

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Rôle du métabolisme de la cystéine dans la tolérance en
transplantation et dans les réponses immunes de type Th1

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Immunologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Romain VUILLEFROY de SILLY

Le 21 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Président du jury : Sophie BROUARD, Directeur de Recherches, Nantes

Rapporteurs : Michel BRAUN, Professeur, Bruxelles

Nathalie JANEL, Professeur, Paris

Directeur de thèse :

Bernard VANHOVE, Directeur de Recherches, Nantes

« Pour infime qu'il soit, un acte est sacré si,
à l'image d'une roue dentée dans le mécanisme d'une montre,
il aide à faire en sorte que les choses tournent rond. »

Laurent GRENIER, « Fleurs d'encre, pensées choisies », *L'acte utile*

Abbreviations

Ac: Anticorps

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ARN: Acide RiboNucléique

ATP: Adenosine-5'-TriPhosphate

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

BCR: B Cell Receptor

BDCA-: Blood Dendritic Cell Antigen-

CBS: Cystathionine- β -synthase

CCR: C-C chemokine Receptor

CD: Cluster of Differentiation

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CO: Monoxyde de carbone

CSE: Cystathionase ou Cystathionine- γ -lyase

CTL: Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4

CXCR: C-X-C chemokine Receptor

Cys/Cys₂: Cystéine/Cystine (réducteur/oxydant)

DAMP: Danger-Associated Molecular Pattern

DC: Cellule dendritique

DTH: Delayed-type hypersensitivity

EAE: Encéphalite Autoimmune Expérimentale

Fc: Fragment crystallizable

FoxP3: Forkhead box P3

GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathion oxydé

GVHD: Graft-Versus-Host Disease

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HLA: Human Leukocyte Antigen

HO-1: Heme oxygenase-1

H₂S: Sulfure d'hydrogène

Hsp: Heat shock protein

ICAM-: Inter-Cellular Adhesion Molecule-

IDO: Indoléamine 2,3-DiOxygénase

IgG2a: ImmunoGlobuline d'isotype G et d'allotype 2a

IFN-: InterFeroN

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase

I/R: Ischémie/Reperfusion

IL-: Interleukine-

LAG-3: Lymphocyte-Activation Gene-3

LPS : LipoPolySaccharide (si non précisé, ligand du TLR-4)

mDC: myeloid Dendritic Cell

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells

MoDC: Monocyte-derived Dendritic Cell

NF-κB: Nuclear Factor-κB

MLR: Mixed Leukocyte Reaction

NK: Natural Killer

NO: Protoxyde d'azote

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern

pDC: plasmacytoid DC

PPG: Propargylglycine

PRR: Pattern Recognition Receptor

ROS: Reactive Oxygen Species

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TCR: T Cell Receptor

TGF-β: Transforming Growth Factor-β

Th1: T helper type 1

TLR: Toll-Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

Treg: Lymphocyte T régulateur

Avant-propos

Le système immunitaire est un élément clé dans le maintien de notre intégrité et de notre survie puisque sa fonction est centrale dans l'élimination des pathogènes, mais aussi dans l'allergie, l'autoimmunité, le cancer et le rejet en transplantation.

La transplantation est devenue une thérapeutique de choix après défaillance terminale d'un organe depuis la découverte des diverses drogues immunosuppressives. En dépit de leur intérêt, les immunosuppresseurs actuels ne semblent pas pouvoir pallier à tous les rejets et sont très souvent associés à de nombreux effets secondaires (*i.e.* cancers, autoimmunité, infections, néphrotoxicité). En effet, l'administration chronique de ces molécules induit une toxicité rénale et une dépression non-spécifique et persistante du système immunitaire. La découverte de cellules régulatrices (*e.g.* lymphocytes T régulateurs) limitant la réponse immune de manière spécifique contre certains antigènes a ouvert une nouvelle perspective : il serait possible d'induire, chez le receveur, un état de tolérance spécifique vis-à-vis du transplant sans avoir à utiliser des immunosuppresseurs de façon chronique, et donc sans interférer avec l'intégrité du système immunitaire et du rein. Notre équipe recherche les divers mécanismes impliqués dans la tolérance en transplantation, afin d'élaborer de nouvelles molécules immunosuppressives spécifiques.

L'induction de réponses immunogènes ou tolérogènes dépend, en grande partie, du statut d'activation des cellules présentatrices d'antigènes, et en particulier des cellules dendritiques. Preuve en est que la plupart des modèles de tolérance en transplantation développés au laboratoire sont dépendants de l'action des cellules dendritiques. Cependant, les facteurs contrôlant l'activation de ces cellules ne sont pas tous connus, ni compris.

Récemment, un nouveau gasotransmetteur a été identifié : le sulfure d'hydrogène. Ce gaz, produit de manière endogène et enzymatique, joue plusieurs rôles physiologiques dans le système cardio-vasculaire, dans le système nerveux mais aussi dans l'inflammation. Malgré les différents rôles des deux autres membres de la famille des gasotransmetteurs (*i.e.* le protoxyde d'azote et le monoxyde de carbone) dans la réponse immune, celui du sulfure d'hydrogène n'est pas encore établi. Hors du système nerveux, il semble que ce soit la cystathionine- γ -lyase qui produise majoritairement ce gaz. Cette enzyme est aussi impliquée dans la production de cystéine, un acide aminé soufré, dont la présence est limitante dans la formation du glutathion. Or, le glutathion est une molécule antioxydante majeure dans

l'homéostasie du potentiel redox, et est importante dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact de la cystathionine- γ -lyase dans la réponse immune en transplantation, cette enzyme jouant un rôle central dans la production de sulfure d'hydrogène et dans celle du glutathion.

Sommaire

INTRODUCTION	1
I. IMMUNOLOGIE DE LA TRANSPLANTATION	1
A. <i>Historique de la transplantation et limites actuelles</i>	<i>1</i>
1. Première greffe/transplantation	1
2. L'essor de la transplantation grâce aux avancées de la chirurgie	2
3. Le rejet ou la composante immunologique.....	2
4. Limiter la réponse immunitaire : l'ère des immunosuppresseurs	3
5. Limites et enjeux actuels de la transplantation	3
a. La pénurie d'organe	3
b. L'immunosuppression chronique	4
c. Le pronostic du rejet.....	4
B. <i>Fondamentaux de l'activation lymphocytaire T</i>	<i>5</i>
1. Le signal antigénique : signal 1	6
2. Le signal de costimulation : signal 2	7
3. Le signal des cytokines : signal 3.....	7
4. La polarisation lymphocytaire.....	8
a. Lymphocytes T CD4 ⁺ effecteurs	8
b. Lymphocytes T CD4 ⁺ régulateurs	11
C. <i>Le rejet.....</i>	<i>13</i>
1. Les facteurs pré-greffes influençant la survenue du rejet	13
a. Origine du transplant.....	13
b. La chirurgie	13
c. L'Ischémie/Reperfusion (I/R)	14
2. Les prémices du rejet : l'alloreconnaissance	15
a. L'alloreconnaissance directe	17
b. L'alloreconnaissance indirecte	17
c. L'alloreconnaissance semi-directe	18
3. La phase effectrice du rejet	18
a. La réponse cellulaire T cytotoxique	18
b. L'hypersensibilité retardée (DTH)	20
c. La réponse anticorps (humorale) et du complément.....	22
4. Phases cliniques du rejet	24
a. Rejet hyperaigu ou suraigu	24
b. Rejet aigu à médiation cellulaire	25
c. Rejet aigu à médiation humorale	26
d. Le rejet chronique.....	28
D. <i>La tolérance.....</i>	<i>29</i>
1. La tolérance centrale	30
2. La tolérance périphérique.....	31
a. L'ignorance	31
b. La délétion.....	32
c. L'anergie	33

d.	La déviation immune Th1/Th2.....	34
e.	L'inhibition	34
f.	La suppression.....	35
3.	La tolérance clinique en transplantation.....	36
II.	LES CELLULES DENDRITQUES (DC).....	37
A.	<i>Bref historique</i>	37
B.	<i>Généralités</i>	37
C.	<i>Localisations</i>	39
1.	Les cellules dendritiques de la peau et des muqueuses	39
2.	Les cellules dendritiques interstitielles.....	39
3.	Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes	40
4.	Les cellules dendritiques de la lymphe et du sang.....	40
D.	<i>Les populations de cellules dendritiques</i>	40
1.	Chez l'homme	41
a.	Les cellules de Langerhans.....	41
b.	Les cellules dendritiques interstitielles.....	41
c.	Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes	42
d.	Les cellules dendritiques du sang et leurs précurseurs	42
e.	Les cellules dendritiques générées <i>in vitro</i>	44
	BMDC (Bone Marrow-derived Dendritic Cells).....	44
	MoDC (Monocyte-derived Dendritic Cells).....	44
2.	Chez le rat	45
E.	<i>Développement des cellules dendritiques chez l'homme</i>	46
F.	<i>Les cellules dendritiques : maturation et TLR</i>	48
1.	Les Toll-like recepteurs (TLR).....	49
a.	TLR-1, -2, et -6	49
b.	TLR-3.....	50
c.	TLR-4.....	50
d.	TLR-5.....	50
e.	TLR-7 et -8.....	51
f.	TLR-9.....	51
g.	TLR-10.....	51
h.	TLR-11.....	51
2.	Signalisation des TLR	52
a.	La voie dépendante de MyD88.....	52
b.	La voie indépendante de MyD88.....	55
G.	<i>La cellule dendritique : chef d'orchestre de la réponse immune</i>	57
1.	Apprêtement antigénique	57
a.	CMH de classe I	57
b.	CMH de classe II.....	58
c.	Présentation croisée.....	59
2.	Maturation et migration des cellules dendritiques.....	60
3.	Modulation des réponses Th1/Th2 via les TLR	61
4.	L'interleukine-12 (IL-12).....	62

5. Les cellules dendritiques tolérogènes.....	63
III. METABOLISME DES ACIDES AMINES SOUFRES	67
A. Le soufre	67
B. Les acides aminés soufrés.....	67
C. Le métabolisme de la méthionine	67
1. La transméthylation.....	68
2. La reméthylation	68
3. La transsulfuration	69
D. Le devenir de la cystéine	71
1. La biosynthèse de glutathion (GSH)	71
2. La voie du cystéine sulfinat.....	71
3. La production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S)	72
4. La biosynthèse du donneur universel de soufre.....	73
IV. IMMUNOMETABOLISME	75
A. Métabolisme du tryptophane	75
B. Métabolisme de l'hème.....	76
C. Métabolisme de l'arginine.....	76
D. Le métabolisme du glutathion et de la cystéine, et leur homéostasie	78
1. Le potentiel redox	78
2. Les lymphocytes T, la cystéine et le glutathion.....	79
3. Mécanismes suppresseurs des cellules régulatrices.....	79
4. Autres effets impliquant le métabolisme et l'homéostasie de la cystéine et du glutathion.....	82
V. OBJECTIFS	84
RESULTATS	85
I. ARTICLE	85
Abstract	87
Introduction.....	88
Materials & methods.....	91
Results	100
Discussion	105
References	109
Figures	113
Supplementary figures.....	121
II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	125
1. Objectifs.....	125
2. Méthodes	125
3. Résultats	126
4. Discussion	127
DISCUSSION/PERSPECTIVES	128
BIBLIOGRAPHIE	132

PRODUCTION SCIENTIFIQUE	145
--------------------------------------	------------

Liste des figures

Figure 1 : Principes d'activation à 3 signaux des lymphocyte T CD4+ et polarisation Th1-Th2.	6
Figure 2 : Représentation schématique des réponses cellulaires en transplantation.	16
Figure 3 : Représentation schématique et principales caractéristiques des réponses humorales primaires et secondaires dans le temps.	23
Figure 4 : Schématisation des mécanismes de tolérance périphérique.	32
Figure 5 : Schématisation des cellules dendritiques générées <i>in vitro</i>	45
Figure 6 : Représentation du développement des DC à partir de la moelle.	48
Figure 7 : Signalisation via MyD88.....	54
Figure 8 : Signalisation via le TLR-4.	56
Figure 9 : Métabolisme de la cystéine.	69
Figure 10 : Changement de potentiel redox en intra- et extra-cellulaire.....	78
Figure 11 : Mécanisme de suppression des MDSC par privation de cystine.	81

Introduction

I. Immunologie de la transplantation

A. Historique de la transplantation et limites actuelles

Les termes de « greffe » et de « transplantation » désignent tous deux le fait d'implanter un tissu. Cependant, le terme de « transplantation » réfère à l'implantation d'un tissu vascularisé (*e.g.* organes, parties d'organes) nécessitant un acte chirurgical d'« anastomose » (les vaisseaux sanguins de l'organe du donneur doivent être joints à ceux du receveur), tandis que le terme de « greffe » réfère à l'implantation d'un tissu non-vascularisé (*e.g.* cellules) ou ne nécessitant pas d'anastomose par acte chirurgical (*e.g.* peau).

Plusieurs types de greffes, ou transplantations, existent et sont fonctions de la comparaison entre les fonds génétiques du donneur et du receveur, ainsi différenciera-t-on l'autogreffe, l'isogreffe (ou greffe syngénique), l'allogreffe (ou greffe allogénique), et la xénogreffe (ou greffe xénogénique). L'autogreffe signifie que le greffon est issu du même organisme que le receveur : le donneur est le receveur. La greffe syngénique fait référence à une greffe entre donneur et receveur de fonds génétiques identiques (*i.e.* vrais jumeaux). La greffe allogénique fait référence à une greffe entre donneur et receveur de la même espèce mais dont le fond génétique est différent, même si apparenté. Enfin, la greffe xénogénique fait référence à une greffe entre donneur et receveur d'espèces différentes (*e.g.* porc vers l'homme).

1. Première greffe/transplantation

Le concept de « greffe » (sans distinction avec la transplantation) est arrivé en Europe dès le 3^{ème} siècle, comme l'attestent certains tableaux comme, par exemple, celui représentant une personne atteinte de gangrène à la jambe et ayant été transplanté par St Côme et St Damien avec la jambe d'un éthiopien. Cependant beaucoup s'accordent à dire que la première greffe daterait du 10^{ème} au 2nd siècle avant J.C., par celui qui est considéré comme le « père de la chirurgie », Susruta. Ce chirurgien indien aurait alors effectué une autogreffe de peau avec pour objectif de faire une rhinoplastie (Loukas *et al.*, 2010). Le terme de « transplantation » est arrivé au XVIII^{ème} siècle par John Hunter (R. Carter, 1993). Cependant, jusqu'au XX^{ème} siècle, les chirurgiens se limitaient à des greffes de tissu, car les techniques disponibles ne

permettaient pas de contrôler les saignements lors de la résection d'organes et de rétablir la circulation après transplantation.

2. L'essor de la transplantation grâce aux avancées de la chirurgie

La transplantation étant impossible aux vues des techniques de chirurgie disponibles, Carrel (chirurgien français) et Guthrie (physiologiste américain) ont alors créé une méthode de suture vasculaire pour joindre bout-à-bout deux vaisseaux sanguins et ont permis la création de clamps d'artère afin d'empêcher la perte de sang, ce qui a permis l'émergence de la transplantation d'organes (P. J. Morris, 2004). Cependant, malgré l'engouement engendré par ces découvertes, une nouvelle composante allait empêcher l'essor de la transplantation : le rejet.

3. Le rejet ou la composante immunologique

Le Professeur Mathieu Jaboulay est le premier à appliquer la transplantation rénale à l'homme : il prélève le rein d'un porc et le transplante au coude d'une femme gravement malade mais l'échec est immédiat. En 1933, le russe Serguey Voronoy, qui travaille sur la transplantation depuis de longues années, parvient à une conclusion majeure : « *le rejet est un événement immunologique* ». Il décide alors de réaliser la première allotransplantation rénale chez l'homme à partir d'un donneur décédé. Quatre jours après greffe, la patiente décède, mais un nouveau pas a été accompli. Malgré des essais de transplantation entre donneur et receveurs ABO-compatibles, les organes restent rejetés très rapidement. En 1936, le concept d'« histocompatibilité » liée à la génétique va être introduit par Gorer. Il découvre que, en fonction de la souche génétique de la souris donneuse et receveuse, des tumeurs greffées sont rejetées en cas d'histoincompatibilité, et tolérées en cas d'histocompatibilité (Strominger, 2002). Ces travaux amèneront à la confirmation de systèmes majeurs et mineurs d'histocompatibilités chez tous les mammifères. Ainsi, les premières allotransplantations rénales utilisant des donneurs vivants apparentés voient le jour en France en 1952, sous la conduite des Professeurs Jean Hamburger, Jean Vaysse et René Küss (Michon *et al.*, 1953), et par Merrill et Murray à Boston en 1954 entre de « vrais » jumeaux (Merrill *et al.*, 1956). Néanmoins, les différences antigéniques entre donneurs et receveurs, même dans le cas de donneurs vivants apparentés (excluant le cas des « vrais » jumeaux), impliquent que le rejet du transplant reste inévitable. Le receveur de rein, à partir d'un donneur vivant apparenté, ne survécut que 3 semaines. La transplantation entre de « vrais jumeaux », elle, est la première réussite puisqu'elle a permis de prouver que la perte de la fonction rénale était entièrement

réversible par cette technique. Désormais, l'objectif était clair : reproduire cette réussite chez des patients qui n'ont pas de jumeau. A cette période, les progrès chirurgicaux et la réanimation étaient tels qu'ils n'étaient plus les facteurs limitant la survie des patients transplantés : il ne restait donc plus que la composante immunologique. En 1958, Jean Dausset et George Snell découvrent le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'homme, le système HLA (Human Leukocyte Antigen) (Dausset, 1958). Les connaissances sur le système HLA permettent ainsi d'établir la compatibilité donneur-receveur avant transplantation et de limiter considérablement les rejets sévères en transplantation.

4. Limiter la réponse immunitaire : l'ère des immunosuppresseurs

En 1959, Merrill et Hamburger ont compris qu'il fallait un traitement immunosuppresseur afin d'empêcher les réponses immunes dirigées contre ces HLA, ainsi vont-ils réussir pour la première fois une allotransplantation en irradiant le receveur (plus de 20 ans de survie). Cependant l'immunosuppression par irradiation totale du corps a vite été abandonnée, étant donné les complications (infections mortelles) liées à une aplasie médullaire. L'azathioprine et les corticoïdes sont les premiers immunosuppresseurs médicamenteux à avoir été utilisés et dont les résultats étaient très prometteurs. Il existait alors enfin une alternative réaliste à la dialyse suite à une défaillance rénale de phase terminale, même si les taux de survie n'étaient pas très bons (40% de survie des patients, un an après transplantation). Au début des années 1980, la Cyclosporine A est introduite en transplantation (P. J. Morris, 2004). Cette molécule a permis une forte réduction de la perte des transplants rénaux ainsi que des transplants de cœur et de foie. Dès lors, la transplantation d'organe connaîtra un énorme succès et deviendra le traitement de choix en cas d'insuffisance terminale d'un organe vital. Toute une variété d'immunosuppresseurs a ensuite été développée puis utilisée, améliorant considérablement le taux de survie des patients (le taux de survie à un an d'une greffe rénale est aujourd'hui supérieur à 90% dans la plus part des centres contre moins de 30% dans les années 1970).

5. Limites et enjeux actuels de la transplantation

a. La pénurie d'organe

La transplantation est devenue un acte thérapeutique de choix, comme en témoignent les plus de 4700 transplantations effectuées en France en 2010, et les 81% de survie à 5ans après greffe (données de l'Agence de la Biomédecine). Cependant, alors que le nombre de patients inscrits dans la liste d'attente d'une transplantation de rein est passé de 6200 à 7600

personnes de 2007 à 2010, le nombre de patients effectivement greffé n'a pas augmenté entre 2007 et 2010, plafonnant à 2900 personnes, soit 38% du nombre d'inscrits. La pénurie d'organe est aujourd'hui le problème majeur pour lequel la xénotransplantation et la transplantation de tissus composites semblent être les solutions potentielles, cependant, même si elle reste le problème limitant, elle n'est, en pratique, pas la seule.

b. L'immunosuppression chronique

Malgré l'apport indéniable qu'a pu apporter l'immunosuppression dans le succès de la transplantation, l'immunosuppression chronique ne prévient, ou ne traite, toujours pas tous les types de rejet, comme le rejet chronique à long terme ou les rejets humoraux aigus. Elle est aussi responsable d'importants effets secondaires, tels qu'une néphrotoxicité médicamenteuse et un affaiblissement important du système immunitaire du patient, aboutissant à des risques majorés de développement de cancers ou d'infections. Les stratégies visant à améliorer les traitements anti-rejets de manière plus spécifique et non toxique, afin d'évoluer idéalement vers un état de tolérance où le greffon ne serait pas rejeté même en absence d'immunosuppression, sont donc d'actualité. La recherche expérimentale sur l'animal permet de mieux comprendre les différentes phases du rejet de greffe et les effecteurs impliqués dans ces mécanismes. Ainsi, cibler plus spécifiquement les effecteurs du rejet permettrait de mieux le prévenir. De nombreux protocoles expérimentaux d'induction de tolérance ont été mis au point ces dernières années chez l'animal. Ces expérimentations permettent le développement de molécules potentiellement utilisables chez l'homme.

c. Le pronostic du rejet

L'immunosuppression actuelle ne prévient pas toujours la perte progressive du transplant sur le long terme. Ceci est en partie dû à des épisodes répétés de rejet (cellulaire et/ou humoral) qui altèrent la fonction du transplant au cours du temps. L'un des enjeux actuels est donc de prévenir ces épisodes de rejet afin d'empêcher les lésions occasionnées, aboutissant, à terme, à une dysfonction chronique du greffon. Pour cela l'objectif est de trouver, de manière non-invasive, des marqueurs pronostiques associés au rejet et/ou à la tolérance afin d'administrer, en fonction du statut immunologique du patient, un traitement adapté évitant l'apparition de lésions chroniques irréversibles liées à ces phases de rejet, et entraînant la perte progressive du transplant.

B. Fondamentaux de l'activation lymphocytaire T

Le système immunitaire est le principal système de défense de l'organisme. Il permet de le protéger contre l'invasion de pathogènes infectieux (bactéries, virus, champignons) et donc de distinguer le « soi » du « non-soi » (cependant ce concept, datant de plus de 60 ans, est remis en cause, et l'hypothèse du « danger » ou de la « continuité » semblent plus appropriées) (Matzinger, 1994; Pradeu & Carosella, 2006). En fonction du type de transplantation (syngénique, allogénique ou xénogénique), le système immunitaire va développer une réponse très variable : alors que dans le cas d'une greffe syngénique, la réponse développée sera minime, lors d'une greffe xénogénique la réponse sera très forte. Seules l'allogreffe et la xénotransplantation induisent un rejet. Les prochaines sections seront décrites dans un contexte de transplantation allogénique ; contexte dans lequel la grande majorité des transplantations sont effectuées.

Les principaux effecteurs cellulaires de la réponse immune contre des tissus allogéniques sont les lymphocytes T et B, nécessitant une activation par les cellules présentatrices d'antigène (CPA ; *i.e.* principalement les cellules dendritiques). En absence d'immunosuppression, après reconnaissance du complexe CMH/peptide portés par les CPA, les lymphocytes T reçoivent des signaux qui déclenche une réponse immune effectrice, principalement de type Th1 (T helper type 1) ou Th2, aboutissant à la dégradation, et donc au rejet du transplant.

L'activation des cellules T allo-réactives nécessite trois signaux. Le premier signal est constitué par l'interaction spécifique du TCR (T Cell Receptor) du lymphocyte T avec le complexe CMH/peptide porté par la CPA. Le second signal est fourni par l'interaction entre les molécules de costimulation, présentes sur les CPA, et leurs récepteurs exprimés par les lymphocytes T. La combinaison de ces deux signaux permet la synthèse et la sécrétion de cytokines, notamment l'IL-2, constituant le troisième signal de l'activation T. Lors de cette activation, la cellule dendritique pourra guider le devenir des lymphocytes T CD4⁺ en fonction des signaux qu'elle-même a reçus (via les lymphocytes T, les pathogènes, le microenvironnement). En fonction de la polarisation du lymphocyte T CD4⁺, la réponse immune se dirigera alors principalement vers une réponse anticorps, dépendante des lymphocytes B (via les Th2), ou vers une réponse cellulaire, dépendante des lymphocytes T CD8⁺ (via les Th1) (cf. **Figure 1**).

