Platelet CD40 ligand (CD40L)—Subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 2001; 12: 74.
79. Prasad KS, Andre P, Yan Y, et al. The platelet CD40L/GP IIb-IIIa axis in atherothrombotic disease. *Curr Opin Hematol* 2003; 10: 356.
80. Rehman KK, Bertera S, Trucco M, et al. Immunomodulation by adenoviral-mediated sCD40lg gene therapy for mouse allogeneic islet transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 301.
81. Nanji SA, Hancock WW, Luo B, et al. Costimulation blockade of both inducible costimulator and CD40 ligand induces dominant tolerance to islet allografts and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 2006; 55: 27.
82. Pearl JP, Xu H, Leopardi F, et al. CD154 blockade, sirolimus, and donor-specific transfusion prevents renal allograft rejection in cynomolgus monkeys despite homeostatic T-cell activation. *Transplantation* 2007; 83: 1219.

Induction de tolérance en transplantation par blocage de la voie CD40/CD40L: caractérisation des cellules tolérogènes induites chez le rat et évaluation chez le primate.

Le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L par injection d'un adénovirus codant pour CD40lg génère des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{lo} capables d'induire une tolérance indéfinie d'une allogreffe cardiaque chez le rat. L'étude du transcriptome de ces lymphocytes TCD8⁺ tolérogènes par puce à ADN a permis d'établir des hypothèses quant aux mécanismes impliqués. Le rôle de l'IFNg est retrouvé et pourrait induire l'expression d'une protéine immuno-régulatrice Fgl2. La présence des molécules du CMH de classe II semble également importante. De nombreuses molécules observées dans des analyses de lymphocytes Treg par puces à ADN sont également surexprimées. D'autres hypothèses, sont également discutées.

Cette stratégie d'induction de la tolérance a été évaluée chez le primate en faisant exprimer par des AAV recombinants le CD40lg humain associé à sc28AT, un inhibiteur de la voie de costimulation CD28/B7. Les molécules sont fonctionnelles *in vitro* et l'injection des animaux par AAV permet une expression prolongée de CD40lg, mais plus faible et transitoire du sc28AT, qui semble immunogène. Le CD40lg ne prolonge pas la survie de la greffe contrairement au sc28AT. La survie du greffon d'un animal recevant les deux transgènes a été prolongée et d'autres animaux sont prévus. L'expression de molécules d'intérêt thérapeutique par vecteurs viraux permet de disposer d'un modèle d'évaluation de bioréactifs pour l'induction de la tolérance chez le primate dans des conditions de faisabilité satisfaisantes. L'efficacité des molécules CD40lg et sc28AT dans ce modèle de transplantation montre les limites de la transposition des modèles rongeurs aux primates.

Mots clés : Transplantation, tolérance, puces à ADN, lymphocytes T régulateurs, vecteurs viraux, CD40lg, sc28AT, primates.

Induction of tolerance in transplantation through blockade of CD40/CD40L: characterisation of tolerogenic cells induced in a rat model and evaluation in the primate.

Inhibition of the CD40/CD40L costimulation pathway using an adenovirus coding for CD40lg can generate CD8⁺CD45RC^{lo} T regulatory cells that induce indefinite graft tolerance in a rat cardiac allograft model. A gene expression study of tolerogenic cells by DNA microarray allowed us to explore the mechanisms involved. As expected, IFNg seems to be a key player and might induce the expression of the immuno-regulatory protein Fgl2. MHC-II molecules seem to be important too. Other molecules observed in other Treg microarray analyses are also over-expressed. Other hypothesis are also discussed.

This tolerance induction strategy was evaluated in primates using recombinant AAV coding for the human CD40lg molecule and/or sc28AT, an inhibitor of the CD28/B7 costimulation pathway. These molecules were functional *in vitro*. The AAV injection led to a prolonged expression of CD40lg whereas sc28AT molecule was produced transiently, as it seemed to be immunogenic. Unlike CD40lg, sc28AT appeared to be efficient *in vivo*. The animal receiving both transgenes had delayed graft rejection, and other experiments are now scheduled. The expression of therapeutic molecules through viral vectors to evaluate the tolerance induction efficiency in primates is feasible. However the efficiency of the CD40lg and sc28AT molecules in our model is still debatable and raises the issue of the relevance of rodent models compared to primate pre-clinical strategies.

Key words: Transplantation, tolerance, DNA microarray, regulatory T cells, viral vectors, CD40lg, sc28AT, primates