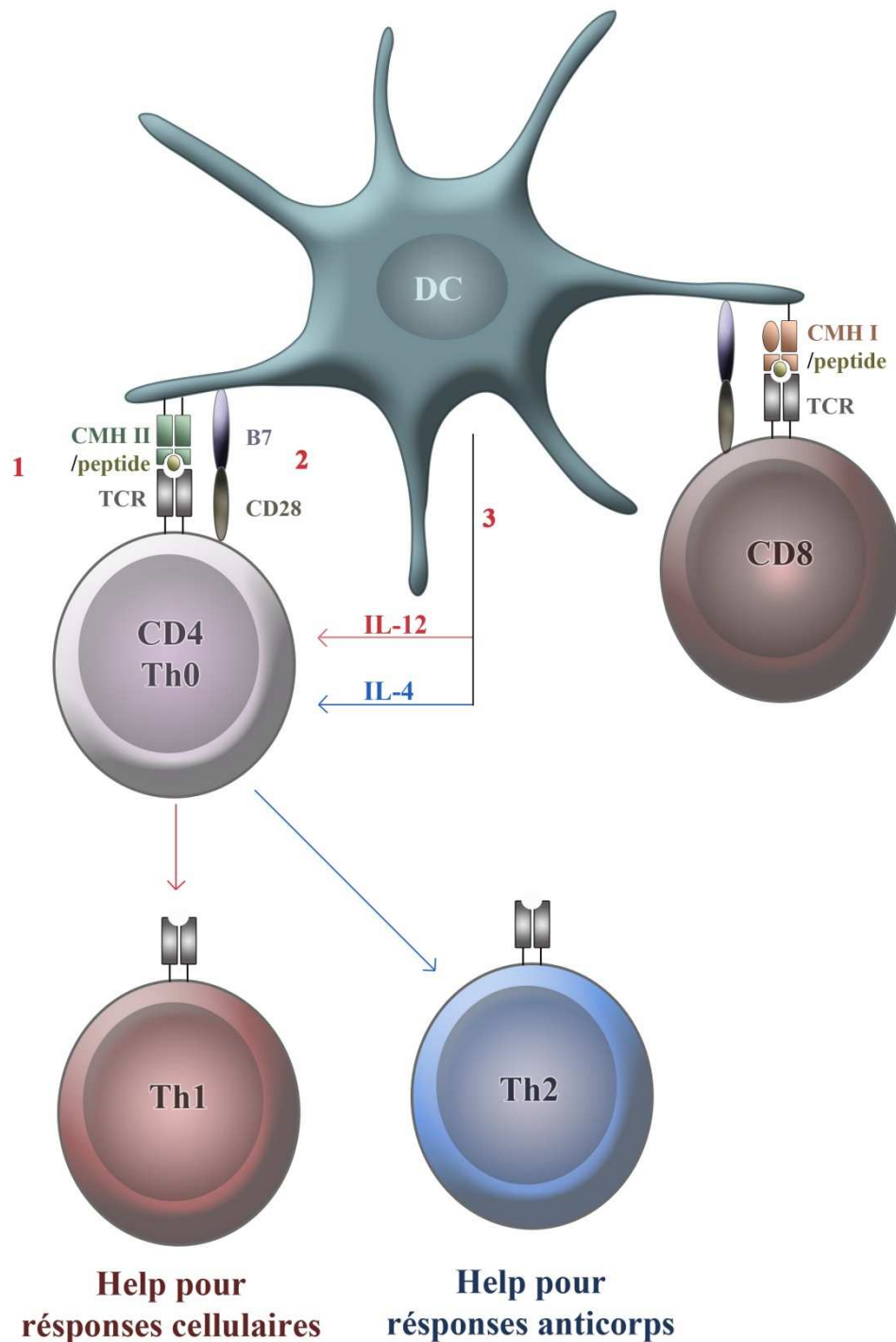


Figure 1 : Principes d'activation à 3 signaux des lymphocyte T CD4+ et polarisation Th1-Th2.

1. Le signal antigénique : signal 1

Le TCR α/β est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β dérivées du réarrangement multiple des segments V, D et J nécessaires à la création d'un répertoire fonctionnel divers. Le TCR étant quasiment dépourvu de domaine intracytoplasmique, la transduction du signal, suite à son interaction avec les molécules de CMH de classe I ou II de la CPA, est fournie par

l'intermédiaire de son association non-covalente avec le complexe CD3. Ce complexe est, quant à lui, constitué de 6 sous-unités : δ , γ et 2 sous unités ϵ et ζ , qui en plus des deux chaînes α et β du TCR s'associent aux corécepteurs CD4 (lymphocyte T CD4⁺) ou CD8 (lymphocyte T CD8⁺) qui déterminent le type de CMH (classe II ou I respectivement) reconnu par le TCR. L'engagement du TCR avec le complexe CMH/peptide est la première étape nécessaire à la formation de la synapse immunologique qui influence les signaux induits par le TCR. En effet, elle permet l'oligomérisation et la phosphorylation du CD3 par la protéine kinase p56Lck (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) au niveau des domaines ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) (A. Weiss & Littman, 1994; Iwashima *et al.*, 1994) afin d'enclencher la cascade de signalisation nécessaire à une transduction efficace du signal antigénique.

2. Le signal de costimulation : signal 2

Le « second signal » par costimulation est nécessaire à l'activation complète des lymphocytes T. En son absence, les lymphocytes T deviennent anergiques et sont donc incapables de répondre à une nouvelle stimulation (Gimmi *et al.*, 1993). Cette anergie peut être levée en court-circuitant le second signal par un apport exogène d'IL-2, composant majeur du troisième signal (Beverly *et al.*, 1992). Ce signal de costimulation, fourni par un ensemble de molécules amplifie le signal transduit par le complexe TCR-CD3. Enfin, les molécules de costimulation elles-mêmes transduisent un signal aux lymphocytes T, indépendamment du CD3 (Bjorndahl *et al.*, 1989). Quatre grandes familles de molécules de costimulation sont décrites dans la littérature et de nouvelles molécules de costimulation sont découvertes régulièrement. Entre autres, sont distinguées la superfamille des immunoglobulines (dont CD28 et CTLA-4 [Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4]), la superfamille du TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor ; dont CD40L [CD40 Ligand]), la superfamille des intégrines (dont LFA-1 [Lymphocyte Function-associated Antigen-1], VLA-4 [Very Late Antigen-4]) et la superfamille des TIM (T-cell Immunoglobulin domain and Mucin domain). Chacune d'entre elles étant composée de molécules de costimulation activatrices et inhibitrices.

3. Le signal des cytokines : signal 3

A la suite des signaux 1 et 2, les lymphocytes T progressent dans leur cycle cellulaire jusqu'à la mitose. Lors de ce processus, les signaux émanant des cytokines sont décisifs et déterminent le devenir des cellules. L'IL-2, produite par les lymphocytes T helper CD4⁺, joue

notamment un rôle pivot en induisant des signaux de prolifération aux lymphocytes T CD8⁺ et, l'IL-12 dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ de type Th1. C'est pourquoi son expression est finement régulée par les signaux émanant du TCR, de ses corécepteurs et de certaines molécules de costimulation. Certaines molécules immunosuppressives, tels que la Cyclosporine A (CsA) ou le Tacrolimus (FK506), agissent en inhibant la calcineurine nécessaire à la synthèse d'IL-2, bloquant ainsi la prolifération des cellules alloréactives (Clipstone & Crabtree, 1992).

4. La polarisation lymphocytaire

Lors du troisième signal, la cellule dendritique va jouer le rôle du « chef d'orchestre » de la réponse immune puisque, selon les cytokines qui vont être sécrétées en réponse aux « dangers » reconnus, et selon le signal de costimulation, le lymphocyte T CD4⁺ naïf (Th0) va se différencier en différents types de T helper, ou auxiliaires (Th), ayant leurs propriétés propres, en lymphocytes T mémoires, ou en T régulateurs ayant comme rôle de supprimer/limiter la réponse immune. C'est en 1986 que Mossmann et Coffman ont décrit pour la première fois la division des lymphocytes T CD4⁺ en deux sous types fonctionnels désignés T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2) en se basant sur leur production de cytokines (Mosmann *et al.*, 1986). Actuellement, plusieurs types de lymphocytes T CD4⁺ ont été décrits :

- Des lymphocytes effecteurs : les Th1, les Th2, les Th17, les T follicular helper (Tfh), et plus récemment les Th9 et les Th22 ; cependant les plus connus restent les Th1 et les Th2.
- Des lymphocytes régulateurs : les T régulateurs naturels (nTreg), les T régulateurs induits (iTreg), les Tr1 et les Th3.

Leurs classements a été établi selon leur production de cytokines, leur facteur de transcription, et par l'expression de récepteurs spécifiques de certaines chimiokines. Les cellules auxiliaires de type effecteur n'ont pas une action directe (activité cytolytique ou phagocytaire), mais agissent en activant et en dirigeant les autres cellules du système immunitaire.

a. Lymphocytes T CD4⁺ effecteurs

La sécrétion d'IL-12 et/ou d'IFN, par les cellules dendritiques, ou d'IFN- γ (InterFeroN- γ), par les cellules NK (Natural Killer), NKT et lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, lors du troisième signal entraîne une signalisation qui, via STAT4 (Signal Transducer and

Activator of Transcription 4) (Abbas *et al.*, 1996; I.-C. Ho & Glimcher, 2002) , permet la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïves en lymphocytes Th1 (K. M. Murphy & Reiner, 2002); ces cellules sont impliquées dans les réponses cellulaires (lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques : CTL) et dans les réponses contre des pathogènes intracellulaires. Ils produisent majoritairement de l'IFN- γ , de l'IL-2 et du TNF- β (Tumor Necrosis Factor- β), des cytokines qui : favorisent une différenciation Th1 (déviation Th1), activent les NK, la production d'IgG2a, stimulent la phagocytose et la destruction de pathogènes intracellulaires par les macrophages notamment. Il a aussi été décrit que, en se liant à ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1) ou ICAM-2, la molécule d'adhésion LFA-1 favorise la différenciation Th1 (Rizzo *et al.*, 1995; B. Salomon & Bluestone, 1998). Ces cellules expriment le facteur de transcription T-bet (S. J. Szabo *et al.*, 2000), nécessaire à leur différenciation, et le récepteur de chimiokines CCR5 (C-C chemokine Receptor type 5) (Turner *et al.*, 2007). Plusieurs pathologies inflammatoires et auto-immunes sont associées à un profil de type Th1, dont le diabète, la sarcoïdose, la maladie de Crohn ou l'athérosclérose (Csorba *et al.*, 2010; Romagnani, 2006). En transplantation, une incompatibilité CMH de classe I et II favorise une réponse de type Th1 (Le Moine *et al.*, 2002) ; les lymphocytes T CD4⁺ sont activés de façon directe et indirecte et se différencient en Th1 par action de l'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T CD8⁺, eux-mêmes activés par le CMH de classe I de manière directe. Egalement, le cas d'incompatibilités des CMH de classe I isolées favorise une réponse de type Th1, les lymphocytes T CD4⁺ étant activés par alloreconnaissance indirecte et différenciés en Th1 par action de l'IFN- γ produit par les CD8⁺ activés de manière directe.

Les lymphocytes Th2 sont quant à eux induits par la production d'IL-4 par les cellules dendritiques, engendrant une signalisation via STAT6, mais pourraient aussi être induits par une forte costimulation CD28 activant NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) et GATA-3 (GATA-binding-factor 3) (K. M. Murphy & Reiner, 2002), ou par la production d'IL-33 (Yanagawa *et al.*, 2011). Ils sont impliqués dans la réponse immune humorale et dans la défense contre les pathogènes extracellulaires. Ces cellules sont caractérisées par la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-13. L'IL-4 stimule la production d'anticorps d'isotypes IgG1 et IgE, alors que l'IL-5 stimule les éosinophiles (Romagnani, 2006; Rizzo *et al.*, 1995). Les Th2 expriment le facteur de transcription GATA-3, le récepteur de chimiokines CCR3 et sont décrits comme dominants en cas d'allergies et d'asthme. Récemment des études ont montré que les Th2 pouvaient se différencier, sous l'action du TGF- β , en cellules productrices d'IL-9, les Th9 (impliquées dans l'asthme) (Xing *et al.*, 2011). En transplantation, des

incompatibilités du CMH de classe II, seules, induisent préférentiellement des réponses de type Th2, les lymphocytes T CD4⁺ étant les seuls à être activés de façon directe et indirecte (Le Moine *et al.*, 2002). Il est à noter que le TGF- β empêche la différenciation Th1 et Th2, car il inhibe l'expression de T-bet et de GATA-3 (C. B. Wilson *et al.*, 2009).

En transplantation, il est généralement décrit que les lymphocytes de type Th1 sont impliqués dans la phase de rejet aigu du transplant (D'Elios *et al.*, 1997; Atalar *et al.*, 2009), alors que les lymphocytes de type Th2 sont impliqués dans le rejet chronique (Illigens *et al.*, 2009; Koshiba *et al.*, 2003). Cependant des études montrent qu'un profil Th2 est favorable à l'induction de tolérance (Amarnath *et al.*, 2011), et que le rejet chronique est lié à une réponse combinant Th1 et Th2 (Illigens *et al.*, 2009; Obata *et al.*, 2005). D'autres travaux montrent que le rejet aigu et chronique sont induits par les Th1, et que les Th2 empêchent l'apparition du rejet (Waaga-Gasser *et al.*, 2009; Loverre *et al.*, 2011). Malgré un rôle encore mal défini des Th2 dans le rejet, celui des Th1 semble bien être délétère dans tous les cas.

Les lymphocytes Th17, découverts récemment, sont induits par la production d'IL-6 et de TGF- β . Comme leur nom l'indique, ils produisent de l'IL-17, et ils expriment le facteur de transcription ROR γ T (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ isoform T). L'IL-23, ainsi que l'IL-21, permettent leur prolifération et la sécrétion d'IL-17. On retrouve ces cellules à l'interface entre l'environnement extérieur et intérieur (*i.e.* peau, tractus digestif). Elles permettent d'éliminer les champignons et bactéries en sécrétant des défensines et en recrutant des cellules « éboueurs » tels que les neutrophiles. Comme l'IL-17 entraîne la production de TNF, d'IL-6 et d'IL-1 β , ces cellules sont décrites comme très inflammatoires et responsables de maladies auto-immunes, telles que l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), la maladie de Crohn, le psoriasis, ou la colite ulcéreuse (Afzali, Lombardi, *et al.*, 2007; A. Kimura & Kishimoto, 2011). Les lymphocytes Th17 seraient aussi impliqués dans les phases précoces du rejet.

Les Tfh (T follicular helper) ont, eux aussi, été découverts récemment, et sont retrouvés dans les ganglions lymphatiques au niveau des follicules du cortex. Ces cellules sont induites par action de l'IL-6 et de l'IL-21. Dès lors, elles acquièrent le facteur de transcription Bcl6 (B cell lymphoma 6 protein), expriment le récepteur de chimiokine CXCR5 (C-X-C chemokine Receptor type 5), et migrent dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires afin de stimuler la maturation et la commutation de classe des immunoglobulines (Ig) des lymphocytes B (Fazilleau *et al.*, 2009).

Chacun de ces types de T helper empêche, par l'action de ses cytokines, la différenciation des T CD4⁺ naïfs Th0 en helper d'un autre sous type, mais favorisera sa différenciation dans le même sous type, c'est pourquoi on parle de déviation immune vers un type de helper (*e.g.* déviation Th1, Th2,...). Cependant, il est important de noter que ces cellules possèdent une certaine plasticité, c'est-à-dire que, en fonction de stimuli qui restent à déterminer, elles peuvent passer d'un type de helper à un autre (Bluestone *et al.*, 2009).

b. Lymphocytes T CD4⁺ régulateurs

Ces lymphocytes empêchent l'activation et la prolifération des lymphocytes T. On peut les diviser en deux familles: les lymphocytes T régulateurs innés (*i.e.* nTreg) et les lymphocytes T régulateurs acquis ou induits (*i.e.* iTreg, Tr1 et Th3). Cette nomenclature vient du fait que, alors que les nTreg sont induits dans le thymus, les iTreg sont induits en périphérie (Cottrez & Groux, 2004). Faisant l'objet d'un nombre croissant d'études, la caractérisation de ces cellules, et les divers mécanismes suppresseurs employés, sont progressivement définis.

Les nTreg expriment le CD25 (sous-unité α du récepteur de l'IL-2), CTLA-4 et FoxP3 (Forkhead box P3 ; un facteur de transcription). Ils seraient issus d'une sélection négative qui n'a pas abouti à une délétion, grâce à une reconnaissance d'affinité intermédiaire des autoantigènes présentés dans le thymus. Pour leur génération, il semble que les cellules épithéliales thymiques issues de la moelle soient impliquées, et que le facteur de transcription (AutoImmune REgulator) soit nécessaire (M. S. Anderson *et al.*, 2002). Ces cellules sont spécifiques de l'autoantigène pour lequel elles ont été éduquées, et effectuent leur suppression par contacts, en utilisant divers mécanismes, tels que CTLA-4, mais qui restent encore mal définis. Dans certains cas, il a été montré qu'elle puisse agir par sécrétion d'IL-10 (Suffia *et al.*, 2006) et/ou de TGF- β (Levings *et al.*, 2002). Une récente étude a montré que les nTreg pourraient se transformer en T folliculaires régulateurs (Tfr), *in vitro*. Ces cellules, exprimant Bcl6 et CXCR5, seraient présentes *in vivo* dans les centres germinatifs afin de limiter la maturation des lymphocytes B (Y. Chung *et al.*, 2011). Les nTreg semblent impliqués dans la tolérance en transplantation, puisque l'induction de tolérance est bloquée dans plusieurs études lorsque les nTreg sont déplétés (K. J. Wood & Sakaguchi, 2003).

Les iTreg ressemblent en tous points aux nTreg (expression de CD25, FoxP3, mécanismes suppresseurs), mis à part : leur origine puisqu'ils sont induits en périphérie (*e.g.* organes lymphoïdes secondaires, tissus inflammés), et les antigènes reconnus, car ils peuvent

reconnaître des antigènes ayant diverses origines (*e.g.* soi, alloantigènes, allergènes,...). Ils peuvent cependant être différenciés des nTreg, car ils n'expriment pas le facteur Helios (un facteur de transcription de la famille Ikaros) (Thornton *et al.*, 2010). Les conditions permettant leur développement ne sont pas encore bien définies, mais il semble qu'une stimulation du TCR, la présence d'IL-2 et de TGF- β soient nécessaires en absence de costimulation activatrice (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009). *In vitro*, on peut les obtenir après une stimulation du TCR et une costimulation CD28, en présence d'IL-2 (Shatry *et al.*, 2009). Les iTreg s'avèrent être impliqués dans plusieurs protocoles inducteurs de tolérance vis-à-vis d'un transplant allogénique (Cobbold *et al.*, 2004; Emamaullee *et al.*, 2010; Poirier *et al.*, 2010).

Que ce soit les nTreg ou les iTreg, en exprimant le facteur FoxP3, ces cellules peuvent perdre leurs activités suppressives et se différencier en cellules effectrices (X. Zhou *et al.*, 2009). Récemment, un mécanisme d'expansion des iTreg et nTreg dépendant de l'IL-4 a été décrit (Pillai *et al.*, 2009). Plusieurs études montrent que les Treg naturelles ou induites sont impliquées dans la tolérance périphérique, afin d'éviter les réponses autoimmunes (Brusko *et al.*, 2008). La présence persistante d'alloantigènes peut entraîner l'expansion des nTreg et des iTreg alloréactifs, mais ces cellules peuvent aussi perdre leurs fonctions suppressives (K. J. Wood, 2011). En transplantation, les stratégies s'appuyant sur une utilisation des fonctions suppressives spécifiques des Treg vis-à-vis des cellules alloréactives, en augmentant la présence de iTreg et nTreg (en les générant *in vivo* et/ou *in vitro*), s'avèrent être prometteuses.

Les cellules Tr1 sont antigène-spécifiques, n'expriment pas FoxP3, et sont induites en périphérie par activation du TCR en présence d'IL-10. Elles pourraient être induites par des cellules dendritiques produisant moins d'IL-12 et plus d'IL-10, ou/et ayant un défaut de costimulation (Shevach, 2006; Cottrez & Groux, 2004). Leurs mécanismes de suppression passent par la production d'IL-10 et de TGF- β , bloquant la différenciation Th1 et Th2 (Akl *et al.*, 2005); mais ces cellules pourraient aussi agir de manière contact-dépendant (Vieira *et al.*, 2004).

Les cellules Th3 sont, quant à elles, induites par de faibles doses d'antigènes par la voie orale et sont productrices de TGF- β . Peu d'études les identifient comme dominantes dans les différents modèles observés (Shevach, 2006; Silva-Campa *et al.*, 2009).

C. Le rejet

Le rejet de greffe (ou de transplant) est la complication majeure de la greffe. Ce phénomène intervient sous différentes formes et dépend essentiellement des réactions immunologiques du receveur contre le greffon du donneur. A terme, il aboutit à une dysfonction non réversible du greffon.

1. Les facteurs pré-greffes influençant la survenue du rejet

a. Origine du transplant

En France, 90% des reins transplantés étaient prélevés à partir de donneurs en mort encéphalique en 2010. Cependant, l'état de mort cérébrale a un impact négatif sur le devenir du transplant. Les reins transplantés à partir de donneurs en mort cérébrale ont une survie diminuée par rapport à ceux de donneurs vivants de même tranche d'âge (Terasaki *et al.*, 1995). Ces greffons sont potentiellement endommagés avant le prélèvement, car l'état de mort cérébrale s'accompagne de changements systémiques et hormonaux dès que la pression intracrânienne augmente, conduisant globalement à des phénomènes ischémiques. D'importants mécanismes immunologiques sont aussi associés à la mort cérébrale et conduisent à augmenter l'immunogénicité du greffon (Bos *et al.*, 2007) par activation de l'endothélium, surexpression de molécules d'adhésion (E- et P- sélectines, VCAM [Vascular Cell Adhesion Molecule 1] , ICAM, LFA-1) et du CMH de classe II et sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , TGF- β , IFN γ ...). Tous ces mécanismes induisent un gradient chimiotactique qui favorise l'infiltration leucocytaire dans les tissus, dont le futur greffon (qui sera amplifiée par les mécanismes d'ischémie/reperfusion), et expliquant que ces greffons sont sujets à des épisodes de rejet et de retard de démarrage plus fréquents (Pratschke *et al.*, 2005), mais également à des dysfonctions à long terme plus fréquentes (Pratschke *et al.*, 2008).

b. La chirurgie

Le stress d'une chirurgie invasive est inducteur de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α , l'IL-1 et l'IL-6 activant l'immunité innée, cellulaire et humorale. Une incision chirurgicale est suffisante pour générer une réponse de type Th1 (activation des monocytes, macrophages et des lymphocytes T cytotoxiques), alors qu'une déviation vers une réponse de type Th2 (activation des éosinophiles, des mastocytes et des lymphocytes B) est plutôt décrite dans les interventions chirurgicales plus invasives, telles qu'une transplantation d'organe ou

une chirurgie « ouverte » (E. Lin *et al.*, 2000). La chirurgie peut également être responsable d'un désordre de la microvascularisation suite à une perte de sang intra-opératoire significative (Ni Choileain & Redmond, 2006), ce qui entraîne une accumulation de leucocytes adhérents à l'endothélium de ces vaisseaux, et une augmentation de la perméabilité vasculaire.

c. L'Ischémie/Reperfusion (I/R)

Le phénomène d'I/R est un des facteurs « non-immunologiques » influençant le plus le devenir du greffon. Une ischémie est une diminution de l'apport sanguin à un organe, qu'elle soit « chaude » (durant le prélèvement) ou « froide » (période entre la fin du prélèvement et la restauration de la circulation de l'organe lors de la transplantation), toutes deux délétères, même si le froid freine le métabolisme et donc les lésions occasionnées. Du fait d'une diminution de l'apport sanguin, l'ischémie entraîne une privation d'oxygène, et donc un phénomène d'hypoxie cellulaire aboutissant à l'accumulation de radicaux libres et de produits du métabolisme. Le manque d'oxygène empêche la phosphorylation oxydative de fonctionner et donc de produire de l'ATP (Adenosine-5'-TriPhosphate), conduisant à une acidose tissulaire par glycolyse anaérobie afin de combler le manque en ATP. La privation en ATP induit également l'inhibition de certaines pompes nécessaires au maintien des potentiels de membrane. C'est le cas de la phosphatase membranaire Na^+/K^+ , qui va laisser alors le sodium entrer et s'accumuler dans la cellule, entraînant une importante entrée d'eau dans le cytoplasme et par conséquent un œdème du tissu (Pratschke *et al.*, 2008). Ce n'est cependant pas tant l'ischémie qui est la plus délétère, mais plutôt la reperfusion du greffon qui est la phase inductrice des lésions dues à l'ischémie. Les processus de réparation, qui se développent durant plusieurs heures à plusieurs jours après l'ischémie, s'accompagnent également de nombreux mécanismes d'apoptose, d'autophagie et de nécrose. Comme l'apoptose requiert de l'énergie et la synthèse de protéines, elle se déclenche principalement après reperfusion. La reperfusion est également responsable : d'une activation importante de l'immunité innée par la libération de ligands endogènes de PRRs (Pattern Recognition Receptors), de la création d'un environnement pro-coagulant, et de l'augmentation de l'immunogénicité du greffon. Comme la mort cérébrale, elle induit la surexpression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et le recrutement leucocytaire, en particulier de polynucléaires neutrophiles qui à leur tour vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires dans le greffon. Ce phénomène créant un gradient chimiotactique va ainsi initier le recrutement d'autres leucocytes. Les « signaux de danger » ou « alarmines »,

évoqués par Matzinger (Matzinger, 1994), pourraient être à l'origine du recrutement et de l'activation leucocytaire induits par les phénomènes de reperfusion (Kosieradzki & Rowiński, 2008). Les signaux de danger (DAMP ; Danger-Associated Molecule Pattern) peuvent être des ADN (Acide DésoxyriboNucléique), ou ARN (Acide RiboNucléique) du greffon, des protéines oxydées, des lipides, ou de l'acide urique activant les différents Toll-like receptors (TLRs). Plusieurs études montrent l'implication dominante du TLR-4 dans les phénomènes d'I/R, puisque les lésions occasionnées sont absentes chez des rats knock-out pour le TLR4 (P. Zhao *et al.*, 2009), mais aussi pour le TLR-2 (Arslan *et al.*, 2010). De manière intéressante, il semble que les cytokines de type Th1 induites par l'ischémie/reperfusion, et tout particulièrement l'IL-12 (dans une moindre mesure l'IFN- γ), jouent un rôle majeur dans les lésions engendrées (de Paiva *et al.*, 2009). En transplantation rénale, le phénomène d'I/R prend une ampleur importante au-delà de 24h de conservation, justifiant une logistique importante pour réduire les temps de transplantation. La première conséquence du phénomène d'I/R est le retard de démarrage du greffon, défini par une insuffisance fonctionnelle de l'organe greffé. En plus d'une prévalence accrue des rejets aigus et chroniques induite par les phénomènes liés à l'I/R, il existe une corrélation, en greffe rénale, entre l'I/R et des dysfonctions chroniques à long terme (Pratschke *et al.*, 2008).

2. Les prémices du rejet : l'alloreconnaissance

Les mécanismes par lesquels les lymphocytes T du receveur reconnaissent comme « étranger » le tissu allogénique du donneur (individu de la même espèce, mais de fonds génétiques différents) constituent l'alloreconnaissance (Rogers & R. I. Lechler, 2001) ; une étape mettant en exergue le rôle crucial des cellules dendritiques dans la mise en place d'une réponse immune contre le transplant, et donc, dans son devenir. Elle s'effectue par le biais d'alloantigènes issus du donneur, qui sont les produits de gènes polymorphes divisés en deux familles : les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH, divisés en deux catégories : les molécules de classe I, et celles de classe II) et les antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgmH). Les CMH induisent des réponses immunes très fortes, tandis que les antigènes mineurs n'induisent des réponses que très rarement : la réponse immune dominante sera celle dirigée contre les CMH. L'alloreconnaissance peut se faire selon trois mécanismes différents : la voie directe, la voie indirecte et la voie semi-directe de présentation antigénique. Ces voies peuvent être impliquées dans le rejet d'allogreffe de façon simultanée (cf. **Figure 2**).

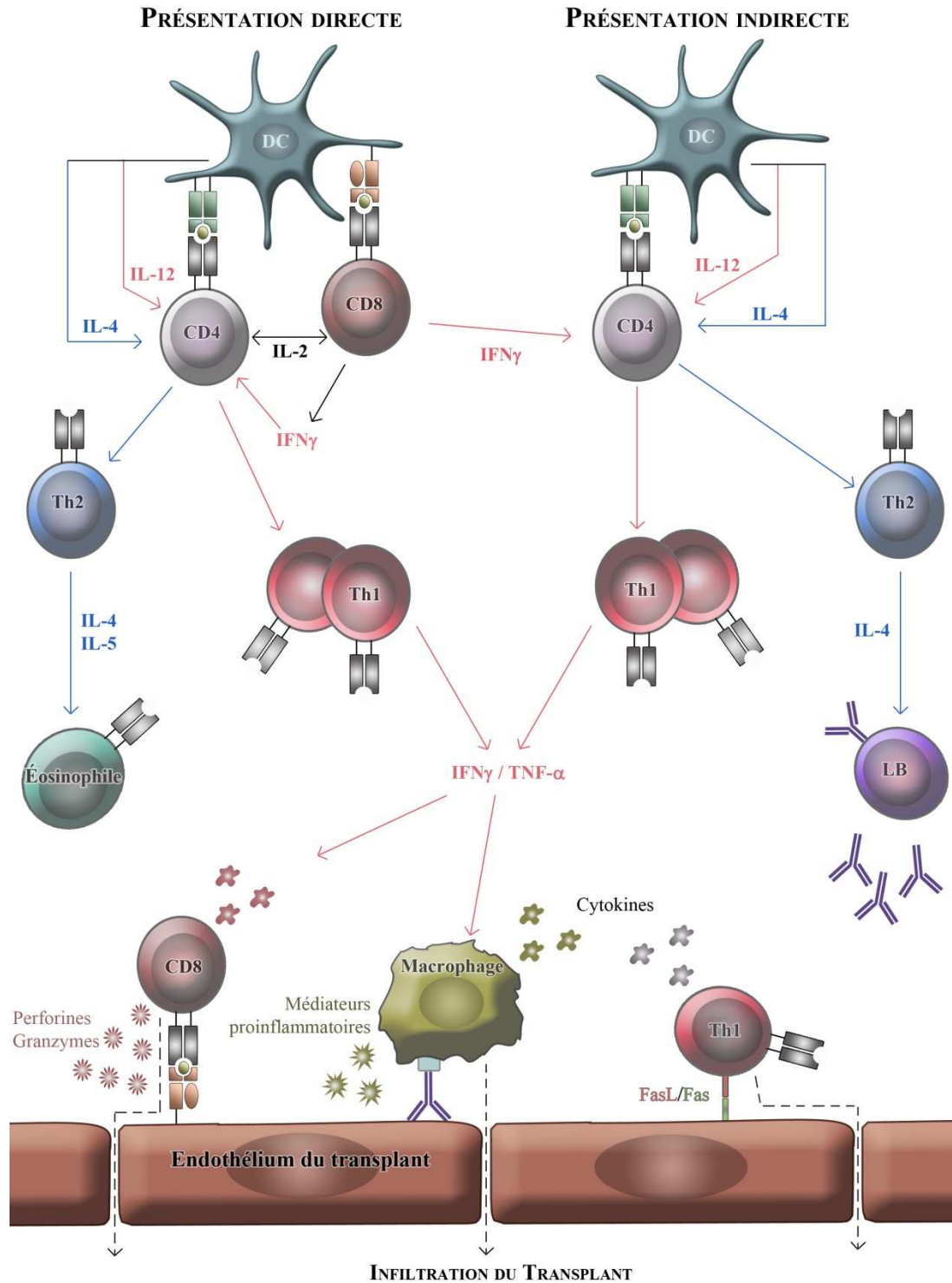


Figure 2 : Représentation schématique des réponses cellulaires en transplantation.

En rouge, en cas d'incompatibilités de classe I et II, en bleu en cas d'incompatibilité de classe II isolées. Les actions de l'IL-12 et de l'IL-4 sur le devenir de la réponse sont données à titres informatifs.

a. L'alloreconnaissance directe

L'alloreconnaissance directe est le premier mécanisme d'alloreconnaissance à avoir été découvert et représente la voie majoritaire. Elle est définie comme la reconnaissance directe, par les lymphocytes T du receveur, de molécules intactes du CMH sur les cellules du donneur (classe I : sur toutes les cellules ; classe II : sur les CPA majoritairement). Les CPA du donneur migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur (car activées par l'inflammation liée à la chirurgie) et activent ainsi fortement les lymphocytes T du receveur (C. Daniel *et al.*, 1998). Le fait que la reconnaissance du CMH par les lymphocytes T soit directe (pas de digestion, ni de présentation d'alloantigènes sur les CMH du receveur), avec le fait que la fréquence en lymphocytes T spécifiques des molécules de CMH allogéniques soit importante, font que la réponse allogénique engendrée est très rapide et vigoureuse (Afzali, R. I. Lechler, *et al.*, 2007). Les études de Talmage ont montré l'importance de cette voie puisque, en déplétant les leucocytes issus du transplant du donneur, le rejet d'allogreffes thyroïdiennes était prévenu, tandis que la réinjection de CPA du donneur (macrophages) rétablissait le rejet (Talmage *et al.*, 1976). Cette voie est majoritaire sur une période courte post transplantation, car les CPA du donneur vont mourir et sont éliminées au court du temps. Cependant, les lymphocytes T CD8⁺ pourront toujours utiliser cette voie, étant donné que les cellules du transplant, dont l'endothélium, expriment le CMH de classe I (Kreisel, Krupnick, Gelman, *et al.*, 2002). La voie d'alloreconnaissance directe semble jouer un rôle prépondérant dans les rejets aigus précoces lorsque les CMH I et II sont incompatibles (M. Y. Braun *et al.*, 1993).

b. L'alloreconnaissance indirecte

Cette voie réfère à la reconnaissance de peptides digérés issus du CMH allogénique du donneur, et présentés par les CMH du receveur (K. Inaba *et al.*, 1998). Ce mécanisme est la voie classique d'une réponse immunitaire contre un antigène, où une CPA apprête un peptide étranger de pathogène sur ses CMH pour développer une réponse immune contre celui-ci. D'une manière générale, un antigène exogène (ici l'alloantigène) est digéré et apprêté sur les CMH de classe II (et donc par les CPA), ainsi l'alloreconnaissance indirecte génèrera principalement des Lymphocytes T CD4⁺ alloréactifs, cependant, de manière moins fréquente, ces antigènes peuvent être apprêtés sur les CMH de classe I par « présentation croisée » (Morón *et al.*, 2004), générant donc des Lymphocytes T CD8⁺ alloréactifs (M. L. Albert *et al.*, 1998). L'importance de cette voie est suggérée par des études d'immunisations sur animaux avec des peptides de CMH allogéniques (qui, par définition, seront présentés par la voie indirecte) entraînant un rejet vigoureux de l'allogreffe. De même, lors d'une réponse

anticorps contre des tissus transplantés, l'activation des lymphocytes B est dépendante de l'aide des lymphocytes T $CD4^+$ stimulés via l'alloreconnaissance indirecte. En transplantation, l'alloreconnaissance indirecte a été corrélée avec l'apparition du rejet chronique (Benichou, 1999; Heeger, 2003) ainsi que dans le développement du rejet aigu d'allogreffe chez le rongeur (Fangmann *et al.*, 1992) et chez l'homme (Z. Liu *et al.*, 1996). Plusieurs études cliniques ont mis en évidence que la fréquence des lymphocytes T activés par la voie indirecte de présentation augmentait au cours du temps chez les patients présentant un rejet chronique à la suite d'une transplantation de cœur, de foie ou de rein (Hornick *et al.*, 2000; Vella *et al.*, 1997; Z. Liu *et al.*, 1996).

c. L'alloreconnaissance semi-directe

Récemment, plusieurs études ont montré que des molécules intactes à la surface des cellules, dont le CMH, peuvent être transférées entre les cellules du système immunitaire; ces cellules devenant capable de stimuler des réponses T (J. F. Huang *et al.*, 1999; Tsang *et al.*, 2003). Selon ce principe, les DC (Cellules Dendritiques) du receveur pourraient donc obtenir des CMH de classe I et II à partir de cellules du donneur par alloreconnaissance semi-directe, stimulant ainsi de façon directe les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, tout en présentant des peptides digérés et apprêtés sur des CMH de classe II du receveur qui stimulent les lymphocytes T $CD4^+$ par voie indirecte. Cependant, elle ouvre aussi la possibilité qu'un lymphocyte T pourrait acquérir une propriété stimulatrice ou inhibitrice (tout comme une CPA) de lymphocytes T $CD4^+$, en présentant à sa surface des CMH de classe II/peptides. Cliniquement, la contribution relative de l'alloreconnaissance semi-directe au rejet n'a pas encore été démontrée.

3. La phase effectrice du rejet

Une fois l'alloreconnaissance amorcée, la phase effectrice du rejet se déclenche (Rocha *et al.*, 2003). Elle se décline en deux réponses : une réponse cellulaire précoce, et une réponse humorale généralement plus tardive. Tandis que la réponse cellulaire est caractéristique de l'activation des lymphocytes T, la réponse humorale se réfère à une réponse dépendante des anticorps produits par les lymphocytes B.

a. La réponse cellulaire T cytotoxique

La génération de lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques (CTL) spécifiques des alloantigènes est le mécanisme immunologique effecteur majeur du rejet. Les CTL sont

activés par les molécules CMH de classe I du donneur, présentées, dans le transplant, par les CPA, mais aussi par les cellules endothéliales du donneur, sous assistance des lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 (Speiser & Romero, 2010). L'activation des CTL par les cellules endothéliales peut, à elle seule, induire un rejet aigu (Kreisel, Krupnick, Balsara, *et al.*, 2002). Même si la nécessité d'un signal antigénique par le CMH de classe I est reconnue, l'importance de la costimulation dans l'activation de ces CTL reste, quant à elle, controversée. Après transplantation cardiaque, des études ont montré qu'un blocage de l'interaction CD40-CD40L avait un effet inhibiteur direct sur l'activation des CTL (Y. Zhai *et al.*, 2003; Guillonnet *et al.*, 2007) d'autres montrent l'inverse (N. D. Jones *et al.*, 2000). Cependant lorsque ces voies majeures de costimulation sont bloquées (CD28/B7, CD40/CD40L), les molécules alternatives de costimulation (LFA-1, LIGHT [homologous to Lymphotoxins, exhibits Inducible expression, competes with herpes simplex virus Glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes]) doivent prendre le relais et jouer un rôle important dans l'activation des CTL (Corbascio *et al.*, 2002; Scheu *et al.*, 2002).

Dans les trois premiers jours suivant l'activation des précurseurs de CTL, la formation de granules cytotoxiques (contenant notamment des perforines et granzymes, mais aussi de la serglycine, de la calréticuline, du FasL [Fas Ligand] et de la granulysine) peut être détectée (J. H. Russell & Ley, 2002). Dès lors que le TCR et le CD8 du CTL s'engagent dans une interaction spécifique avec le CMH de classe I de la cellule cible, les granules fusionnent avec la membrane du CTL libérant ainsi son contenu dans la synapse immunologique. En présence de calcium, les perforines s'assemblent en polyperforines et s'insèrent à la membrane de la cellule cible pour faciliter l'import de granzyme B (Metkar *et al.*, 2002). Cette chaîne d'évènement est connue sous le nom de la voie d'exocytose des granules (GE) et aboutit à l'apoptose de la cellule cible via plusieurs voies telles que le clivage direct de la procaspase-3, et l'activation indirecte de la procaspase-9 (Sutton *et al.*, 2000; G. Q. Wang *et al.*, 2001). De façon intéressante, dans des transplants de cœur humains allogéniques, l'intensité du marquage de la caspase-3 corrèle avec le rejet (J. Narula *et al.*, 2001), tandis que l'inhibition de la caspase-3, *in vivo* chez le rat, prolonge des transplantations de cœur allogéniques (Kown *et al.*, 2000). Les CTL utilisent aussi la voie Fas-dépendante pour induire l'apoptose et la cytolysse de la cellule cible. FasL est stocké dans les granules cytotoxiques puis libéré dans la synapse immunologique, mais elle est aussi présentée à la membrane des CTL pour agir directement sur le récepteur Fas présent à la surface de la cellule cible (Ju *et al.*, 1994). Des

études montrent le rôle dominant de la voie GE en comparaison à celle Fas-dépendante dans le rejet. Ainsi Kupnick *et al.* ont-ils démontrés *in vitro* que, la réponse cytotoxique des CTL sur des cellules endothéliales du donneur déficientes en Fas et FasL n'était pas perturbée (Krupnick *et al.*, 2002).

Malgré un rôle prouvé des différentes molécules impliquées dans la cytotoxicité médiée par les CTL et donc dans le rejet, dans d'autres circonstances elles peuvent avoir un rôle protecteur puisqu'il a par exemple été suggéré que les perforines des cellules du donneur pourraient réguler la réponse immune du receveur en induisant l'apoptose de ces cellules (Bose *et al.*, 2003). Ainsi une étude a-t-elle montré chez l'homme que l'expression de FasL était inversement corrélée à la survenue d'un rejet aigu sur les biopsies de rein allogéniques (Porter *et al.*, 2000). Une autre étude a montré que la surexpression de FasL sur une allogreffe thyroïdienne empêchait le rejet et résultait en une suppression de l'activité des CTL spécifiques du donneur (Tourneur *et al.*, 2001).

Des études récentes suggèrent l'implication des cellules NK dans le rejet allogénique de greffes de moelle osseuse (W. J. Murphy *et al.*, 1987) et dans la régulation de la prolifération des LT CD4⁺ responsables des phénomènes de GVHD (Graft-versus-host disease) associés (Noval Rivas *et al.*, 2010), mais aussi dans le rejet d'organes (Ogura *et al.*, 2001; A. Ito *et al.*, 2008). Ces cellules doivent, elles-aussi, être impliquées dans le rejet car dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat, une étude montre qu'un blocage de la costimulation CD28 n'était pas suffisant pour induire une survie à long terme tant que la déplétion des cellules positives pour le récepteur NK n'était pas réalisée (Maier *et al.*, 2001). Cependant, l'importance de ces cellules dans un contexte dans lequel les lymphocytes T ont une fonction normale n'a pas été clairement démontrée.

b. L'hypersensibilité retardée (DTH)

L'hypersensibilité se réfère à des réactions indésirables médiées par le système immunitaire et est classifiée en quatre différents types (I, II, III, IV). En transplantation, se déclare une hypersensibilité de type IV : la DTH. La réponse DTH est dépendante de l'activité des lymphocytes T CD4⁺ de type Th1. Après activation, induite par les alloantigènes en présence d'IL-12, ces cellules vont sécréter des cytokines, telles que l'IFN- γ et le TNF (Gallin, 1999; K. Kobayashi *et al.*, 2001). Ces cytokines ont des actions pro inflammatoires multiples, incluant l'activation des monocytes et des macrophages, des cellules qui sont une des composantes les plus importantes de l'infiltrat cellulaire du transplant. Ce phénomène

induit une amplification de la production de cytokines et de chimiokines, la génération d'enzymes protéolytiques, de protoxyde d'azote (NO), et d'autres facteurs solubles perpétuant une réponse inflammatoire locale. Tout ceci a un impact direct sur le fonctionnement du transplant en agissant sur la tonicité vasculaire, la perméabilité et l'intégrité des tissus. Une fois que la réponse DTH est amorcée, les médiateurs solubles résultant (principalement les métabolites du métabolisme de l'acide arachidonique, tels que les prostanoïdes et les leukotriènes) agissent de manière antigène-indépendante en induisant un gradient chimiotactique et en activant les cellules du système immunitaire.

Des expériences de transfert adoptif suggèrent qu'une réponse DTH allogénique est capable, à elle seule, d'induire le rejet de greffes de peau. Ainsi, les travaux de Dalloul montrent-il que le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ (à partir de souris CD8^{-/-}) pouvait entraîner un rejet de greffes allogéniques de peau chez des souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency ; souris déficientes en lymphocytes T et B), en l'absence de réponse T cytotoxique (Dalloul *et al.*, 1996). En utilisant le même modèle de greffe de peau, Valujskikh *et al.* ont montré que le transfert adoptif d'une lignée cellulaire Th1 alloréactive, reconnaissant les peptides du CMH du donneur par la voie indirecte (circonstance dans laquelle une réponse T cytotoxique, nécessitant une alloreconnaissance directe, n'est pas possible), était capable d'induire un rejet (Valujskikh *et al.*, 1998). De plus, les greffes étaient infiltrées de manière prédominante par des macrophages, un phénomène corroborant un mécanisme effecteur de type DTH. En mesurant l'intensité d'une réponse DTH donneur-spécifique par injection chez le receveur (en sous cutané) des antigènes du donneur, il est montré que, chez l'homme ou chez les rongeurs, la perte du transplant est associé à une réponse DTH systémique vigoureuse, alors qu'une survie à long-terme du transplant est associé à une réponse DTH limitée ou absente, par action de l'IL-10 et du TGF- β notamment (VanBuskirk *et al.*, 2000).

Malgré le fait qu'un profil cytokinique de type Th2 empêche généralement une réponse cellulaire, il peut aussi induire un rejet de type humoral (J. Karczewski *et al.*, 2008; Franchimont, 2004) et des études récentes suggèrent que ce profil pourrait induire un rejet de type DTH-like médié par les éosinophiles (Le Moine *et al.*, 2002). Ces cellules seraient recrutées par l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 dans le transplant, des cytokines produites par les lymphocytes de type Th2, et elles sécrètent des leukotriènes, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et des granules contenant des protéines ayant une forte activité toxique pour les tissus. Le Moine *et al.* ont ainsi étudié un modèle d'allogreffe de peau chez la souris, pour lequel uniquement les CMH de classe II étaient incompatibles, après déplétion générale

des lymphocytes T. Dans le greffon, qui était alors rejeté de manière chronique au bout de 60 jours, le profil cytokinique était de type Th2, avec une forte expression d'IL-4 et d'IL5 mais pas d'IFN- γ . D'un point de vue histologique, les greffons étaient principalement infiltrés par des éosinophiles et étaient atteints de vasculopathie. En neutralisant l'IL-4 par injection d'anticorps, la vasculopathie et l'infiltrat éosinophilique étaient abolis, tandis que l'utilisation d'anticorps neutralisant l'IL-5, ou l'inactivation par KO (Knock-Out) de l'IL-5, prévenait l'infiltration par les éosinophiles sans empêcher la vasculopathie (Le Moine, Flamand, *et al.*, 1999; Le Moine, Surquin, *et al.*, 1999; M. Y. Braun *et al.*, 2000). Plusieurs études chez les rongeurs montrent donc l'importance des éosinophiles dans une configuration où le rejet est médié par une réponse de type Th2 ; cette observation est d'autant plus intéressante que des infiltrats importants en éosinophiles sont souvent constatés dans les rejets d'allogreffes chez l'homme (Almirall *et al.*, 1993; O. M. Martinez *et al.*, 1993).

c. La réponse anticorps (humorale) et du complément

La réponse anticorps dirigée contre les alloantigènes est la troisième composante majeure du rejet. Même si la production d'immunoglobulines est la fonction propre des lymphocytes B, la contribution des lymphocytes T CD4⁺ de type Th2 est impérative pour permettre leur croissance, leur différenciation, et, à terme, la production d'anticorps.

Les lymphocytes B sont les cellules pivots de l'immunité humorale spécifique (Parham, 2009). Ils accomplissent cette fonction par l'intermédiaire du récepteur spécifique pour l'antigène qu'ils expriment à leur membrane, l'immunoglobuline de surface (sIg). Ils ne possèdent qu'une seule spécificité antigénique qui reste la même sur des isotypes différents. Le stade ultime de l'activation des lymphocytes B par leur antigène spécifique les différencie en plasmocytes dont la seule fonction est de sécréter un anticorps porteur du même paratope que l'sIg des lymphocytes B primordiaux. En périphérie, les lymphocytes B naïfs vont rencontrer leur antigène spécifique dans le ganglion lymphatique au sein du follicule lymphoïde. Leur maturation finale nécessite la présence de cellules folliculaires dendritiques qui leur présentent l'antigène. Pour la majorité des antigènes, il est nécessaire d'avoir également la collaboration de lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ de type Th2. Ces derniers interagissent avec les lymphocytes B qui leur présentent l'Ag par leurs molécules de CMH de classe II, l'interaction de molécules de costimulation (CD40/CD40L, ICOS/ICOSL [Inducible COStimulator Ligand] et CD28/B7) et de cytokines qu'ils sécrètent (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10). Cette différenciation a lieu dans le centre clair germinatif du follicule secondaire : par un

mécanisme d'hypermutations somatiques, les centroblastes de la zone sombre augmentent la diversité et l'affinité de leurs sIg que leurs descendants (centrocytes) sélectionnent au contact de l'antigène dans la zone claire du centre germinatif, avant de donner naissance soit à des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, soit à des lymphocytes B de type mémoire. Lors d'une première rencontre avec un antigène donné (réponse primaire) ou lors de la réintroduction du même antigène (réponse secondaire), la réponse diffère par le délai d'apparition, sa rapidité et son intensité, l'affinité et l'isotype des anticorps (cf. **Figure 3**). La réponse anticorps secondaire apparaît après une phase de latence plus courte. Elle atteint un plateau de niveau plus élevé avec des anticorps d'affinité plus forte et de nature IgG principalement, alors qu'ils sont de classe IgM pour la réponse primaire.

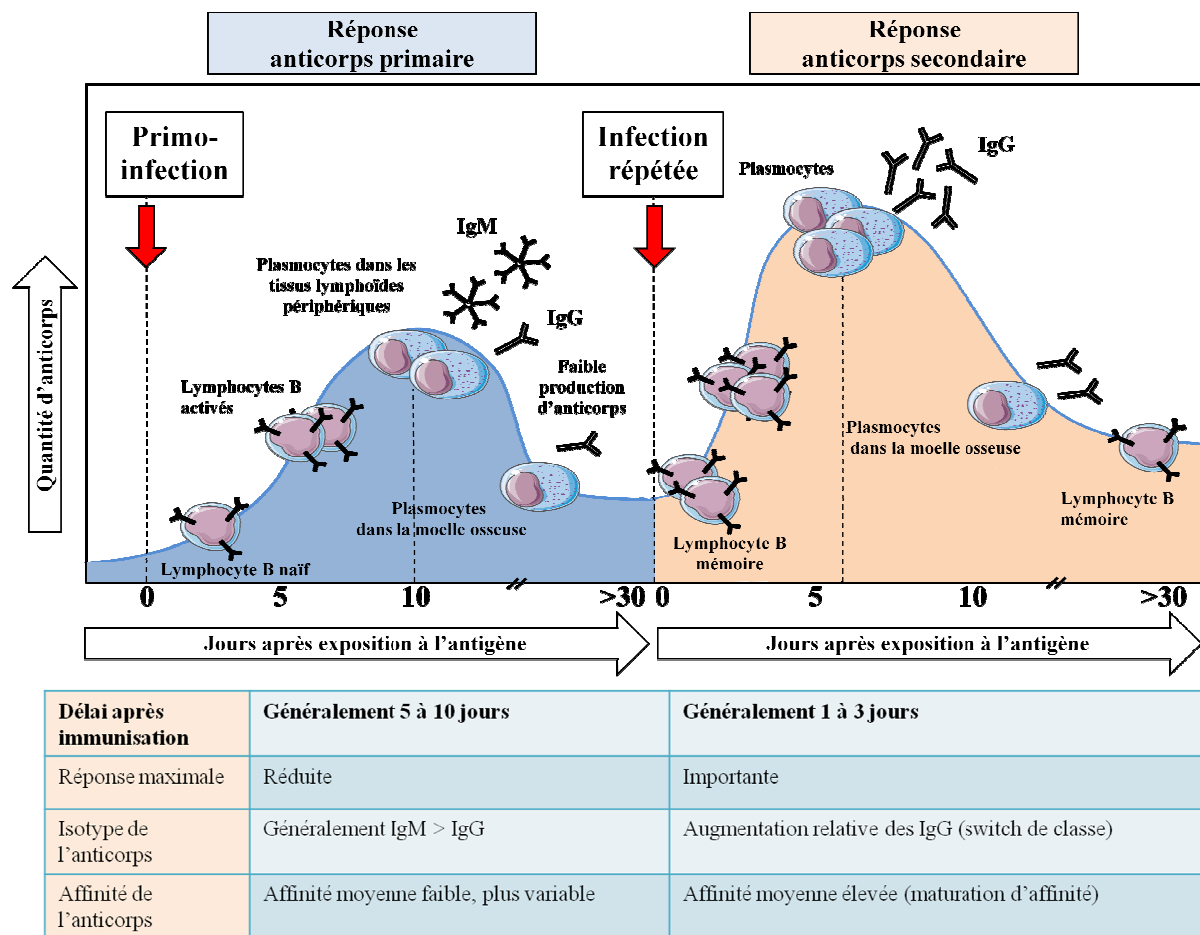


Figure 3 : Représentation schématique et principales caractéristiques des réponses humorales primaires et secondaires dans le temps.

(D'après Abbas, *Bases de l'immunologie Fondamentale*, 2005)

La liaison des alloanticorps sur les antigènes du CMH exprimés sur les cellules endothéliales du transplant entraîne une réponse complexe impliquant le complément (IgG et IgM) et la cascade de coagulation qui conduit à l'opsonisation des cellules cibles et qui recrute et active les cellules inflammatoires : il en résulte des dommages délétères sur le transplant. Les alloanticorps peuvent aussi induire une ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity). Au travers de leurs récepteurs Fc (Fragment crystallizable), les macrophages et les cellules NK se lient au fragment Fc de l'anticorps entraînant la lyse de la cellule cible. Le « cross-linking » des récepteurs Fc des cellules NK déclenche une cytotoxicité médiée par les granzymes et perforines, alors que, sur les macrophages cela entraîne la libération de médiateurs tels que le NO, des ROS, et du TNF- α . Les alloanticorps et le complément sont impliqués dans diverses manifestations cliniques du rejet hyperaigu, du rejet aigu humoral, et du rejet chronique. Cependant, dans certaines circonstances les anticorps et le complément peuvent avoir des effets bénéfiques.

4. Phases cliniques du rejet

D'un point de vue clinique, on distingue plusieurs phases de rejet qui sont fonctions de la rapidité de sa manifestation, des lésions histologiques induites et des mécanismes immunologiques responsables de son déclenchement. La classification de Banff, qui est en perpétuelle évolution, rassemble des critères standardisés qui permettent un diagnostic de la phase clinique du rejet et de sa sévérité.

a. Rejet hyperaigu ou suraigu

Le rejet hyper aigu intervient seulement quelques minutes à quelques heures après une transplantation d'organe chez des patients dits hyperimmunisés. Ce rejet est dû à la présence d'anticorps préformés, dirigés contre les CMH du donneur, qui se lieront aux cellules endothéliales du transplant et activeront la voie classique du complément. Le terme d'hyperimmunisés en allotransplantation se réfère à des individus ayant des titres élevés d'anticorps dirigés contre la majorité (>80%) des molécules du CMH de classe I ou II (HLA chez l'homme) (G. M. Williams *et al.*, 1968). Ces anticorps ont généralement été induits après une transplantation antérieure, une transfusion sanguine ou une immunisation fœto-maternelle lors d'une grossesse non menée à terme (Sumitran, 2000). Lors de la revascularisation, ces anticorps, s'ils reconnaissent leur cible sur l'endothélium, induisent l'activation de ce dernier, se traduisant par l'acquisition rapide d'un phénotype pro-coagulant conduisant à une thrombose des vaisseaux, et par la production d'IL-8 et de MCP-1

(Monocyte Chemotactic Protein-1) recrutant neutrophiles et monocytes *in situ* (Wasowska *et al.*, 2001). Le facteur de von Willebrand (cWF) est relargué à la surface des cellules endothéliales et induit la formation et la stabilisation du thrombus plaquettaire (Lasky, 1992). L'expression de la P-Sélectine par les cellules endothéliales activées va permettre aux neutrophiles et monocytes de s'y fixer, car ils expriment son ligand PSGL-1 (P Selectin Glycoprotein Ligand-1), et va entraîner leur extravasation dans le tissu du transplant (McEver & Cummings, 1997). Par ailleurs, les anticorps préformés activent également la voie classique du complément qui va, par les produits de ses composantes précoces C3a et C5a, jouer le rôle d'anaphylatoxines en attirant les cellules inflammatoires et plaquettes dans la surface ciblée, et agresser l'endothélium par des phénomènes de cytotoxicité induits par ses composantes tardives, formant le complexe d'attaque membranaire (MAC, C5b-9) (Nakashima *et al.*, 2002). Une fois que la cellule endothéliale est dégradée, le facteur de tissu (TF) relargué se lie au facteur VIIa et active la cascade de coagulation.

Cliniquement, cela se traduit par de très violents rejets (parfois avant même que les chirurgiens n'aient refermé le patient) qui conduisent à l'arrêt brutal des fonctions du greffon et qui se caractérisent notamment par des lésions endothéliales, des thromboses capillaires et une nécrose hémorragique du greffon. L'analyse systématique de la présence de ces anticorps avant la transplantation (test de cross match), et la recherche de compatibilité HLA entre donneur et receveur, ont permis de prévenir ce type de rejet, devenu rarissime. De fait, ces patients, développant un grand nombre d'anticorps préformés, restent souvent sur liste d'attente sur une longue période jusqu'à obtention d'un greffon compatible. De nos jours, en cas de cross match positif, aucun traitement n'est capable d'empêcher ce type de rejet aboutissant de manière invariable à la perte du transplant, cependant des protocoles expérimentaux de désensibilisations offrent quelques espoirs.

b. Rejet aigu à médiation cellulaire

Hormis le rejet hyperaigu devenu exceptionnel, le rejet cellulaire est chronologiquement le premier type de rejet auquel est exposée une allogreffe. En absence de traitement immunosuppresseur, le rejet aigu à médiation cellulaire apparaît dans la semaine suivant la transplantation dans les modèles petits ou grands animaux, plus généralement durant les premiers mois suivant la transplantation chez l'homme sous immunosuppression. Ce rejet aigu à médiation cellulaire est dépendant de l'activation lymphocytaire T du receveur : CD4 auxiliaires principalement Th1 (Obata *et al.*, 2005) et CD8 cytotoxiques

(Auchincloss *et al.*, 1993; Pietra *et al.*, 2000). Ce type de rejet est dépendant de la composante T, car les souris déficientes en lymphocytes T ne peuvent pas rejeter leur greffon dans un contexte de CMH différents. L'activation lymphocytaire T est amorcée à la suite de la reconnaissance d'antigènes alloréactifs dans les organes lymphoïdes secondaires et après revascularisation, au niveau de l'endothélium du greffon (Lakkis *et al.*, 2000). Le contexte proinflammatoire au niveau des cellules endothéliales du greffon (T. Collins *et al.*, 1984; Pober & Cotran, 1990) va alors faciliter le recrutement de cellules T effectrices et de macrophages au niveau du site de l'inflammation. Suite à l'activation endothéliale, ces cellules envahissent alors le greffon et en altèrent directement son fonctionnement. De plus, l'activation de cellules cytotoxiques induit des phénomènes cytolytiques au sein du greffon via l'activation de la voie proapoptotique Fas/FasL et par l'exocytose de perforines et de granzymes (Kreisel, Krupnick, Balsara, *et al.*, 2002). Tant que l'élément étranger déclenchant le rejet est reconnu, le processus inflammatoire perdure et l'infiltrat leucocytaire se densifie. Les lymphocytes B ne semblent pas directement jouer un rôle prépondérant dans ce type de rejet ; pourtant leur présence dans les biopsies semble corrélée avec les formes les plus sévères, constituant un facteur de mauvais pronostic de survie de la greffe (Sarwal *et al.*, 2003). En clinique, le rejet aigu à médiation cellulaire est plus ou moins rapide et violent (suivant l'immunosuppression en cours) et se caractérise par une infiltration interstitielle, tubulaire (pour le rein) et vasculaire, plus ou moins dense de lymphocytes et de macrophages auxquels peuvent s'associer dans certains rejets de grade élevé des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Ce type de rejet est maintenant assez bien prévenu par les protocoles classiques d'immunosuppression (prévalence autour de 7 à 10%). Globalement, le renforcement de l'immunosuppression (comme l'ajout de traitements lymphodépresseurs) est assez efficace.

c. Rejet aigu à médiation humorale

Un rejet à composante humorale peut survenir après quelques semaines à quelques mois après transplantation (Sayegh & Colvin, 2003). Il associe, dans la plupart des cas, la présence d'anticorps cytotoxiques dirigés contre des antigènes du donneur et des lésions tissulaires particulières : atteintes de la microvascularisation avec des lésions de type capillarite ou endothélite conduisant globalement à une dégradation des greffons évoluant vers des phénomènes de microthromboses et d'ischémie (Leventhal *et al.*, 1993). Dans la plupart des cas, les alloanticorps sont dirigés directement contre les molécules de CMH du donneur. Chez l'homme, ces alloanticorps sont le plus souvent des anticorps cytotoxiques

dirigés contre des molécules du CMH de classe I ou moins fréquemment de classe II (30% des rejets à composante humorale) (Mauiyyedi & Colvin, 2002). Enfin, des antigènes autres que le CMH (antigènes érythrocytaires du système ABO, antigènes mineurs ou spécifiques du tissu) ont également été mis en évidence, mais de façon beaucoup plus anecdotique (Sumitran, 2000).

De la même manière que pour le rejet hyperaigu, la fixation des anticorps sur les cellules endothéliales active la voie classique du complément jusqu'à la formation du complexe d'attaque membranaire. Il s'agit là d'un des mécanismes principaux de ces rejets dits « humoraux ». Ces alloanticorps facilitent également l'opsonisation des cibles pour les macrophages et les cellules NK qui, grâce à leurs récepteurs de fragments Fc d'immunoglobulines, peuvent fixer et lyser les cellules endothéliales par ADCC.

L'endothélium joue un rôle important dans cette physiopathologie. Son activation, notamment par des cytokines telles que l'IL-1 et l'IFN- γ , induit l'expression de molécules d'adhésion (E-sélectine, ICAM), du facteur tissulaire et de l'inhibiteur de l'activité du plasminogène, entraînant un état globalement plus pro-coagulant et proinflammatoire de la cellule endothéliale. De plus, l'ischémie-reperfusion induit une stimulation des plaquettes, ainsi qu'une activation du complément (comme les anticorps) par la voie classique ou alterne, renforçant encore à l'activation de ces cellules endothéliales. Les cellules NK peuvent rompre l'intégrité de cet endothélium et aussi l'activer. Enfin, les alloanticorps seuls pourraient délivrer un signal activateur via les intégrines des cellules endothéliales (Saadi *et al.*, 2004). D'autres mécanismes pathogéniques impliquent l'apoptose de la cellule endothéliale, induite par l'ischémie, des cytokines ou des cellules inflammatoires, causant ainsi la libération de cellules endothéliales de leur matrice dans la circulation (éléments inflammatoires dans le sang). Cette perte de l'intégrité vasculaire expose la matrice sous-endothéliale à la coagulation. Enfin, l'apoptose prive l'endothélium de ses fonctions normales telles que l'inhibition de la coagulation et de l'inflammation (Z. E. Holzknecht *et al.*, 2002). Même si le rejet aigu à composante humorale est différencié de celui à composante cellulaire, il semble que les alloanticorps et le complément participent à l'activation des lymphocytes T et NK, et donc au rejet à médiation cellulaire. Plusieurs données soulignent une coopération des composantes humorales et cellulaires lors de réponses immunes endommageant le transplant (Wasowska *et al.*, 2001; Pratt *et al.*, 2002).

Le rejet humoral aigu s'accompagne, le plus souvent, de lésions hémorragiques, de thromboses intra-vasculaires, d'atteintes endothéliales avec une infiltration sous endothéliale d'éléments lymphocytaires activés, de macrophages activés, de polynucléaires neutrophiles, et de lésions de nécrose avec œdème et lyse de la membrane cellulaire (McCarthy & I. S. D. Roberts, 2002). Contrairement au rejet aigu à médiation cellulaire où l'on retrouve un infiltrat interstitiel cellulaire massif, dans le rejet aigu à composante humorale, l'infiltrat cellulaire se limite le plus souvent à la périphérie des vaisseaux. Au niveau immuno-histologique, la médiation humorale de ces rejets se révèle notamment par le dépôt de facteurs de dégradation du complément au sein du greffon, tels que le C3c et surtout le C4d (devenu le marqueur histologique majeur dans les capillaires péritubulaires, en association avec la présence d'anticorps anti-donneur circulants) (Solez *et al.*, 2008). En clinique, le C5b-9 de même que les IgM et IgG sont peu recherchés car ils sont rarement positifs du fait de leur rapide élimination des surfaces cellulaires.

Même si les alloanticorps sont considérés à première vue comme néfastes, dans certains cas ils ne sont en aucun cas prédictifs d'un rejet (B. D. Tait *et al.*, 2009; Böhmig *et al.*, 2009). Cependant, ces même anticorps semblent être impliqués dans le rejet chronique.

d. Le rejet chronique

Ce type de rejet est caractérisé par une destruction lente, progressive et irréversible des structures et fonctions du greffon. Au cours de ces dernières années, elle est devenue une des causes principales de retour en dialyse. De pathogénèse toujours mal définie, le rejet chronique serait cependant médié par les alloanticorps et le complément. Russell et Ley ont montré que, en transplantation cardiaque, lorsque les souris receveuses étaient déplétées en lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, le transplant était accepté à long terme mais que cela n'empêchait pas des lésions typiques du rejet chronique (lésions des coronariennes) (P. S. Russell *et al.*, 1994). Lors de cette étude, ils ont aussi remarqué que l'intensité des lésions était corrélée à la quantité d'alloanticorps produits. En accord avec ces résultats, lorsqu'ils effectuaient ces transplantations sur des souris déficientes en lymphocytes B, celles-ci ne développaient pas de lésions artérielles typiques d'un rejet chronique alors que le transfert d'alloanticorps spécifiques du donneur les restaurait. Lorsque des anticorps bloquant l'interaction CD40-CD40L (empêchant donc l'interaction lymphocytes T /lymphocytes B) sont administrés en transplantation cardiaque chez la souris, le transplant est accepté à long terme sans aucune lésion histologique des vaisseaux et ceux-ci expriment alors fortement des

gènes protecteurs tels que l'hème oxygénase-1 (HO-1 ; enzyme impliquée dans le catabolisme de l'hème), Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large, molécule anti-apoptotique) et A20 (inhibe l'activité de NF- κ B). Lorsqu'ils sont induits dans des cellules endothéliales, ces gènes permettent, lors de cultures *in vitro* avec des cytokines de type Th2 en présence d'alloanticorps, d'empêcher l'activation des cellules endothéliales (*i.e.* baisse d'expression de l'E-sélectine). *In vivo*, lorsque des anticorps déplétant les lymphocytes T CD4⁺ sont administrés avec des métalloporphyrines, un agent inducteur de HO-1, les lésions dues au rejet chronique sont presque entièrement abolies, et l'apoptose dans le transplant, décrite comme un mécanisme majeur du rejet chronique médié par les anticorps (Plissonnier *et al.*, 2000), (*in vitro* et *in vivo* les alloanticorps induisent, entre autres, l'apoptose des cellules endothéliales du donneur) est diminuée (Hancock *et al.*, 1998). Des études suggèrent que, en transplantation rénale, les rejets chroniques sont précédés d'une forte production d'alloanticorps dirigés contre les molécules HLA, et que l'apparition d'anticorps dirigés contre les CMH de classe II sont un facteur de risque de développer un rejet chronique, tout comme la survenue antérieure d'épisodes de rejets aigus (Pelletier *et al.*, 2002). Dans la plupart des cas ce type de rejet est associé à un profil Th2 (Pirenne *et al.*, 2005), mais peut aussi associer Th1 et Th2 (Obata *et al.*, 2005).

Histologiquement, le rejet chronique est également associé à divers signes de souffrance chronique : glomérulopathie d'allogreffe (dédoublage de la membrane basale du glomérule) et/ou épaississement fibreux de l'intima des artères et/ou des capillaires péri-tubulaires multicouches et/ou fibrose interstitielle et atrophie tubulaire.

La diminution de Treg en périphérie semble être corrélée au développement de ces lésions chroniques, alors qu'elles ne sont pas augmentées chez les patients opérationnellement tolérants par rapport à des individus sains (Louis *et al.*, 2006). Enfin, de nombreuses études mettent en évidence le rôle du blocage de la costimulation (notamment de la voie CD28/B7) et l'absence de développement de rejet chronique chez le rongeur (Haspot *et al.*, 2005; Guillonnet *et al.*, 2005).

D. La tolérance

La tolérance immunologique se caractérise par l'absence de réactivité spécifique vis à vis d'antigènes particuliers. Chez les individus normaux, ces antigènes sont ceux du « soi », et la rupture de cette tolérance aboutit au développement de l'auto-immunité. Dans le cas de l'allotransplantation, le développement d'une tolérance permet l'acceptation sur le long cours

du greffon malgré l'interruption du traitement immunosuppresseur, tout en conservant une réponse normale vis-à-vis d'autres antigènes. L'obtention d'un état de tolérance devrait permettre, chez l'homme, de supprimer les traitements immunosuppresseurs, dont l'usage à long terme a de nombreux effets secondaires, et de prévenir le rejet chronique. Un état de tolérance a été décrit chez de rares patients ayant arrêté leur traitement immunosuppresseur pour non-compliance, ou à cause de l'apparition d'un cancer. L'induction de la tolérance a été initialement décrite dans les années 1950 (Billingham *et al.*, 1953). Aujourd'hui, deux types de tolérance sont définis : la tolérance centrale et la tolérance périphérique qui regroupe, elle-même, plusieurs mécanismes. Cette section se concentrera sur les mécanismes de tolérance des lymphocytes T, acteurs majeurs du rejet. Ce choix se justifie par le fait qu'une tolérance des lymphocytes T empêche les lymphocytes B d'être activés : le signal « help » (fourni par les lymphocytes T CD4⁺ helper) étant absent (Sykes, 2007).

1. La tolérance centrale

Le mécanisme majeur par lequel est orchestrée la tolérance des lymphocytes T, est la délétion des cellules T autoréactives dans le thymus, lieu d'éducation des lymphocytes T immatures (J. F. Miller, 1961). Les lymphocytes T immatures migrent de la moelle osseuse vers le thymus où ils rencontrent des peptides dérivés des protéines du « soi » liés à des molécules du CMH, apprêtés par les cellules épithéliales thymiques (Delves & Roitt, 2000). Les thymocytes (lymphocytes T immatures du thymus) sont alors doubles-positifs (CD4⁺ et CD8⁺) et vont subir une sélection positive et négative. Lors de la sélection positive, qui se déroule dans le cortex, ils survivent aux signaux d'apoptose uniquement dans le cas où leur TCR a une interaction, mais de faible avidité, pour les complexes CMH/peptides (Hogquist & Bevan, 1996). En fonction de la classe de CMH reconnu par le TCR, ils vont perdre le corécepteur CD8 ou CD4. Lors de la sélection négative, qui se déroule dans la médulla, les cellules ayant une interaction de forte avidité avec les complexes CMH/peptides sont éliminées, limitant ainsi l'existence de lymphocytes T autoréactifs responsables de maladies auto-immunes (Nossal, 1994). Les lymphocytes T restant (environ 3%) mûrissent dans le thymus et migrent en périphérie (Shortman *et al.*, 1990). Afin de s'assurer de l'absence de lymphocytes T autoréactifs, le thymus favorise la sélection positive de cellules T régulatrices naturelles CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Sakaguchi, 2004; Watanabe *et al.*, 2005) par le biais des cellules dendritiques résidentes. Les cellules épithéliales médullaires permettent aussi le développement des cellules T régulatrices (Treg) en favorisant l'expression de FoxP3 dans les thymocytes doubles positifs (Aschenbrenner *et al.*, 2007; Sakaguchi *et al.*, 2010).

En transplantation, une tolérance centrale peut être obtenue à la suite du développement d'un chimérisme hématopoïétique, correspondant à la colonisation du thymus par des cellules hématopoïétiques du donneur qui vont participer à la sélection du répertoire lymphocytaire (Goldrath & Bevan, 1999). Les thymocytes capables de reconnaître les autoantigènes, mais également les antigènes du donneur, comme éléments du « soi » meurent ainsi par apoptose, suite à la sélection négative dans le thymus. De nombreuses études montrent ainsi que l'établissement d'un chimérisme hématopoïétique en allotransplantation conduit à un état de tolérance immunologique, non seulement chez le rongeur, mais aussi chez le porc, le primate et chez l'homme (Sykes & Sachs, 1988; T. Kawai *et al.*, 1995; Bühler *et al.*, 2002; T. Kawai *et al.*, 2008). Cependant, les applications cliniques restent limitées et peu développées, notamment en raison de la toxicité des traitements d'induction (greffe de moelle combinée, irradiation totale ou thymique, ...).

2. La tolérance périphérique

Empêcher toute réponse auto-immune par induction de tolérance centrale implique que tous les autoantigènes soient présentés dans le thymus. Plusieurs étant absents ou en quantité insuffisante, l'organisme a développé un autre type de tolérance pour pallier à la présence de lymphocytes T autoréactifs ayant échappé à la tolérance centrale : la tolérance périphérique. Plusieurs mécanismes de tolérance périphérique ont ainsi été décrits, agissant de manière isolée ou en synergie, afin d'aboutir à une tolérance des lymphocytes T vis-à-vis d'antigènes spécifiques (cf. **Figure 4**).

a. L'ignorance

L'importance de l'ignorance immunologique a été démontrée en utilisant des souris exprimant un TCR transgénique reconnaissant un peptide viral particulier. En les croisant avec des souris transgéniques exprimant le peptide à la surface des îlots pancréatiques, les auteurs ont remarqué qu'elles ne développaient pas de diabète, et ce malgré une forte réactivité des cellules T vis-à-vis du peptide *in vitro* (P. S. Ohashi *et al.*, 1991). Ces souris n'étaient donc pas tolérantes, mais elles « ignoraient » les cellules cibles *in vivo*. La faible quantité d'antigènes, la séparation physique entre un antigène et les lymphocytes T (*e.g.* barrière hématoencéphalique) et la présentation d'antigènes sur des CMH en absence de signaux de costimulation, sont des facteurs causant l'ignorance immunologique (Sykes, 2007).

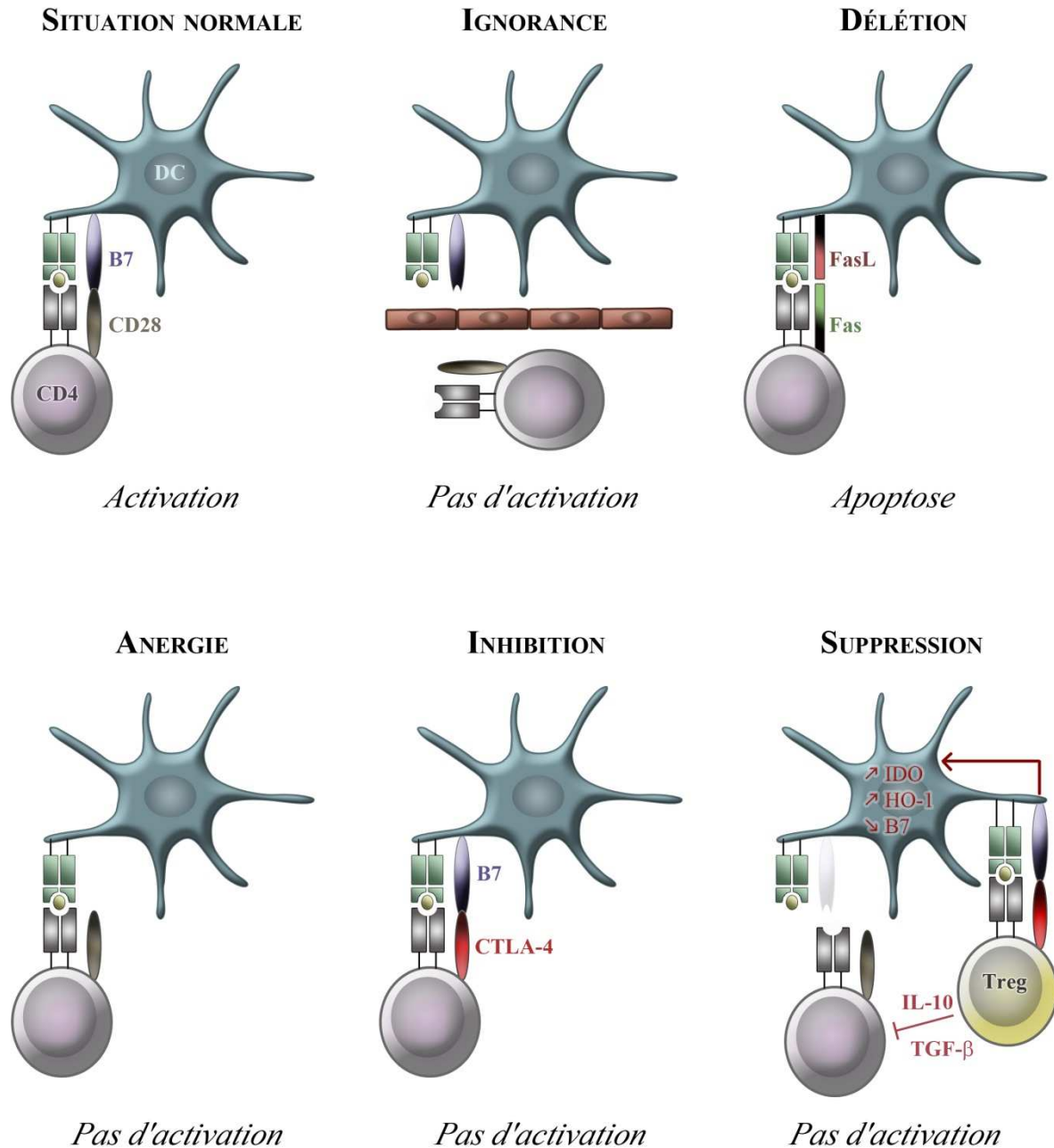


Figure 4 : Schématisation des mécanismes de tolérance périphérique.

Hormis la déviation immune Th1-Th2 (cf. **Fig.1**).

b. La délétion

La délétion est un mécanisme de la tolérance faisant intervenir une mort par apoptose (ACD ; Apoptosis Cell Death). En absence de costimulation, la présentation d'antigène n'empêche pas seulement l'activation des lymphocytes T, mais peut aussi induire leur délétion par ACD (Ferber *et al.*, 1994). Le manque de facteurs de croissance, pour lesquels il y a compétition entre les lymphocytes T activés, peut également entraîner une délétion de ces cellules (Förster *et al.*, 1995). Enfin, l'apoptose des cellules T peut être occasionnée par le

signal Fas/FasL, dénommé AICD (Activation-Induced Cell Death) lorsque le lymphocyte rencontre de fortes quantités d'antigène et/ou sont fortement activés (Critchfield *et al.*, 1994), par un mécanisme Fas/FasL dont l'importance a été démontrée de plusieurs manières. Ainsi des patients déficients en Fas développent-ils des maladies lymphoprolifératives (Worth *et al.*, 2006), alors que le HIV (Human Immunodeficiency Virus) utilise cette voie en augmentant l'expression de FasL sur les macrophages infectés, induisant l'apoptose des lymphocytes T ayant établi un contact avec ces cellules (Badley *et al.*, 1997).

c. L'anergie

L'état anergique des lymphocytes T se caractérise par l'absence de production d'IL-2 lorsqu'ils rencontrent l'antigène pour lequel leur TCR est spécifique. L'anergie des lymphocytes T se développe lorsque celui-ci rencontre des complexes CMH/peptides sans recevoir de manière adéquate des signaux accessoires ou de costimulation par les CPA (M. K. Jenkins & Schwartz, 1987; J. D. Powell, 2006), ou lorsqu'elles reçoivent des signaux de costimulation inhibiteurs via CTLA-4 (Walunas & Bluestone, 1998) ou PD-1 (Programmed Death-1) (Chikuma *et al.*, 2009). Les cellules T peuvent aussi être rendues anergiques lorsqu'elles rencontrent des peptides pour lesquels elles ont une faible affinité (S. M. Alam *et al.*, 1996). Certaines CPA comme les macrophages (Hoves *et al.*, 2006) et les cellules dendritiques tolérogènes (Rutella *et al.*, 2006), immatures ou maturées sous des conditions spécifiques, ont la capacité de rendre les lymphocytes T anergiques par la sécrétion de cytokines suppressives et par une costimulation inadéquate. L'anergie peut être « levée » par la présence d'IL-2 (Schwartz, 1992) ou sous des conditions proinflammatoires (*e.g.* infections) (Röcken *et al.*, 1992; Knoechel *et al.*, 2006). En présence continue d'antigène, les cellules T anergiques peuvent subir une délétion (J. G. Chai *et al.*, 1998). Ainsi lorsque des souris reçoivent un greffe de moelle osseuse et sont traitée par blocage de la costimulation, les cellules T CD4⁺ réactives vis-à-vis du donneur sont rendues anergiques puis délétées au bout de quelques semaines (Kurtz *et al.*, 2004). Les lymphocytes T anergiques peuvent aussi limiter l'activité des autres cellules T (Vendetti *et al.*, 2000), et même les différencier en Treg (Buer *et al.*, 1998), probablement en conditionnant les CPA (diminution de l'expression des molécules de CMH et de costimulation) et/ou en produisant de l'IL-10. Il est à noter que le transfert de cellules anergiques prolonge la survie d'allogreffes de peau (J. G. Chai *et al.*, 1998). Enfin, les lymphocytes T régulateurs peuvent conduire à l'anergie des lymphocytes T (Vanasek *et al.*, 2006).

d. La déviation immune Th1/Th2

Comme décrit précédemment (section **I.B.4**), lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺, ceux-ci subissent, en fonction du microenvironnement et notamment des CPA, une polarisation vers un sous-type de lymphocyte T helper ayant des actions différentes. Ainsi les lymphocytes Th1 sont-ils induits par l'IL-12, l'IFN- γ , l'IFN- α , et produisent de l'IFN- γ , de l'IL-2 et de la lymphotoxin- α , des cytokines stimulant une réponse cellulaire contre les pathogènes intracellulaires en activant les cellules phagocytaires et la production d'IgG2a, alors que les Th2 sont induits par l'IL-4, l'IL-33 et produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL-13, des cytokines favorisant une réponse anticorps contre les parasites extracellulaires en induisant la production d'IgG1 et d'IgE, ainsi que l'activation des éosinophiles (Mosmann & R. L. Coffman, 1989; Romagnani, 1991; Rizzo *et al.*, 1995). Lorsque le lymphocyte Th0 se différencie en un sous-type, celui-ci empêche la polarisation d'autres Th0 en un autre sous-type, tout en favorisant la polarisation vers le même sous-type ; on parle alors de déviation immune Th1 ou Th2. Plusieurs études montrent que des réponses Th1 dominantes (déviation Th1) sont impliquées dans la pathogénèse de maladies humaines caractérisées par la formation de granulomes (agrégats de macrophages) comme dans la sarcoïdose, la maladie de Crohn, et l'athérosclérose ; tandis qu'une déviation immune Th2 est impliquée dans les phénomènes allergiques. Même si ce n'est pas toujours le cas, les cytokines produites par les lymphocytes de types Th2 sont liées à une baisse de l'auto-immunité dans l'EAE et le diabète (D. A. Young *et al.*, 2000; L. M. Bradley *et al.*, 1999). En transplantation, un état de tolérance, et l'utilisation des divers traitements immunosuppresseurs, sont généralement associés à une déviation Th2 (Franchimont, 2004; Libetta *et al.*, 2007; J. Karczewski *et al.*, 2008; X.-F. Jiang *et al.*, 2010), en modifiant l'activité des cellules dendritiques et notamment la sécrétion d'IL-12, tandis que des traitements inducteurs de déviation Th2 (de manière indirecte par inhibition de la différenciation Th1, ou par induction directe de Th2) retardent l'apparition du rejet aigu (Amarnath *et al.*, 2011; A. Xie *et al.*, 2011; H. Yin *et al.*, 2010) ou facilitent l'induction de tolérance (D. Zhang *et al.*, 2010).

e. L'inhibition

Un autre mécanisme de la tolérance périphérique est l'inhibition de l'activation du lymphocyte T de son propre chef. Par exemple, en s'engageant sur les molécules CD80 et CD86, et ayant une meilleure affinité que CD28, la molécule CTLA-4, présente sur les lymphocytes T activés, inhibe leur activation (Chambers & J. P. Allison, 1999). D'autres molécules présentes à la surface des lymphocytes T induisent, elles aussi, l'inhibition de leur

activation telles que PD-L1 (Programmed Death-1-Ligand 1 ; une molécule de costimulation inhibitrice) (Freeman *et al.*, 2000), LAG-3 (Lymphocyte-Activation Gene-3) (Huard *et al.*, 1994), et plus récemment VISTA (V-domain Ig Suppressor of T cell Activation) (L. Wang *et al.*, 2011).

f. La suppression

La tolérance périphérique peut être induite par des cellules suppressives inhibant l'activation, ou les fonctions effectrices, des cellules avoisinantes. Parmi ces cellules suppressives, les cellules T régulatrices (Treg) naturelles et induites, toutes deux CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, constituent les populations les plus étudiées et peuvent moduler l'immunogénicité des cellules dendritiques. C'est par exemple encore le cas des Treg qui, via l'interaction de leur CTLA-4 (exprimé de façon constitutive à leur surface) avec son récepteur B7, peuvent rendre tolérogènes les DC et induire l'expression de IDO (Indoléamine 2,3-DiOxygénase) (Fallarino *et al.*, 1998). L'expression d'IDO a pour conséquence directe de priver le microenvironnement en tryptophane, un acide aminé nécessaire à l'activation T (Mellor & Munn, 2004). Ces Treg peuvent en outre induire une sous-expression de B7 sur les CPA, encore une fois par CTLA-4, les rendant ainsi immatures et tolérogéniques, ou non-immunogéniques (Wing *et al.*, 2008). Enfin, bien d'autres mécanismes impliquant HO-1, LAG-3, PDL-1 ou encore HLA-G ont été largement décrits dans la tolérance allogénique (Q. Tang & Bluestone, 2008). Nombres de ces mécanismes ont par ailleurs été sélectionnés puis conservés depuis plusieurs millions d'années par la nature dans la tolérance fœto-maternelle (greffe semi-allogénique) chez les mammifères. Y figurent notamment l'expression placentaire de HLA-G inhibant l'action cytolytique des cellules NK par les récepteurs KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) (P. Moreau *et al.*, 1998), d'IDO inhibant les lymphocytes T, et surtout un rôle majeur des Treg maternelles mais également celles du fœtus. En effet, la déplétion des Treg chez des souris gestantes induit le rejet de la plupart des fœtus (Aluvihare *et al.*, 2004; Darrasse-Jèze *et al.*, 2006), alors que, plus récemment chez l'homme, des cellules maternelles traversant le placenta pour résider dans les ganglions du système immunitaire fœtale ont été décrites. Elles induisent la génération de Treg chez le fœtus qui à leur tour inhibent les réponses fœtales dirigées contre la mère ; phénomène qui persiste au moins jusqu'à l'adolescence (Mold *et al.*, 2008). D'autres cellules suppressives, telles que les MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells) utilisent par exemple iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), une enzyme dégradant l'arginine en protoxyde d'azote (NO, un gasotransmetteur), afin de supprimer la réponse allogénique T dans un modèle de

tolérance en transplantation rénale après blocage de la costimulation CD28/B7 (Dugast *et al.*, 2008).

3. La tolérance clinique en transplantation

En transplantation, la tolérance représente un état dans lequel le système immunitaire du receveur ne réagit pas contre les tissu du donneur, tout en conservant la capacité de répondre contre d'autres antigènes (*i.e.* pathogènes, tissus d'un donneur tiers). Actuellement, l'arsenal de drogues immunosuppressives utilisées cliniquement chez l'homme pour éviter le rejet ne permettent pas de conserver une réponse immune contre des antigènes tierce partie, et sont associés à une augmentation significative des risques d'infections, de tumeurs, et de toxicité, tandis que l'apparition du rejet chronique reste toujours aussi élevée depuis 25ans (Sykes, 2007).

II. Les cellules dendritiques (DC)

A. Bref historique

Découvertes dans les années 1860 dans l'épiderme, les cellules dendritiques étaient alors décrites pour avoir une origine neurale et étaient appelées « cellules de Langerhans » par celui qui les avait découvertes, Paul Langerhans (Langerhans, 1868). Ce n'est que dans les années 1970 qu'on leur trouva une fonction dans le système immunitaire car elles étaient nécessaires à l'obtention d'une réponse humorale, et qu'elles furent appelées « cellules dendritiques » du fait de leurs longs prolongements cytoplasmiques (R. M. Steinman & Cohn, 1973). En plus de leur aspect morphologique propre, ces cellules étaient caractérisées par une forte mobilité, une propriété d'adhérence au verre et au plastique, une faible densité, une faible activité endocytaire et l'absence de récepteur aux fragments Fc des immunoglobulines (R. M. Steinman, 1991). Dans le sang ou les organes lymphoïdes secondaires, ces cellules ne représentent que 1% de la population leucocytaire, c'est pourquoi l'étude ces cellules a toujours été difficile. De nos jours, les techniques de différenciation *in vitro* à partir de progéniteurs médullaires et de cytofluorométrie en flux ont permis de les étudier plus facilement et précisément. Actuellement, la population de DC la mieux connue reste la cellule de Langerhans.

Il est établi qu'il existe plusieurs populations de DC, aux fonctions différentes, et que ceci est lié à leur état de différenciation et d'activation, et donc à leur localisation dans l'organisme (Banchereau & R. M. Steinman, 1998). Les DC sont les cellules qui déclenchent une réponse immune face aux diverses agressions environnementales, physiques, chimiques et biologiques.

B. Généralités

Les DC sont une population rare de leucocytes mais largement distribués au sein de l'organisme. Ces cellules sont spécialisées dans la capture, le transport, l'apprêtement et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T. Leur rôle est essentiel dans l'établissement et la modulation de la réponse T, mais aussi de la réponse B et NK. Les DC se développent à partir de progéniteurs de la moelle osseuse qui donneront des précurseurs de DC circulant dans le sang et qui migreront vers divers tissus pour se différencier en DC immatures. Ces dernières agissent alors comme des sentinelles spécialisées dans la capture des antigènes environnementaux (*e.g.* bactéries, virus, toxines, allergènes, autoantigènes), mais également

dans la détection de signaux de dangers potentiels (*e.g.* infection, inflammation, nécrose). Lorsque les DC détectent ces signaux délivrés directement par l'environnement, elles s'activent, mûrissent, et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour y présenter les peptides antigéniques sur les molécules du CMH de classe I et II. La maturation induit une augmentation de l'expression des molécules du CMH et de costimulation, tandis que la migration des DC via les vaisseaux lymphatiques vers les zones T des organes lymphoïdes drainants s'effectue sous l'influence de gradients de chimiokines. Une fois dans les zones T, les DC transmettent les informations du type de pathogène rencontré aux cellules T naïves, conduisant à l'élaboration d'une réponse immunitaire spécifique. Seules les DC ont cette capacité de capturer l'antigène et d'activer ensuite des cellules T naïves. Il s'agit d'une caractéristique majeure des DC (Banchereau & R. M. Steinman, 1998), leur conférant le nom de CPA professionnelles (Matzinger, 1994). Les DC peuvent aussi réguler les réponses en modulant l'amplitude et le type de la réponse.

Il existe 3 types de CPA : les macrophages, les lymphocytes B et les DC. Alors que les fonctions primaires des macrophages et des lymphocytes B sont respectivement d'éliminer le pathogènes et de produire des immunoglobulines, la présentation de l'antigène aux cellules T est la seule fonction connue des DC matures. Ainsi les DC existent-elles sous deux formes, (matures et immatures) dont les fonctions respectives sont séparées dans le temps et dans l'espace. Les DC immatures sont présentes dans les tissus où les elles capturent l'antigène. S'ensuit la maturation et la migration des DC vers les organes lymphoïdes après détection d'un danger. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les DC matures ont pour fonction principale de présenter les antigènes aux lymphocytes T. Deux mécanismes généraux ont été proposés par lesquels les DC peuvent établir une tolérance périphérique. Le premier est qu'une population de DC dite régulatrice est impliquée (F. P. Huang *et al.*, 2000). Le second est que toutes les DC peuvent induire, soit une réponse tolérogène, soit une réponse immunitaire. Cette distinction dépend de l'état de maturation ou d'activation des DC. Le modèle classique fait une distinction nette entre les DC immatures et matures qui induisent respectivement la tolérance et l'immunité (R. M. Steinman *et al.*, 2000; M. V. Dhodapkar *et al.*, 2001). Les DC immatures pourraient induire la tolérance en tuant ou en rendant anergiques les cellules T, ou en générant des lymphocytes T régulateurs (Roncarolo *et al.*, 2001). Cependant il a aussi été proposé que la tolérance soit induite par des DC dites semi matures pas complètement activées (M. L. Albert *et al.*, 2001; R. M. Steinman, Hawiger & M. C. Nussenzweig, 2003; R. M. Steinman, Hawiger, K. Liu, *et al.*, 2003). Ces différents états de

maturation des DC leurs confèrent ainsi une grande plasticité, et met en exergue le rôle clé de la maturation dans l'initiation de la réponse immunitaire.

C. Localisations

Les DC sont des cellules rares qui colonisent les compartiments tissulaires de l'organisme et dont la fonction de CPA permet une capture et une présentation antigénique optimale pour une réponse immune efficace (R. M. Steinman, 1991).

1. Les cellules dendritiques de la peau et des muqueuses

Représentant 2 à 4% des cellules de l'épiderme et de morphologie très étirées, les cellules dendritiques de l'épiderme, ou cellule de Langerhans, forment un réseau de cellules dans un lieu privilégié pour la surveillance immunologique (N. Romani *et al.*, 2001). Ces cellules se caractérisent par l'expression de langerine (mais qui serait aussi exprimée par d'autres DC), la présence de granules de Birbeck (Valladeau *et al.*, 2000) et l'absence d'expression de l'intégrine $\alpha E \beta 27$ (CD103). Les granules de Birbeck sont des organites intracellulaires qui auraient probablement un rôle en tant que compartiment d'apprêtement antigénique et disparaissent lors de la maturation de ces cellules. Le derme, quant à lui, contient des DC qui s'apparentent aux DC interstitielles, et sont divisés en deux populations : celles exprimant la langerine ainsi que CD103, et celles qui ne les expriment pas (Merad *et al.*, 2008). Les muqueuses des tractus digestif, respiratoire, et génital sont également des lieux stratégiques pour la surveillance et la capture antigénique. On y retrouve un réseau de DC immatures proches des cellules de Langerhans. Il reste un réseau au sein de l'intima des vaisseaux qui a récemment été mis en évidence mais dont la fonction reste inconnue, mais seraient peut-être impliquées dans l'athérosclérose (Cybulsky & Jongstra-Bilen, 2010).

2. Les cellules dendritiques interstitielles

Tous les tissus non lymphoïdes contiennent moins de 1% de cellules dendritiques interstitielles, hormis les tissus dits de privilège immunologiques tels que la cornée centrale et le parenchyme cérébral pour lesquels elles sont absentes. Ces cellules, qui colonisent les tissus par voie sanguine, sont de morphologie irrégulière et expriment fortement les antigènes de classe II du CMH (Steiniger *et al.*, 1984).

3. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes

Retrouvées essentiellement dans les zones T, les DC représentent 0,5 à 2% des cellules des organes lymphoïdes (R. M. Steinman *et al.*, 1997). Dans le thymus, elles se localisent dans la zone médullaire et à la jonction cortico-médullaire, où elles jouent un rôle dans la sélection négative des thymocytes (Brocker *et al.*, 1997). Elles sont présentes dans la zone marginale de la rate, ainsi que dans le cortex interfolliculaire des ganglions lymphatiques (K. Inaba *et al.*, 1984), mais leur phénotype diffère quelque peu de celui des DC des zones T. Enfin, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (amygdales, plaques de Peyer) contiennent également des DC.

4. Les cellules dendritiques de la lymphe et du sang

La lymphe, circulant des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques drainant, contient des cellules qui ont un aspect voilé en microscopie et ayant les caractéristiques des DC. Ces cellules transitent de façon constitutive dans la lymphe afférente et se localisent dans les zones T des ganglions lymphatiques où elles vont probablement y mourir après quelques jours, car on ne retrouve pas de DC dans la lymphe efférente qui contient essentiellement des lymphocytes T naïfs.

Dans le sang, les DC représentent environ 0,5 à 2% de l'ensemble des cellules mononuclées et sont principalement immatures, mais on retrouve surtout des précurseurs directs de DC tels que les monocytes, représentant 2 à 12% des leucocytes.

D. Les populations de cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont hétérogènes, ainsi l'étude des DC a-t-elle révélée que plusieurs populations de DC, phénotypiquement et fonctionnellement différentes, existent et permettent une certaine plasticité de ces cellules. Leur localisation, stade de maturation et ontogénie a permis de caractériser différentes populations de DC. Il existe deux classes (Shortman & Y.-J. Liu, 2002) de DC : les DC myéloïdes $CD11c^+$ dites « conventionnelles » (mDC), regroupant les mDC1 ($CD1c^+ CD141^-$) et les mDC2 ($CD1c^+ CD141^+$) (C. C. Chang *et al.*, 2000; Piccioli *et al.*, 2007), et les DC plasmacytoïdes $C11c^-$ (pDC) qui ne sont, au repos, pas réellement considérées comme des « DC », étant donné leur forme circulaire (non dendritique) et l'absence de propriété CPA (Shortman & Y.-J. Liu, 2002; Reizis *et al.*, 2011).

Nous parlerons ici des DC chez l'homme et le Rat, deux espèces faisant partie intégrante des travaux effectués lors de ma thèse.

1. Chez l'homme

Du fait de la difficulté d'obtenir des échantillons en quantité suffisante pour y extraire ces cellules, très peu d'études sur les DC humaines ont été réalisées.

a. Les cellules de Langerhans

Ces cellules, résidant dans l'épiderme et les muqueuses épithéliales à l'état immature, expriment le marqueur leucocytaire CD45 et les marqueurs myéloïdes CD13 et CD33. Elles expriment aussi le CD1a et les molécules d'adhésion CD11b, CD11c, CD18, CD44, CD54, CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen), et l'E-cadhérine. Retrouvée sur les kératinocytes, l'E-cadhérine permet la liaison entre ces deux types cellulaires (A. Tang *et al.*, 1993). Les marqueurs spécifiques des cellules Langerhans sont le CD207 (langerine), le CD1a et les granules de Birbeck (C.-C. Chu *et al.*, 2011). Ces cellules peuvent être générées *in vitro* par différenciation de cellules souches CD34⁺ en présence de GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor) et de TNF- α , technique induisant aussi une différenciation en DC interstitielles (Caux *et al.*, 1996). Des études ont montré que les granules sont impliquées dans l'endocytose grâce à des récepteurs, et dans la présentation de l'antigène (Mc Dermott *et al.*, 2002). La langerine serait impliquée dans la biogenèse des granules (Verdijk *et al.*, 2005), et dans le trafic des antigènes extracellulaires sur le CMH de classe I (Valladeau *et al.*, 1999). Ainsi langerine et granules de Birbeck semblent-ils liés à la présentation des complexes CMH/peptides. Une fois matures, ces cellules migrent vers les ganglions lymphatiques via les vaisseaux lymphatiques.

b. Les cellules dendritiques interstitielles

Ces cellules de type myéloïdes sont situées au niveau des capillaires ainsi que dans la partie haute du derme à l'état immature. Elles se divisent en deux différentes populations en fonction du niveau d'expression de CD1a, et de la présence de CD14 (Nestle *et al.*, 1993). Ces cellules expriment la lectine DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin, ou CD209) (Turville *et al.*, 2002), même si, dans des conditions particulières, les macrophages peuvent aussi l'exprimer (Soilleux *et al.*, 2002), mais pas les granules de Birbeck. Ces DC ont été assez peu étudiées, cependant elles pourraient correspondre *in vivo* aux DC dérivées de monocytes et peuvent être générées *in vitro* à partir de monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4, ou à partir de cellules CD34⁺ en présence de GM-CSF et de TNF- α (Caux *et al.*, 1997). Il est suggéré que les DC

interstitielles, qui ont un phénotype proche des DC des centres germinatifs, migrent dans les follicules lymphoïdes (Pulendran *et al.*, 2001).

c. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes

Dans le thymus, deux populations de DC CD11c⁺ et CD4⁺ ont été décrites selon l'expression du HLA-DR et du CD11b. Ainsi, il existe une population minoritaire au phénotype CD11b⁺ et HLA-DR⁺ et une population majoritaire CD11b⁻ et HLA-DR⁺⁺ (Bendriss-Vermare *et al.*, 2001; Vandenabeele *et al.*, 2001). Les DC CD11b⁺ expriment le CD14 et semblent immatures, étant donné qu'elles n'expriment pas le CD83, tandis que les DC CD11b⁺ n'expriment pas le CD14 mais semblent matures, car elles expriment le CD83, le CD80 et le CD86. Ces DC thymiques semblent s'être différenciées *in situ* plutôt que de provenir directement du sang à l'état différencié. Enfin, une troisième population existe, exprimant le CD4, HLA-DR mais pas CD11c : les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

Dans les organes lymphoïdes secondaires plusieurs types de DC sont présents. Ainsi, les pDC sont-elles majoritaires dans les amygdales, tandis qu'on y retrouve quatre autres populations de DC représentant des DC interdigitées (Grouard *et al.*, 1997; Summers *et al.*, 2001). Dans les tissus lymphoïdes associés aux intestins, tels que les ganglions lymphatiques mésentériques on retrouve principalement des DC au phénotype mature, tandis que dans les ganglions axillaires et sous cutanés on retrouvera des DC au phénotype immature (K. Takahashi *et al.*, 1998; Richters *et al.*, 1995; K. Takahashi *et al.*, 2001). Pour ce qui est des DC spléniques, ces cellules semblent immatures puisqu'elles n'expriment ni le CD80, ni le CD83, mais expriment HLA-DR, CD4, et CD40 (McIlroy *et al.*, 2001) ; elles semblent correspondre à la population de DC myéloïdes du sang.

d. Les cellules dendritiques du sang et leurs précurseurs

L'accès et la disponibilité du sang humain a permis une étude plus approfondie des DC du sang, en comparaison aux organes lymphoïdes (MacDonald *et al.*, 2002). Deux précurseurs immédiats des DC ont, ainsi, été isolés : les pré-DC1 et les pré-DC2 (Rissoan *et al.*, 1999).

Les pré-DC1 correspondent aux monocytes, le précurseur le plus utilisé *in vitro* pour obtenir des DC myéloïdes, que l'on appelle alors MoDC (Monocyte-derived Dendritic Cell). Expriment le CD14, ils sont pourvus d'une grande plasticité puisque lorsque cultivés en présence de M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) (Caux *et al.*, 1997), ils se

différencient en macrophage, tandis qu'en présence de GM-CSF et d'IL-4, on obtient une DC immature appelée DC1 (N. Romani *et al.*, 1996; Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Alors que l'IL-6 favoriserait une différenciation en macrophage, le TNF- α orienterait une différenciation en DC (Chomarat *et al.*, 2003). Les monocytes expriment les marqueurs myéloïdes ainsi que de faibles quantités de CMH II et de molécules de costimulation (Pulendran *et al.*, 2001). Ils possèdent une forte capacité de capture antigénique, et expriment le MMR (Macrophage Mannose Receptors, récepteurs d'endocytose) ainsi que différents TLR, tels que le TLR-1, -2, -4, -5 et -8, leur permettant de répondre à de nombreux pathogènes. En utilisant un modèle de traversée de l'endothélium *in vitro*, il a été suggéré une explication plausible de la différenciation du monocyte en DC *in vivo* (Randolph *et al.*, 1998). Les monocytes migreraient à travers les cellules endothéliales, se placeraient dans la matrice de collagène et, en faisant le trajet inverse, se différencieraient alors en DC. Il a récemment été démontré que les monocytes se différenciaient *in situ*, dans les ganglions lymphatiques, après infection (Cheong *et al.*, 2010), mais aussi que les T helper pouvaient induire leur différenciation *in vivo* (Alonso *et al.*, 2011). Deux populations de DC CD11c⁺ ressemblant aux monocytes et correspondant aux DC d'origine myéloïde ont été découvertes en même temps que les pDC CD11c⁻ (O'Doherty *et al.*, 1994), (Grouard *et al.*, 1997). Ainsi trouve-t-on dans le sang trois populations de DC : les pDC qui sont CD11c⁻, BDCA-2⁺ (Blood Dendritic Cell Antigen-2) et BDCA-4⁺, les mDC1 qui sont CD11c⁺ et BDCA-1⁺, et les mDC2 qui sont BDCA-3⁺ (D. N. Hart, 1997; S. P. Robinson *et al.*, 1999; Dzionek *et al.*, 2000; Lindstedt *et al.*, 2005).

Les pDC ont aussi été appelées cellules T plasmacytoïdes (du fait de l'expression de CD4 et du pré-TCR α), monocytes plasmacytoïdes, et pré-DC2 (Grouard *et al.*, 1997). Elles expriment fortement le récepteur de l'IL-3, les TLR-7 et -9, et sont connues pour être la source majoritaire d'IFN de type 1 dans l'organisme (Reizis *et al.*, 2011). La culture de ces cellules avec de l'IL-3 et du CD40L induit leur maturation et induit la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Th2, c'est pourquoi ces cellules ont été appelées pré-DC2, et DC2 à l'état mature (Rissoan *et al.*, 1999). Cependant, étant donnée la plasticité de ces cellules (elles peuvent se différencier en DC conventionnelles) en fonction des stimuli perçus, actuellement le terme DC2 dénote uniquement une différence cellulaire et non une différence fonctionnelle liée à la polarisation T induite.

e. Les cellules dendritiques générées *in vitro*

La base des connaissances des DC humaines s'est faite essentiellement à partir de DC générées à partir de la moelle. En ce sens, cela permet d'éclaircir l'ontogénèse des DC, d'étudier le rôle de différents facteurs et cytokines, mais aussi de développer des approches thérapeutiques. Trois populations différentes de précurseurs sont utilisées pour générer des DC humaines en culture (cf. **Figure 5**)

BMDC (Bone Marrow-derived Dendritic Cells)

Le précurseur le plus précoce utilisé est la fraction de cellules CD34⁺ isolée à partir de la moelle osseuse ou issues du sang de cordon ombilical. En milieu semi-solide, cette fraction est capable de former des colonies de DC (J. W. Young *et al.*, 1995). Par la présence de GM-CSF et de TNF- α , deux précurseurs immédiats et voies de différenciation de DC sont possibles (Caux *et al.*, 1996). La première est dépendante de TGF- β et conduit à la formation de DC produisant des granules de Birbeck et l'expression de langerine, ressemblant donc à des cellules de Langerhans (Strobl *et al.*, 1996). La deuxième conduit à la formation de précurseurs exprimant le CD14 ressemblant aux monocytes et génère des DC ressemblant aux DC interstitielles.

MoDC (Monocyte-derived Dendritic Cells)

Les monocytes du sang restent les précurseurs les plus couramment utilisés pour la génération de DC humaines *in vitro*, par l'utilisation d'IL-4 et de GM-CSF, produisant des DC1 (Sallusto & Lanzavecchia, 1994). On appelle alors ces DC : MoDC. Comme dit précédemment, en utilisant un modèle de traversée de l'endothélium *in vitro*, il a été suggéré une explication plausible de la différenciation du monocyte en DC *in vivo* (Randolph *et al.*, 1998). Les monocytes migreraient à travers les cellules endothéliales, se placeraient dans la matrice de collagène et, en faisant le trajet inverse, se différencieraient alors en DC. Il a été démontré récemment que les monocytes se différenciaient *in situ*, dans les ganglions lymphatiques, après infection (Cheong *et al.*, 2010), mais aussi que les T helper pouvaient induire leur différenciation *in vivo* (Alonso *et al.*, 2011).

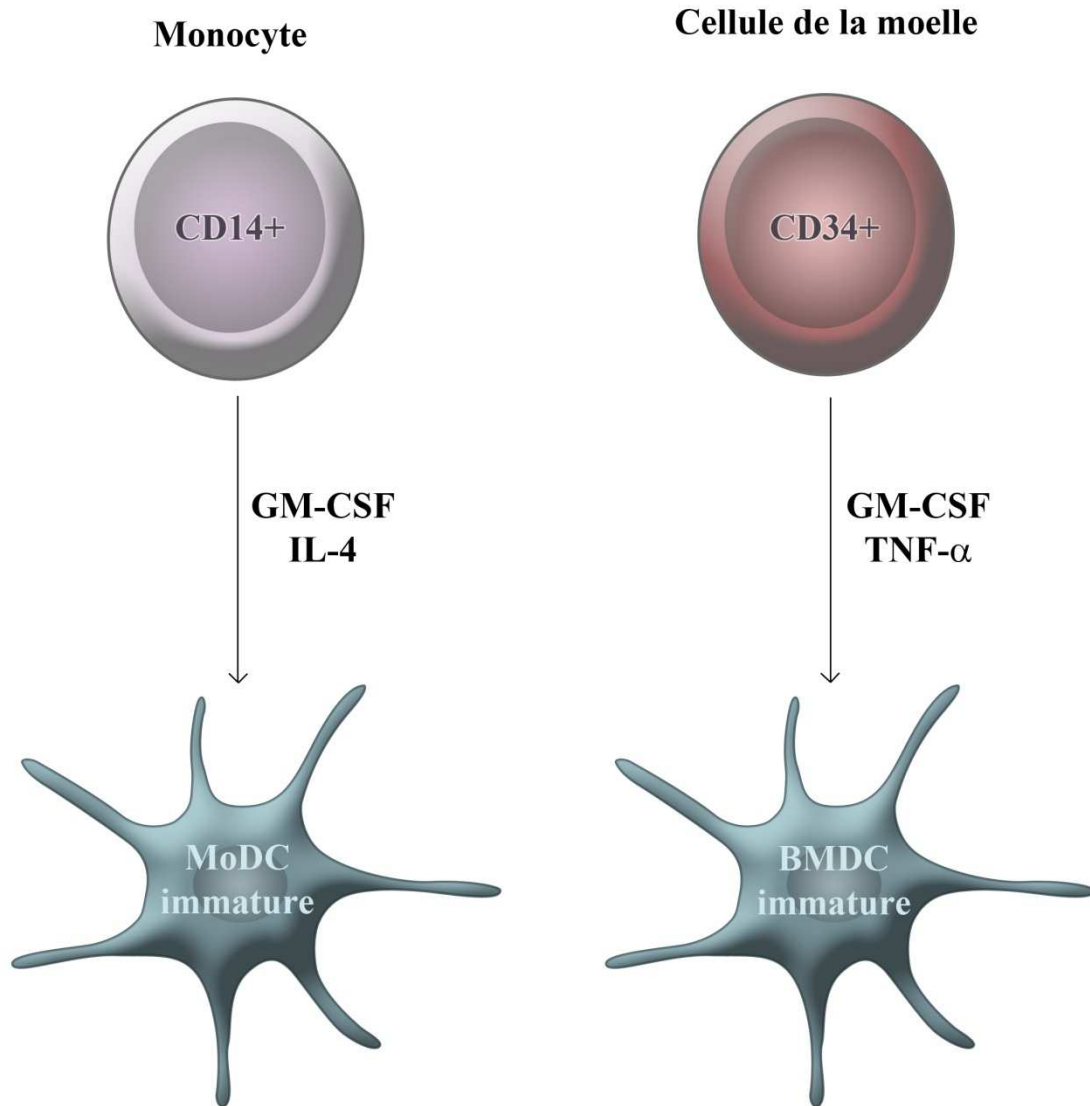


Figure 5: Schématisation des cellules dendritiques générées *in vitro*.

2. Chez le rat

La plupart des études ont utilisé l'histologie pour caractériser les DC dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, tels que dans les poumons, le foie, et les intestins (D. N. Hart & J. W. Fabre, 1981; P. G. Holt *et al.*, 1988; Maric *et al.*, 1996). Cependant, aucune de ces études n'a permis de classer les DC en différentes populations et l'ontogénie des DC chez le rat reste mal connue. Les travaux de MacPherson ont permis d'identifier deux populations distinctes de DC qui expriment fortement le CD103 reconnu par l'anticorps OX62 (Pugh *et al.*, 1983; Brenan & Puklavec, 1992). Ces deux types de DC se différencient par l'expression de CD4 et de CD172 α (SIRP- α [Signal Regulatory Protein- α]). Ainsi trouve-t-on des DC CD4⁺ SIRP α ⁺ et des DC CD4⁻ SIRP α ⁻ (L. Liu *et al.*, 1998). CD103 est considéré comme

marqueur spécifique des DC chez le rat, alors que chez l'homme et la souris, cette intégrine est considérée comme un marqueur des lymphocytes T intra-épithéliaux (Cerf-Bensussan *et al.*, 1987; Schön *et al.*, 1999). Chez le rat, il a été montré que l'anticorps OX62 marquait, en plus de certaines populations de DC (les DC « voilées », mais pas les cellules de Langerhans), les lymphocytes T intra-épithéliaux de l'épiderme et de l'intestin grêle (Brenan & Puklavec, 1992; Brenan & Rees, 2000). Comme chez l'homme, les DC n'expriment pas le CD8 (contrairement aux DC murines), cependant dans certains modèles tumoraux ou d'EAE, certaines études montrent une expression de CD8 à la surface de cellules OX62⁺ (Chaux *et al.*, 1993; de la Mata *et al.*, 2001; Pettersson *et al.*, 2004). Les travaux de Josien ont montré que les DC, chez le rat, expriment le récepteur NKRP-1 après une nuit de culture, et que les DC spléniques (et non du thymus ou des ganglions) exercent une activité cytotoxique calcium- et TNF-indépendante de type NK contre une lignée tumorale YAC-1 (Josien *et al.*, 1997). Ils l'ont identifiée en tant que cellules CD4⁻ SIRPα⁻ CD103⁺. Peu d'études décrivent la génération de DC à partir de précurseurs de la moelle osseuse, cependant il est possible de générer des DC à partir de moelle par l'utilisation de GM-CSF et d'IL-4 (Talmor *et al.*, 1998; Grauer *et al.*, 2002).

E. Développement des cellules dendritiques chez l'homme

Malgré la caractérisation de différents progéniteurs et cytokines par les études de mise au point de génération de DC *in vitro*, il est à noter que les voies de différenciation réellement empruntées *in vivo* ne sont pas clairement établies.

Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ se différencient en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP ; Common Lymphoid Progenitors ; précurseurs des lymphocytes T et B, et des cellules NK) et en progéniteurs myéloïdes communs (CMP ; Common Myeloid Progenitors ; précurseurs des granulocytes, érythrocytes, mégacaryocytes, monocytes et macrophages) (K. Akashi *et al.*, 2000) (cf. **Figure 6**). Dans la moelle osseuse et le sang, les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine des deux précurseurs immédiats de DC : les pré-DC1 et pré-DC2 ; correspondant, respectivement, aux monocytes et aux pDC. Ces deux types de précurseurs seraient majoritairement issus d'un progéniteur commun aux macrophages d'origine myéloïde (CMP) exprimant Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3), mais plusieurs études démontrent aussi une participation d'un progéniteur commun aux lymphocytes B (CLP), exprimant lui aussi Flt3 (L. Wu & Y.-J. Liu, 2007). Flt3 et Flt3 ligand semblent être des facteurs majeurs dans l'homéostasie des mDC, et, de manière plus

cruciale, dans celle des pDC puisque, alors que des souris déficientes en Flt3 ligand voient le nombre de leur DC diminuer (H. J. McKenna *et al.*, 2000), sa présence augmente leur génération (4 à 8 fois plus de DC après administration de Flt3 ligand chez des volontaires humains) (Maraskovsky *et al.*, 2000). Par génération de DC *in vitro*, les voies de différenciation issues des CMP sont mieux connues (R. M. Steinman & K. Inaba, 1999). Sous action du GM-CSF, d'IL-4, et du TGF- β , les précurseurs myéloïdes CD14⁻ se différencient en cellule de Langerhans et migrent sous la peau via le marqueur CLA (Strunk *et al.*, 1997), alors que les précurseurs myéloïdes CD14⁺ se différencient en DC immatures semblables aux DC interstitielles (Caux *et al.*, 1997).

Les pré-DC1 expriment le marqueur CD14, et possèdent la capacité de se différencier en DC immature DC1 ou en macrophage. Ce phénomène semble se produire *in vivo*, comme des expériences le montrent *in vivo* chez la souris (Randolph *et al.*, 1999), et *in vitro* par des expériences de « trafficking » mimant la diapédèse, chez l'homme (Randolph *et al.*, 1998). Les voies de développement des pDC, ou pré-DC2, restent assez mal connues. Cependant, la présence de Flt3 ligand et l'expression de son récepteur Flt3 semblent être primordiaux pour le développement de ces cellules, tout comme l'expression du facteur de transcription E2-2 (et réciproquement de son inhibiteur Id2) puisque des progéniteurs hématopoïétiques déficients en E2-2 ne se développent pas en pDC (Cisse *et al.*, 2008). Enfin, le G-CSF semble important pour leur mobilisation hors de la moelle osseuse (Arpinati *et al.*, 2000; Pulendran *et al.*, 2000).

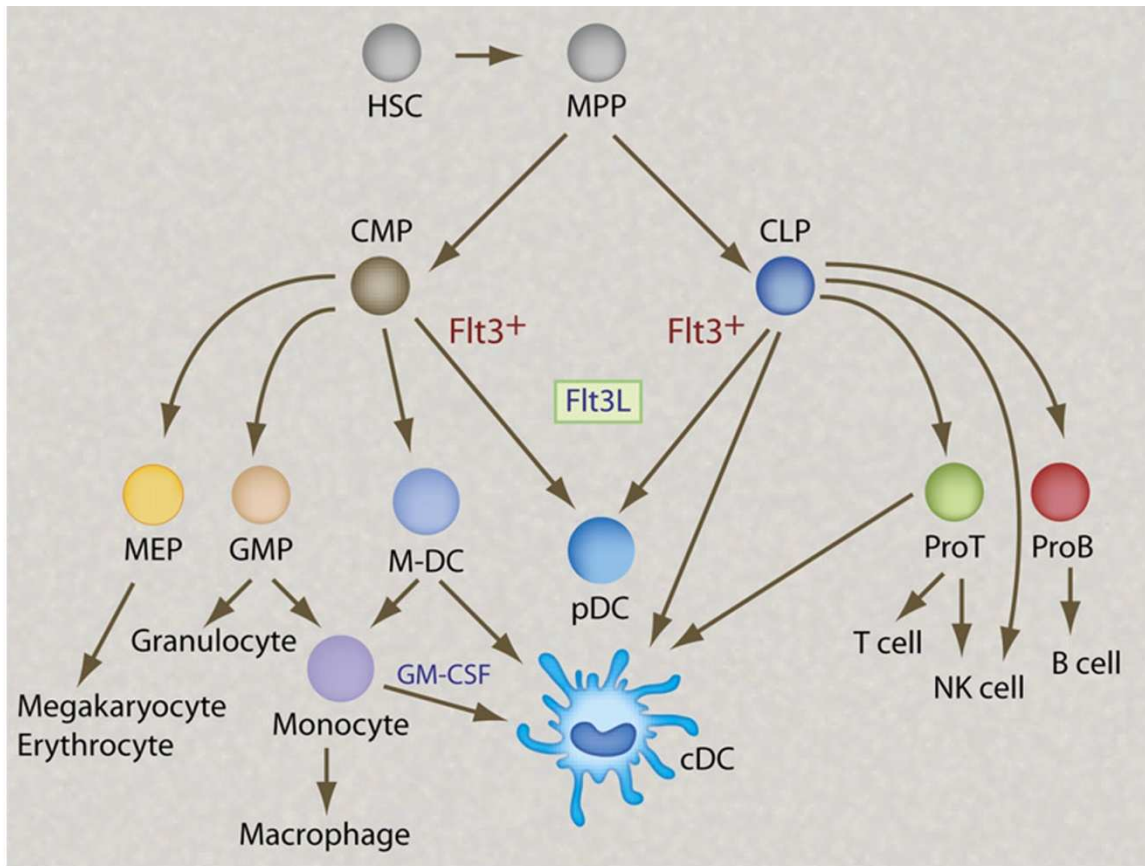


Figure 6 : Représentation du développement des DC à partir de la moelle.

cDC : conventional DC ; CLP : Common Lymphoid Progenitors ; CMP : Common Myeloid Progenitors ; GMP : Granulocyte and Macrophage Precursors ; HSC : Hematopoietic Stem Cells ; M-DC : Macrophage and DC Precursors ; MEP: Megakaryocyte and Erythrocyte Progenitors; MPP : Multipotent progenitors. Selon Wu et Liu, *Immunity* 2007.

F. Les cellules dendritiques : maturation et TLR

La maturation/activation permet aux DC d'acquérir une fonction de CPA optimale pour induire une réponse T, de par la surexpression des molécules de costimulation, du CMH de classe II, et par la production de cytokines (Reis e Sousa, 2006). En général, l'activation des cellules dendritiques s'effectue lors de la reconnaissance de motifs moléculaires conservés par les pathogènes appelés PAMP (Pathogen associated molecular pattern) (Janeway, 1989), ou de molécules du soi assimilées comme un danger appelés DAMP (Danger Associated Molecular Pattern) (Shimizu & Fujii, 2008), par les PRR, et plus particulièrement par les TLR. Ces récepteurs régulent l'activation de la réponse innée, mais aussi de la réponse adaptative (Janeway & Medzhitov, 1998). L'activation des DC peut aussi se faire via d'autres PRR qui ne seront pas abordés dans cette thèse, tels que les NLRs (Nucleotide-binding

oligomerization domain-Like receptors) (van Vliet *et al.*, 2007). Il est à noter que, lorsque les lymphocytes T et les DC se rencontrent, l'interaction CD40-CD40L peut induire la maturation des cellules dendritiques (Caux *et al.*, 1994), mais il semble surtout qu'elle amplifie la maturation des cellules dendritiques (permettant une forte production d'IL-12) (O. Schulz, Edwards, *et al.*, 2000; Cella *et al.*, 1996). De même des cytokines telles que le TNF- α et les IFN peuvent induire la maturation de ces cellules, mais aussi divers cocktails cytokiniques (Castiello *et al.*, 2011).

1. Les Toll-like receptors (TLR)

L'importance des récepteurs Toll dans l'immunité innée a été initialement décrite chez la drosophile ; les récepteurs Toll avaient alors été identifiés comme nécessaires durant le développement embryonnaire pour l'établissement de l'axe dorso-ventral (Hashimoto *et al.*, 1988). Du fait de la similarité de sa signalisation (activation de NF- κ B) avec celle de l'interleukine-1 chez les mammifères, les domaines intracytoplasmiques étaient semblables et correspondent maintenant au domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor). Finalement, 9 Toll ont été découverts chez cet insecte, et jouent un rôle clef dans la défense immunitaire contre les pathogènes de cet insecte (Belvin & K. V. Anderson, 1996). Peu de temps plus tard, un homologue humain appelé TLR est découvert (Medzhitov *et al.*, 1997), alors qu'aujourd'hui 11 membres ont été trouvés (TLR-1 à -11) ; cependant le onzième ne semble être qu'un pseudogène (sauf chez la souris) (Roach, 2005). Ces récepteurs sont classés en 6 familles, en se basant sur les classes de pathogènes reconnus et leur homologie : les TLR-2 (TLR-1, -2, -6, -10), le TLR -3, le TLR-4, le TLR-5, et les TLR -9 (TLR-7, -8, -9). Les TLR sont des glycoprotéines de type I et possèdent des domaines extracellulaires riches en leucine (LRR ; Leucine-Rich Repeats), contrairement au récepteur de l'IL-1 qui a un domaine immunoglobuline-like. (Bell *et al.*, 2003).

a. TLR-1, -2, et -6

Les lipoprotéines des pathogènes tels que les bactéries Gram négatives, les mycoplasmes, l'acide lipoteichoïque des bactéries Gram positives ou les composés protéoglycanes (zymosan) (O. Takeuchi *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2003) et le LPS (LipoPolySaccharide) des non-entérobactéries (différent du LPS des bactéries Gram négatives) (Hirschfeld *et al.*, 2001) sont reconnus par le TLR-2. Le TLR-2 peut former un hétérodimère avec le TLR-1 ou -6, et permet respectivement la reconnaissance de lipopeptides

triacyls ou diacyls (O. Takeuchi *et al.*, 2002). Des études montrent que des ligands endogènes pourraient aussi activer le TLR-2 tels que les heat shock protéines (Hsp) (Erridge, 2010).

b. TLR-3

Même s'il existe d'autres mécanismes indépendants du TLR-3 (Diebold *et al.*, 2003), celui-ci permet la reconnaissance de l'ARN double brin produit essentiellement par les virus et entraîne la production d'interféron de type I (Alexopoulou *et al.*, 2001). Une ligand synthétique du TLR-3 permet son étude : l'acide polyinosinique-polycytidilique [Poly(I :C)].

c. TLR-4

Ce TLR est essentiel dans la reconnaissance du LPS des bactéries Gram négatives (Poltorak *et al.*, 1998), mais semble aussi impliqué dans celle de ligands endogènes, appelés DAMP, comme les Hsp60 et 70, la fibronectine, les oligosaccharides d'acide hyaluronique, l'héparane sulfate et le fibrinogène. Cependant, la véracité des travaux identifiant les différents ligands endogènes est remise en cause, de par la possible contamination de ces molécules avec du LPS (Erridge, 2010). Ainsi des études leur confèreraient-elles plus un rôle en tant qu'« assistant » de la reconnaissance des PAMP (par sensibilisation du TLR ou par liaison au PAMP) ; les études montrant que le LPS peut être reconnu par les Hsp70 et 90, ou le CXCR4 vont en ce sens (K. Triantafilou *et al.*, 2001).

La reconnaissance du LPS n'implique pas uniquement le TLR-4 mais aussi la LBP (LPS Binding Protein) présent dans le sérum et le CD14 (qui existe aussi sous forme soluble sCD14) exprimé par les monocytes et macrophages, formant, *in fine*, un complexe (Q. Jiang *et al.*, 2000; da Silva Correia *et al.*, 2001; da Silva Correia & Ulevitch, 2002). La protéine MD-2 (Myeloid Differentiation factor-2) peut, quant à elle, augmenter la sensibilité du TLR-4 vis-à-vis du LPS (Shimazu *et al.*, 1999). Le LPS peut aussi être détecté dans les compartiments intracellulaires par NOD-1 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain, un autre PRR comportant un domaine LRR) (Inohara *et al.*, 2001).

d. TLR-5

Les composés protéiques du flagelle, et plus particulièrement les domaines conservés de la flagelline sont reconnus par le TLR-5 (F. Hayashi *et al.*, 2001).

e. TLR-7 et -8

Ils sont impliqués dans les réponses antivirales et donc, dans la production d'IFN- α (Hemmi *et al.*, 2002). L'imidazoloquinoline, un composé synthétique, permet son étude, mais ses ligands naturels semblent être des motifs d'ARN riches en guanine et uracile (Diebold *et al.*, 2004). Les ARN modifiés, ou méthylés, correspondant aux ARN de mammifères, diminuent la production de cytokines et de marqueurs d'activation par les DC, alors que les ARN non modifiés, correspondant aux ARN mitochondriaux et bactériens, les activent (Karikó *et al.*, 2005).

f. TLR-9

L'ADN aux motifs CpG non méthylés d'origine bactérienne sont reconnu par ce TLR (Hemmi *et al.*, 2000; Cornélie *et al.*, 2004). Deux types de CpG existent, de par leur structure distincte, et induisent une réponse différente. Le type B induit la production d'IL-12 et de TNF- α , alors que le type A induit la production d'IFN- α par les pDC, mais peu d'IL-12 (Krug *et al.*, 2001; Verthelyi *et al.*, 2001). Ce TLR semble impliqué dans les maladies auto-immunes telles que le lupus systémique et l'arthrite rhumatoïde (Leadbetter *et al.*, 2002; Viglianti *et al.*, 2003; Boulé *et al.*, 2004).

g. TLR-10

Ce TLR est fortement exprimé par les lymphocytes B, dans les poumons et faiblement dans les tissus lymphoïdes, toutefois son ligand reste inconnu (Chuang & Ulevitch, 2001; Hasan *et al.*, 2005).

h. TLR-11

Ce TLR n'existe que sous la forme d'un pseudogène chez l'homme (D. Zhang *et al.*, 2004).

En plus d'être différenciellement exprimés selon les différentes populations de DC, mais aussi de leur état d'activation, d'autres cellules contribuant aux réponses inflammatoires comme les macrophages, les monocytes et les mastocyte, expriment des TLR (Muzio *et al.*, 2000; McCurdy *et al.*, 2001; Supajatura *et al.*, 2001). Des études ont montré que la plupart des tissus expriment au moins un TLR, contribuant, là encore, aux réponses inflammatoires (Zarembek & Godowski, 2002). Au sein de la cellule, les TLR sont distribués à différents endroits. Ainsi trouve-t-on les TLR-1, -2, -4, -5 et -6 à la surface de la cellule, alors que les TLR-3, -7, -8, et -9 sont exprimés dans les compartiments intracellulaires comme les

endosomes (Heil *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003; Latz *et al.*, 2004). L'expression des TLR est modulée par différents facteurs, ainsi une agression (e.g. ischémie-reperfusion, invasion microbienne) ou la présence de cytokine peut-elle influencer leur expression (Pulskens *et al.*, 2008). Chez les macrophages, une infection virale induit une augmentation des TLR-1, -2, -3, et -7, et une diminution du TLR-4 (F. Nomura *et al.*, 2000), alors qu'en bloquant l'IFN- α et β , l'augmentation est prévenue.

2. Signalisation des TLR

Chez les mammifères, deux types de voies de signalisation de TLR existent et peuvent être activés conjointement (TLR-4) ou séparément en fonction du TLR activé. Quelque soit la voie empruntée, la signalisation est dépendante d'une interaction entre les domaines TIR de la partie cytosolique du TLR et des molécules adaptatrices transduisant le signal (L. A. J. O'Neill & Bowie, 2007). La signalisation des TLR devient de plus en plus complexe, de par le fait que les TLR peuvent se dimériser, et que la combinaison de ligands de TLR différents entraîne des interactions entre les voies de signalisation.

a. La voie dépendante de MyD88

L'importance de la molécule MyD88 (Myeloid Differentiation 88) a été démontrée sur des souris déficientes en MyD88 qui ne répondent pas, ou peu, aux ligands des TLR-2, -4, -5, -7 et -9 (T. Kawai *et al.*, 1999; O. Takeuchi *et al.*, 2000; Adachi *et al.*, 1998). Sur ces souris, l'activation des cibles connues des TLR que sont NF- κ B, JNK (JUN N-terminal Kinase) et p38 est absente pour tous les TLR, excepté pour le TLR-4 et le TLR-3 (Kaisho *et al.*, 2001; Alexopoulou *et al.*, 2001) qui utilisent, respectivement, la voie indépendante de MyD88 de manière conjointe, ou exclusive. MyD88 est une molécule adaptatrice contenant un domaine TIR, un domaine intermédiaire et un domaine de mort (DD ; Death Domain). Que ce soit pour les TLR, ou les molécules adaptatrices, dans leur domaine TIR, deux régions particulières ont été étudiées et sont appelées « boucle BB » et « boucle DD » (L. A. J. O'Neill & Bowie, 2007). Il a ainsi été montré que la boucle BB du TLR-2 et la boucle DD de MyD88 étaient nécessaire pour que ces deux protéines interagissent (Y. Xu *et al.*, 2000; Dunne *et al.*, 2003), tout comme les boucles DD du TLR-2, et BB du TLR-1 pour se dimériser (Gautam *et al.*, 2006). Exceptions faites des TLR-4 et -2, nécessitant le recrutement de la molécule adaptatrice MAL (MyD88-Adaptator-Like ; aussi connu sous le nom de TIRAP) (Horng *et al.*, 2001; Kagan & Medzhitov, 2006) par interaction TIR-TIR pour mobiliser MyD88 sur le TLR, pour tous les autres TLR activés, MyD88 est directement recrutée par interaction TIR-

TIR. Il est à noter que MAL nécessite d'être phosphorylé par BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) afin de poursuivre la signalisation (Jefferies *et al.*, 2003; P. Gray *et al.*, 2006), et que MAL peut-être dégradé par SOCS1 (Suppressor Of Cytokine Signalling 1) (Mansell *et al.*, 2006). Les membres de la famille IRAK (IL-1R-Associated Kinase) sont ensuite mobilisés. IRAK4 semble être la première kinase impliquée, puis IRAK1 est recrutée. Un variant de MyD88 induit après LPS (ligand du TLR-4), appelé MyD88s, ne possède pas l'interdomaine nécessaire à l'interaction avec IRAK4 et apparaît donc être un régulateur négatif de la signalisation (Burns *et al.*, 2003). De manière intéressante, MyD88s n'inhibe pas l'activation de JNK, indiquant que JNK ne nécessite pas l'activation de signal via IRAK4 (Janssens *et al.*, 2003). Lorsqu'IRAK2 est surexprimé, il peut interagir avec MyD88, tandis qu'IRAK-M empêcherait la dissociation d'IRAK1 et IRAK4 avec MyD88 (K. Kobayashi *et al.*, 2002). IRAK1 mobilise TRAF6 (TNF-Receptor-Associated Factor 6), qui recrute TAK1 (Transforming-growth-factor- β -Activated Kinase 1), TAB2 (TAK1-Binding Protein 2), et les facteurs d'ubiquitinylation UEV1A (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Variant 1A) et UBC13 (Ubiquitin-Conjugating enzyme 13) (Z. J. Chen, 2005). Ce complexe modifie TRAF6 et TAK1, ce qui permet l'activation de NF- κ B, de p38 et de JNK (par activation des kinases correspondantes). Le CD14 semblerait nécessaire à une signalisation via MyD88 lors de l'activation des dimères TLR-2 et -6, ou lorsque le LPS (ligand du TLR-4) est « lisse » (contient l'antigène O), contrairement à celui qui est « rugueux » (Z. Jiang *et al.*, 2005). Lorsque les TLR-7, -8, ou -9 sont engagés, la signalisation via MyD88 est requise pour produire les IFN de type I (Honda *et al.*, 2005), et plus particulièrement pour activer IRF7 (Interferon Regulatory Factor 7 : les IRF sont une famille de facteurs de transcription) et la production d'IFN- α (T. Kawai *et al.*, 2004). Pour ces TLR, il semble qu'un complexe MyD88-IRAK1-IRAK4-IRF7 se forme, où IRF7 est phosphorylé par IRAK1 (Hochrein *et al.*, 2004). Respectivement, l'activation d'IRF5, et d'IRF1 (particulièrement sur les DC myéloïdes) (Negishi *et al.*, 2006) par interaction avec MyD88, est nécessaire à l'induction d'IFN de type I, mais aussi à celle de cytokines proinflammatoires telle que l'IL-12, l'IL-6 et le TNF- α pour tous les TLR (Takaoka *et al.*, 2005). De manière intéressante, il semble que l'IFN- γ ait un effet de « priming » sur l'action des TLR, et cela semble lié au fait qu'il induise IRF1 (Negishi *et al.*, 2006). TRAF3 s'avère, lui aussi, interagir avec MyD88 lors de l'activation des TLR-4 et -9, puisque l'induction de l'IFN de type I et l'IL-10 est inhibée sur des cellules déficientes en TRAF3 (H. Häcker *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que lorsque le TLR-4 est activé par du LPS, l'activation de NF- κ B est retardée en comparaison aux autres TLR. Des études montrent que NF- κ B est activé en deux phases : une que la voie

MyD88 active rapidement, et l'autre indépendante de MyD88 via la production autocrine de TNF (Covert *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2005). La combinaison de ces signaux permet la stabilisation de l'activation de NF- κ B. Le TGF- β , une cytokine anti-inflammatoire entraîne la dégradation de MyD88, et peut donc interférer avec la signalisation dépendante de MyD88 (Naiki *et al.*, 2005).

La signalisation via MyD88 n'est pas spécifique des TLR ni de récepteur à domaines TIR, ainsi les récepteurs de l'IL-1, l'IL-18 et l'IFN- γ dépendent-ils aussi d'une signalisation via MyD88 (Adachi *et al.*, 1998; D. Sun & A. Ding, 2006) (cf. **Figure 7**).

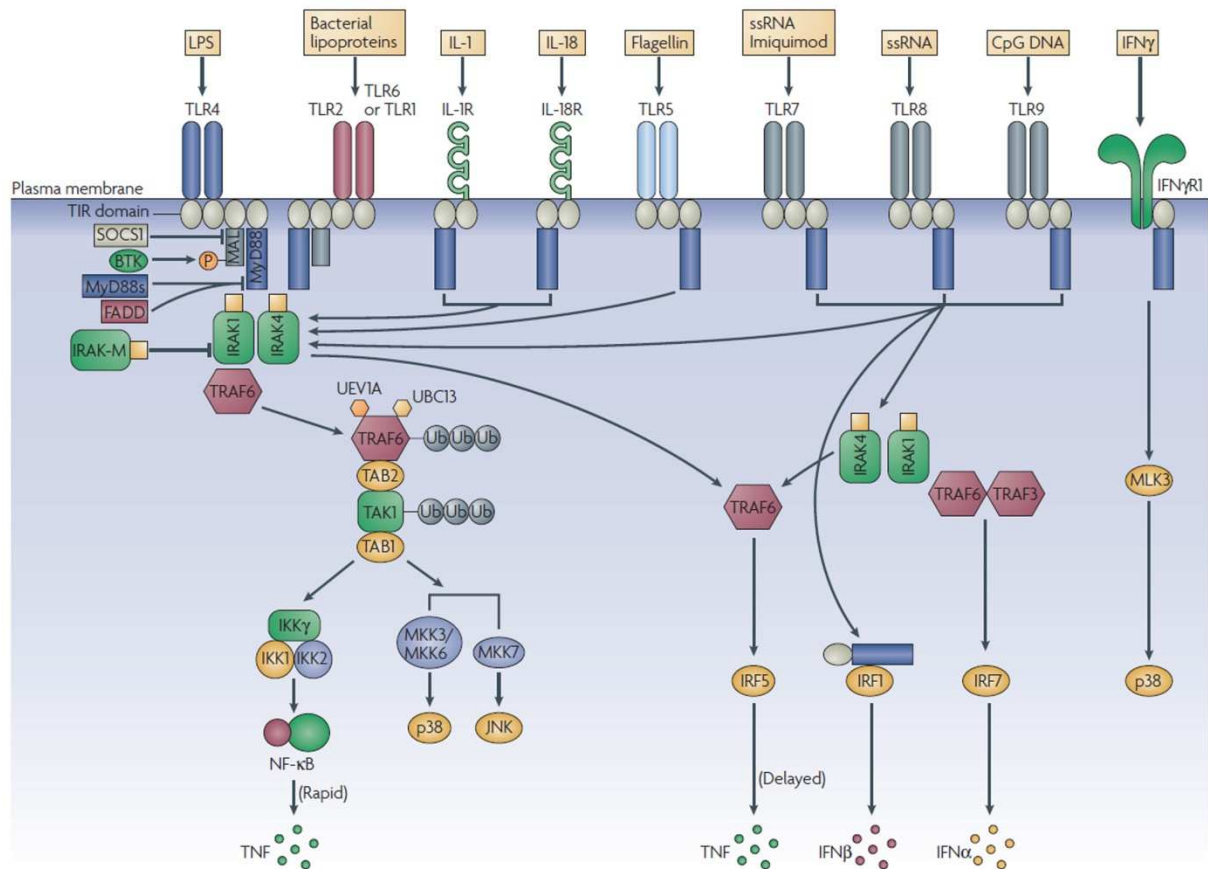


Figure 7: Signalisation via MyD88.

Selon O'Neill et Bowie, *Nat. Rev. Immunol.*, 2007.

Il est à noter que des études montrent que la voie MyD88 est importante dans le rejet et la tolérance en transplantation (LaRosa *et al.*, 2007). Ainsi, chez des souris déficientes en MyD88, un blocage de la costimulation pouvait-il induire une survie à long terme d'allogreffes de peau par action des Treg, alors que ce traitement était inefficace chez les souris sauvages de la même souche (Walker *et al.*, 2006). De même, lorsqu'un blocage de la

costimulation est efficace pour induire une survie à long terme d'allogreffes de peau, l'injection de ligands de TLR, tel que le LPS, entraîne le rejet (Thornley *et al.*, 2006). Dans cette étude, parmi les ligands de TLR testés, le LPS induisait le rejet le plus rapide, tandis que les souris TLR-4 déficientes voyaient la survie de leur allogreffe augmentée. Cependant, il a récemment été montré que l'expansion des MDSC était dépendante de la voie MyD88 (De Wilde *et al.*, 2009; Chalmin *et al.*, 2010).

b. La voie indépendante de MyD88

Cette voie est la seule utilisée par le TLR-3, tandis qu'elle est utilisée conjointement avec MyD88 pour le TLR-4 (L. A. J. O'Neill & Bowie, 2007) (cf. **Figure 8**). La protéine adaptatrice TRIF (TIR-domain-containing adaptator protein inducing IFN β) est la molécule en amont de cette voie de signalisation pour le TLR-3 tandis que pour le TLR-4, son recrutement est dépendant de la présence de TRAM (TRIF-Related Adaptator Molecule) (Oshiumi, Sasai, *et al.*, 2003; M. Yamamoto, S. Sato, Hemmi, Uematsu, *et al.*, 2003); dans tous les cas, ces molécules sont recrutées par interaction TIR. La présence de TRAM est nécessaire pour l'induction de TNF, d'IL-6, de CD86, et de plusieurs gènes dépendants de l'activité d'IRF3 (Fitzgerald *et al.*, 2003), tandis que son activation par phosphorylation semble dépendante de l'activité de la PKC ϵ (Protéine Kinase C ϵ) (McGettrick *et al.*, 2006). La surexpression de TRIF entraîne l'activation du promoteur de l'IFN- β (Oshiumi, Matsumoto, *et al.*, 2003; M. Yamamoto *et al.*, 2002), tandis que les macrophages de souris déficientes en TRIF ont un défaut d'expression de l'IFN- β , du TNF- α , de l'IL-12p40, de l'IL-6, des marqueurs d'activation CD69 et CD86, et d'activation de IRF3 après engagement des TLR-3 ou -4 (M. Yamamoto, S. Sato, Hemmi, Hoshino, *et al.*, 2003). TRIF semble donc contrôler la synthèse d'IFN à travers IRF3, mais aussi IRF5 (Takaoka *et al.*, 2005; Fitzgerald *et al.*, 2003). Une fois recrutée au TLR-3 ou -4, TRIF s'associe à TBK1 et probablement avec TRAF3 (Sasai *et al.*, 2005). TRAF6 serait aussi recrutée et activerait en aval NF- κ B, mais cela reste controversé (Z. Jiang *et al.*, 2004; Gohda *et al.*, 2004). Une autre voie dépendante de TRIF activerait NF- κ B, en recrutant RIP1 et RIP3 (Receptor-Interacting Protein), mais RIP1 l'activerait, et RIP3 l'inhiberait (Meylan *et al.*, 2004; Cusson-Hermance *et al.*, 2005). De manière intéressante, des études montrent que l'activation d'IRF3 par la voie TRIF nécessite l'activation de la sous-unité p65 de NF- κ B pour activer des ISREs (IFN-Sensitive Response Elements) pour le TLR-4, mais pas pour le TLR-3 (Wietek *et al.*, 2003). En plus d'activer NF- κ B et IRF3, la voie TRIF activerait une troisième voie de signalisation distincte, uniquement pour le TLR-3, qui induit l'apoptose. Cette voie utilise RIP1, FADD

(Fas-Associated Death Domain) et la caspase-8 (K.-J. Han *et al.*, 2004; Ruckdeschel *et al.*, 2004). Cependant cette voie peut aussi être active sur des macrophages infectés par des bactéries via le TLR-4, et sur des DC *in vivo* (De Trez *et al.*, 2005). Enfin, pour le TLR-4 une dernière voie impliquant RHOB (Ras HOMologue gene family B) et GEFH1 (Guanine-nucleotide-Exchange Factor H1) a été identifiée et expliquerait comment le LPS induirait une augmentation de l'expression du CMH de classe II pendant la maturation des DC (Kamon *et al.*, 2006). Plusieurs molécules endogènes semblent inhiber la signalisation TRIF, mais de manière non spécifique, en inhibant aussi la voie MyD88. Ainsi trouve-t-on par exemple TRAF1 (Su *et al.*, 2006), A20 (Boone *et al.*, 2004), ou la PI3K (PhosphoInositoside 3-Kinase) (Aksoy *et al.*, 2005). La phosphatase SHP2 (SRC Homology 2-domain-containing protein tyrosine Phosphatase 2) semble quant-à-elle être spécifiquement inhibitrice de la signalisation dépendante de TRIF (An *et al.*, 2006). De même une autre molécule à domaine TIR est inhibitrice de la signalisation via TRIF, SARM (Sterile α - and ARmadillo-Motif-containing protein); cette molécule est surexprimée après activation des TLR-3 ou -4 (Carty *et al.*, 2006).

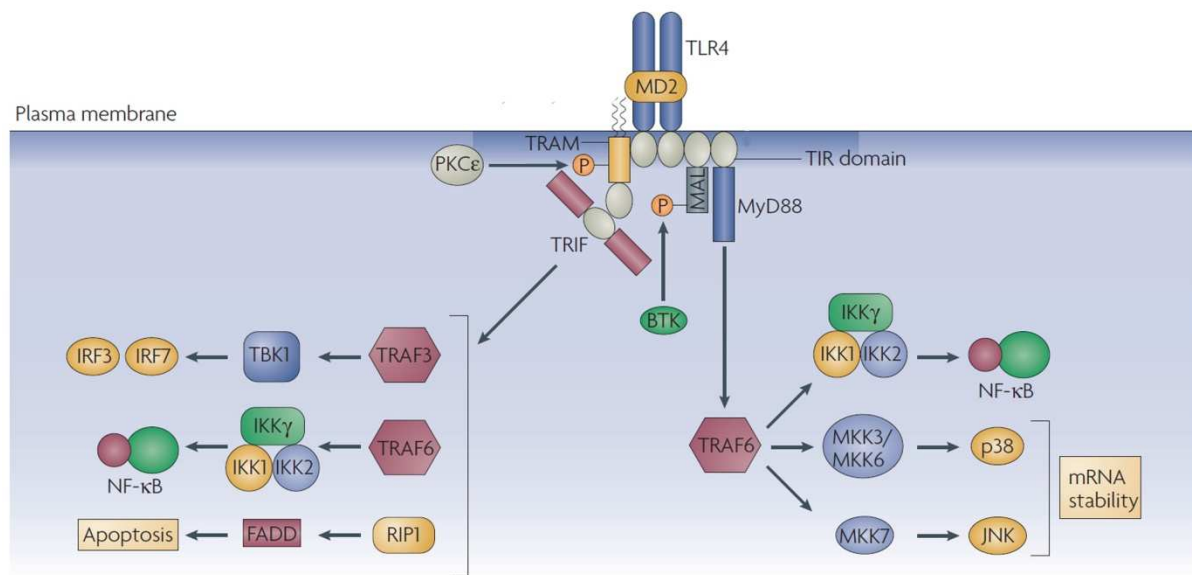


Figure 8: Signalisation via le TLR-4.

Selon O'Neill et Bowie, *Nat. Rev. Immunol.*, 2007.

Il est important de noter que la voie TRIF-dépendante est responsable, via la production d'IFN de type I, de la surexpression des molécules de costimulation et du CMH de classe II par les DC. Ainsi, *in vitro*, la voie TRIF est-elle essentielle lors de la maturation des

DC par le LPS afin d'induire une réponse des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Hoebe *et al.*, 2003).

Les cellules dendritiques sont capables d'interagir avec les cellules de l'immunité innée, tels que les cellules NK (Fernandez *et al.*, 1999; Altfeld *et al.*, 2011), mais cette capacité ne sera pas abordée dans cette thèse. La propriété remarquable de la DC est l'interaction qu'elle établit avec les cellules de l'immunité adaptative pour l'établissement de réponses immunes spécifiques optimales.

G. La cellule dendritique : chef d'orchestre de la réponse immune

A ce jour, trois types de CPA existent : les macrophages, les lymphocytes B et les DC. Les macrophages et les lymphocytes B ont comme fonction primaire de supprimer les pathogènes et de produire des Ig, respectivement. Les cellules dendritiques matures, quant à elles, ont comme seule fonction connue la présentation d'antigènes aux lymphocytes T ; une caractéristique majeure de ces cellules qui font d'elles des CPA dites professionnelles (Matzinger, 1994). Les lymphocytes T développent une réponse seulement après reconnaissance des complexes CMH-peptide portés par les CPA, et, alors que les $CD8^+$ sont restreints aux CMH de classe I, les $CD4^+$ sont restreints aux CMH de classe II. Les peptides sont issus de molécules endogènes ou exogènes digérées, puis apprêtées sur les CMH par les CPA. Les CPA, et plus particulièrement les DC, sont donc les cellules clés à l'initiation d'une réponse immune T.

1. Apprêtement antigénique

Le CMH est une famille multigénique dont l'importance a été démontrée en transplantation. Les molécules du CMH sont codées par plusieurs loci regroupés en deux classes, les molécules du CMH de classe I, et les molécules du CMH de classe II. Chez l'homme on parle de HLA, tandis que chez le rat on parle de RT1. Malgré l'existence chez les CPA du CMH de classe I non classique, CD1 présentant des antigènes lipidiques, ce type de CMH ne sera pas abordé ; il est tout de même intéressant de noter que la reconnaissance du complexe CD1-antigène par une cellule T peut entraîner la production d'IL-12 par la CPA (Fernández-Lago *et al.*, 1999).

a. CMH de classe I

Ces molécules sont formées par l'association non covalente d'une chaîne légère non polymorphe, la $\beta 2$ microglobuline, et d'une chaîne lourde polymorphe α comportant trois

domaines extracytoplasmiques ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), dont les deux premiers forment le site de liaison au peptide, une région transmembranaire, et une région intracytoplasmique. Le domaine $\alpha 3$ est impliqué dans l'association de la $\beta 2$ microglobuline et constitue le site de liaison du corécepteur CD8 (Bjorkman *et al.*, 1987). Toutes les cellules nucléées de l'organisme l'expriment. Ce CMH présente des peptides de petite taille (8 à 10 mers) provenant de la dégradation d'une protéine endogène (Germain & Margulies, 1993). Ces protéines sont ubiquitinylées puis dégradées par le protéasome. Les peptides résultant sont ensuite transloqués par TAP-1 et TAP-2 (Transporter associated with Antigen Processing) dans le réticulum endoplasmique pour être associées aux molécules de CMH I néosynthétisées (Brodsky *et al.*, 1996; P. J. Lehner & Cresswell, 1996; Cresswell *et al.*, 1999). Les complexes sont finalement orientés vers la membrane via l'appareil de Golgi. Lors de la maturation des DC, les protéasomes se transforment en immunoprotéasomes (Kloetzel & Ossendorp, 2004) permettant de produire plus efficacement certains peptides antigéniques, notamment viraux (Cerundolo *et al.*, 1995; Morel *et al.*, 2000). Après activation des DC, la synthèse et la demi-vie des molécules de CMH de classe I sont augmentées. Contrairement à celles de classe II, le renouvellement de ces molécules est continu même dans les DC matures (Rescigno *et al.*, 1998).

b. CMH de classe II

Elles sont formées par l'association d'une chaîne lourde β et d'une chaîne légère α , toutes deux participant à la fixation du peptide, et comportant, chacune, deux domaines extracytoplasmiques, un domaine membranaire, et un domaine intracytoplasmique. Les molécules du CMH de classe II ont, généralement, une expression restreinte aux CPA telles que les DC, les lymphocytes B, les macrophages et les cellules endothéliales. Synthétisées dans le réticulum endoplasmique, les molécules du CMH de classe II sont associées à une chaîne invariante qui empêche la fixation des antigènes endogènes (Cresswell *et al.*, 1999). Les antigènes sont dégradés par la voie endocytaire, puis sont acheminés vers des compartiments spécialisés nommés MIIC (MHC class II rich Compartments), riches en molécules de CMH II (Nijman *et al.*, 1995). Suite à l'action de protéases de la famille des cathépsines, les antigènes sont digérés en peptides, ainsi que la chaîne invariante (Villadangos & Ploegh, 2000). L'élimination permet la fixation du peptide (Pierre & Mellman, 1998) et ce complexe est présenté à la surface des CPA. A l'état immature, les cathépsines sont inhibées (Lautwein *et al.*, 2002), alors qu'après maturation, la synthèse des molécules de CMH II ainsi que les protéases sont actives, et les complexes CMH-peptides sont exportés à la membrane

(Trombetta *et al.*, 2003), restant stables durant plusieurs jours. Il semble cependant que les DC, à l'état immature, puissent exprimer les peptides du soi complexés au CMH II de façon constitutive à leur surface (Veeraswamy *et al.*, 2003). De cette manière, les complexes ont une demi-vie courte car ils sont rapidement endocytés, et cela permettrait de constamment présenter, à un faible niveau, des échantillons du répertoire antigénique du soi dans les organes lymphoïdes, et d'induire une tolérance périphérique (N. S. Wilson *et al.*, 2004).

c. Présentation croisée

Comme vu précédemment, le CMH de classe I est restreint à présenter des peptides d'origine endogène. Ainsi, une cellule infectée par un virus pourra présenter des peptides viraux sur ses CMH de classe I afin d'entraîner une réponse antivirale par les lymphocytes T CD8⁺, mais des débris viraux extracellulaires ne pourront pas être présentés sur les CMH de classe I. Il existe cependant des cellules capables de présenter des peptides d'origine exogène telles que les DC principalement, et dans une moindre mesure les lymphocytes B et macrophages (Amigorena & Savina, 2010). Cette capacité d'apprêter et de présenter des antigènes d'origine exogènes sur des CMH de classe I est appelée présentation croisée (Bevan, 1987).

Deux voies de présentation croisée existent : la voie cytosolique, et la voie vacuolaire. Dans la première, qui est la majoritaire, les molécules antigéniques phagocytées seraient relarguées dans le cytosol puis rejoindraient la voie d'apprêtement classique du CMH de classe I via le protéasome et TAP (Amigorena & Savina, 2010). Il serait aussi possible que le phagosome et le réticulum fusionnent, relarguent la molécule dans le cytosol pour être dégradée, puis réimportent les peptides résultant pour les apprêter. La voie vacuolaire est moins connue, mais elle implique que la dégradation en peptide ne fasse pas intervenir d'étapes cytosolique (protéasome) et que l'apprêtement sur le CMH se fasse dans le phagosome (Ramachandra *et al.*, 2009). L'origine des peptides présentés par cette voie est diverse et peut provenir des molécules du soi (Kurts *et al.*, 1997). Seulement certains sous-types de DC peuvent effectuer la présentation croisée, chez la souris ce sont les CD8⁺, tandis que chez l'homme ce seraient les DC BDCA-3⁺ (Crozat *et al.*, 2010), mais elles exprimeraient toutes deux le récepteur à chimiokine XCR1 (XC chemokine Receptor 1). Comme dit précédemment, ce mécanisme intervient dans l'alloreconnaissance indirecte en transplantation.

2. Maturation et migration des cellules dendritiques

Les DC résidentes en périphérie des organes lymphoïdes sont dans un état immature du fait de leur faible capacité à stimuler des lymphocytes T, et de leurs grandes capacités de capture antigénique. Suite à la capture d'antigènes et à la maturation, ces DC perdent la capacité de phagocytose (Sallusto *et al.*, 1995), surexpriment des molécules costimulatrices telles que RANK (Receptor Activator of NF- κ B), CD40, CD58, CD80 et CD86 (Banchereau & R. M. Steinman, 1998) et le CMH de classe II. De manière intéressante, lorsque les DC rencontrent des cellules apoptotiques, elles restent immatures, alors que si ce sont des cellules nécrotiques, elles deviennent matures (Gallucci *et al.*, 1999). Avant maturation, le pH lysosomal est sous optimal pour la plupart des enzymes, alors qu'après maturation, le pH baisse par activation des pompes à protons (Trombetta & Mellman, 2005), ce qui permet la protéolyse des antigènes et leur chargement sur les molécules de CMH de classe II. La maturation induit des changements morphologiques par perte des structures adhésives, une réorganisation du cytosquelette entraînant la formation de dendrites et l'acquisition d'une forte mobilité (A. Tang *et al.*, 1993; Banchereau & R. M. Steinman, 1998). Il est à noter, cependant, qu'à un stade avancé de maturation, les DC deviennent incapables de répondre à un second stimulus d'activation, et sont appelées DC paralysées ou « exhausted » (Langenkamp *et al.*, 2000). Plus particulièrement, ces cellules deviennent incapables de produire de l'IL-12, et ne sont plus capables d'induire une réponse Th1, mais uniquement des réponses Th2.

Suite à l'activation des DC lors d'une inflammation (*e.g.* suite à une transplantation), elles acquièrent une mobilité importante pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires, sites d'activation des lymphocytes T naïfs (Yoneyama *et al.*, 2005), car ceux-ci restent incapables d'accéder aux tissus périphériques et sont limités à la circulation sanguine ainsi qu'aux organes lymphoïdes secondaires (von Andrian & C. R. Mackay, 2000). Induites par l'inflammation, ou constitutives, les chimiokines sont des molécules clés dans le trafic des leucocytes (D. Rossi & Zlotnik, 2000). Les chimiokines constitutives sont exprimées au sein des organes lymphoïdes, participant notamment à la migration des DC à l'état quiescent (exprimant notamment CCR1 et CCR5), à la circulation continue des lymphocytes T naïfs et à l'architecture des organes lymphoïdes secondaires (C. L. Lin *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1998; D. Rossi & Zlotnik, 2000), tandis que les chimiokines inflammatoires sont absentes des tissus normaux, mais induites par différents facteurs durant une infection ou une agression (*e.g.* ischémie-reperfusion) afin de recruter les leucocytes (D. Chen *et al.*, 2003). En fonction de la

population de DC concernée, diverses chimiokines constitutives sont exprimées, ainsi les DC myéloïdes expriment CCL22 (C-C chemokine Ligand 22) et CCL17 tandis que les pDC expriment CCL3, CCL4 et CXCL8 (C-X-C chemokine Ligand 8) (Penna *et al.*, 2002). De plus, en fonction du TLR mis en jeu, la DC produira différent type de chimiokines. Ces chimiokines interviennent aussi de manière directe dans la différenciation des lymphocytes Th (Luther & Cyster, 2001), CCL2 inhibant par exemple la production d'IL-12 par la DC et donc l'induction de réponse Th1, ou de manière indirecte : les lymphocytes Th1 et Th2 exprimant des jeux de récepteurs à chimiokines spécifiques (C. H. Kim *et al.*, 2003), lorsque les DC sécrètent une chimiokine particulière, elles recrutent le sous type de T helper exprimant son récepteur. Plusieurs récepteurs à chimiokines sont exprimés par les DC immatures, et sont perdus après maturation (Penna *et al.*, 2002).

3. Modulation des réponses Th1/Th2 via les TLR

Alors que, phénotypiquement, l'état de maturation des DC module l'amplitude et l'activation de la réponse immune T par le niveau d'expression des complexes CMH-peptides et des molécules de costimulation (des molécules impliquées dans le signal 1 et 2 de l'activation lymphocytaire T), les cytokines induites lors de la maturation de la DC y jouent, elles aussi, un rôle, mais participent notamment à la polarisation lymphocytaire. Ainsi plusieurs groupes ont montré que lorsque différents TLR étaient engagés sur la DC, des profils cytokiniques distincts étaient induits, entraînant une polarisation Th1 ou Th2. Généralement, la balance IL-12/IL-10 reflète le type de réponse Th engendrée ; l'IL-12 étant une cytokine pro-Th1 et l'IL-10 pro-Th2 (H. Qi *et al.*, 2003). Cependant, il est à noter que la production d'IL-10 et de TGF- β est impliquée dans la génération de lymphocyte T régulateurs (Baratelli *et al.*, 2010; Lohr *et al.*, 2006). De plus les IFN, l'IL-18, l'IL-23, l'IL-27, ICAM-1 et les ligands de CCR5 induisent des réponses Th1 tandis que l'IL-4, MCP-1, OX40L, leTGF- β , PGE₂ et les ligands de CCR2 induisent des réponses de type Th2 (Kapsenberg, 2003).

La plupart des études montre que les ligands de TLR induisent majoritairement des réponses Th1, alors qu'en absence de ligands de TLR, des réponses Th2 sont générées (Netea *et al.*, 2005). Ainsi a-t-il été montré que les ligands du TLR-3, -4, -5, -8, et -9 induisaient des réponses de type Th1, par la production d'IL-12 (de Jong *et al.*, 2002; Re & Strominger, 2001; Kapsenberg, 2003) (ainsi que d'IFN par les TLR-3, -8, et -9) ; le TLR-7 serait, lui aussi, impliqué dans les réponses Th1 par la production d'IFN pour les pDC, et via la production d'IL-12 pour les DC myéloïdes (Dabbagh & D. B. Lewis, 2003). Les études sur le TLR-1, -2

et -6 sont assez controversées. Cependant, les ligands du TLR-2 en monomère, ou en hétérodimères avec le TLR-1 ou -6, induisent des réponses Th2, de par l'absence d'IL-12 et la production d'IL-10 (Mazzoni & Segal, 2004). Il a aussi été montré que la signalisation via le TLR-2 peut induire des Treg par la production d'IL-10 (Sing *et al.*, 2002; S. Yamazaki *et al.*, 2011) favorisant une réponse Th2; il est possible que la sécrétion d'IL-10 agissent directement sur la DC de manière autocrine qui, en devenant ainsi tolérogène, permet la génération de Treg. La combinaison de plusieurs ligands de TLR, peut aussi induire des réponses Th2 (d' Ostiani *et al.*, 2000).

4. L'interleukine-12 (IL-12)

L'IL-12 est une cytokine ayant la particularité d'être composée de deux sous-unités, la p40 et la p35, formant un hétérodimère, IL-12p70, par liaison covalente (pont disulfure). Le récepteur de l'IL-12 (IL-12R) est composé, lui aussi, de deux chaînes l'IL-12R β 1, reconnaissant l'IL-12p40, et l'IL-12R β 2 reconnaissant l'IL-12p35 ou l'IL-12p70 entière. L'IL-12R β 1 est associée à Tyk2 (Tyrosine kinase 2), alors que l'IL-12R β 2 est associée à Jak2 (Janus kinase 2). La signalisation après activation du récepteur induit l'activation de plusieurs facteurs de transcription STAT, mais le principal est STAT4 (Trinchieri *et al.*, 2003). Cette cytokine est produite par les monocytes, les macrophages et les DC. Alors que l'IL-12p40 est sécrétée en excès faisant qu'on la retrouve sous forme de monomères, et est fortement inductible, l'IL-12p35 n'est retrouvée que sous la forme de l'hétérodimère, l'IL-12p70, et n'est pas très inductible. Il est décrit que la sous-unité p40 pourrait se dimériser, pour donner un homodimère de p40, ayant des actions antagonistes de l'IL-12 (X. Ma & Trinchieri, 2001). L'IL-12 est une cytokine inductrice d'IFN- γ par les lymphocytes T, les NK, et il a été montré sur plusieurs études qu'elle est nécessaire pour l'induction et le maintien des réponses Th1, notamment dans les réponses contre des bactéries, des champignons, des virus et parasites intracellulaires (Lyakh *et al.*, 2008), et donc dans les réponses cellulaires cytotoxiques. Mais il semble que l'IL-12 soit, dans certains cas, responsable du maintien des réponses Th1 uniquement (A. C. Mullen *et al.*, 2001). Le rôle essentiel de l'IL-12 dans l'établissement et/ou le maintien d'une réponse Th1 reste controversé. Ainsi, alors que dans certains cas la réponse immune Th1 nécessite uniquement l'action de l'IFN- γ , dans d'autres ce n'est que celle de l'IL-12 (X. Ma & Trinchieri, 2001). La production d'IL-12 est principalement causée par activation des TLR et d'autant plus lorsque plusieurs TLR sont activés (surtout lorsque les voies TRIF et Myd88 sont activées). L'IFN- γ et l'interaction CD40/CD40L peuvent aussi

augmenter la production d'IL-12 tandis que l'IL-10 et le TGF- β l'inhibent (X. Ma & Trinchieri, 2001).

Au niveau transcriptionnel, la p40 est principalement induite par le LPS et l'IFN- γ , et nécessite l'activité de la p38 MAPK, tandis qu'ERK et JNK l'inhibent. Le promoteur de la p40 contient un site de fixation de NF- κ B et un site *ets* (E-twenty six). Le site *ets* interagit avec un complexe comprenant, entre autre, *ets-2*, IRF-1, et NF- κ B (c-Rel) tandis que le site de NF- κ B interagit avec NF- κ B (p50/p65 et p50/c-Rel ; c-Rel semblant plus importante). Les facteurs de transcription de l'IL-12p35 ne sont pas réellement connus, mais le promoteur contiendrait un motif Sp1 (Specificity protein-1) (X. Ma & Trinchieri, 2001).

Récemment, trois nouvelles cytokines hétérodimériques ont été découvertes et font maintenant partis de la famille de l'IL-12. En effet, la sous-unité p40 de l'IL-12 peut aussi s'associer à la sous-unité p19 pour former l'IL-23, tandis que la sous-unité p35 peut s'associer à EBI3 (Epstein-Barr-virus-Induced-gene) pour former l'IL-35 (une cytokine inhibitrice produite par les Treg), et l'IL-27 est composée d'EBI3 et de la sous-unité p28 (M. Xu *et al.*, 2010).

5. Les cellules dendritiques tolérogènes

Même si les cellules dendritiques sont connues pour être immunogènes, elles ont aussi la capacité remarquable d'être tolérogènes. Dans ce cas, elles peuvent entraîner l'induction de lymphocytes T régulateurs ou la délétion/anergie des lymphocytes T effecteurs, participant ainsi, à l'établissement, et à la maintenance, d'un état de tolérance vis-à-vis de certains antigènes. Au niveau de la tolérance centrale, les DC thymiques semblent essentielles dans la sélection négative des thymocytes ; leur déplétion empêche la délétion clonale des thymocytes (Brockner *et al.*, 1997; McCaughy *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que ces DC pouvaient induire des Treg FoxP3⁺ (Watanabe *et al.*, 2005). Les DC semblent aussi impliquées dans la tolérance périphérique puisque une ablation des DC entraîne une autoimmunité, en « cassant » la tolérance au soi des lymphocytes T CD4⁺ (Ohnmacht *et al.*, 2009). Plus spécifiquement, la présence des cellules de Langerhans et des pDC seraient nécessaires à cette tolérance (Birnberg *et al.*, 2008). Les propriétés tolérogéniques des DC dépendent de plusieurs facteurs tels que leur état de maturation, l'exposition à des agents anti-inflammatoires et immunosuppresseurs, les stimuli microbiens perçus, et les signaux fournis par l'environnement (Manicassamy & Pulendran, 2011).

Il a été proposé que les DC immatures entraînent des réponses tolérogènes, contrairement aux DC matures, qui induisent des réponses immunogènes. Les DC immatures, exprimant de faibles niveaux de CMH II et de molécules de costimulation, induisent souvent l'anergie/délétion des lymphocytes T, ou l'expansion de lymphocytes T régulateurs *in vivo* (M. V. Dhodapkar *et al.*, 2001; Mahnke *et al.*, 2003). L'expression des molécules de costimulation semble importante dans la tolérance, puisque la sous-expression de CD40, CD80, ou CD86 et la surexpression de CTLA-4, sur les DC, les rend tolérogènes et peut empêcher l'apparition du rejet ou supprimer les maladies autoimmunes (X. Liang *et al.*, 2003; X. Zheng *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2005). Les stratégies s'employant à utiliser des DC autologues immatures pour l'établissement d'une tolérance en transplantation semblent prometteuses (Hill *et al.*, 2011). Les DC matures sont, quant à elles, considérées comme immunogéniques de par les hauts niveaux d'expression du CMH II et des molécules de costimulation présentes sur ces cellules. Cependant, dans certains cas, ces cellules peuvent induire des lymphocytes T régulateurs. Par exemple, lorsque l'interaction DC-DC médiée par l'E-cadhérine est cassée, les DC mûrissent (augmentation de l'expression du CMH II et des molécules de costimulation) mais ne sécrètent pas de cytokines proinflammatoires, dont notamment l'IL-12 (A. Jiang *et al.*, 2007). L'activation de la voie Wnt- β -catenin semble, ici, cruciale dans l'acquisition de propriétés tolérogènes. Ces DC produisent de l'IL-10, permettant d'induire des réponses tolérogènes. Il y a donc deux théories s'opposant, la première impliquant une association entre un état tolérogène et immature, et une autre associant un état tolérogène à un état semi-mature.

A l'état basal (*i.e.* sans infection ou inflammation), deux types de DC sont, à ce jour, connus pour avoir des propriétés tolérogènes : les pDC et les DC exprimant IDO. Les pDC peuvent induire des cellules T régulatrices, médier la tolérance des lymphocytes T spécifiques d'alloantigènes, et médier la tolérance orale (Hadeiba *et al.*, 2008; Ochando *et al.*, 2006; Goubier *et al.*, 2008). Les DC exprimant IDO sont CD103⁺, expriment le CCR6 et existent, *in vivo*, à l'état mature et immature (Munn *et al.*, 2002; Mellor & Munn, 2004). Les mécanismes de suppression impliquant IDO seront abordés dans la section **IV**. Les DC peuvent aussi être tolérogènes en fonction de l'environnement dans lequel elles résident. En effet, aux endroits exposés à l'environnement extérieur, les DC doivent maintenir un état de tolérance vis-à-vis des différents types de bactéries commensales et des antigènes du soi. Ainsi, les DC CD103⁺ des intestins et des poumons peuvent-elles induire des T régulateurs ou une anergie/délétion des lymphocytes T, tout comme les DC du foie, mais peuvent aussi induire des réponses

immunogènes après différents stimuli (Manicassamy & Pulendran, 2011). De même, dans les lieux immunoprivilégiés, tels que dans les yeux ou le système nerveux central, la plupart des DC sont tolérogènes. Enfin, il est à noter que, à l'état basal, des DC portant des antigènes migrent continuellement des tissus aux ganglions lymphatiques et permettent de conserver ou d'induire un état de tolérance vis-à-vis de ces antigènes (Hemmi *et al.*, 2001; F. P. Huang *et al.*, 2000). Les DC peuvent, par l'exposition à certaines molécules anti-inflammatoires et agents immunosuppresseurs, devenir tolérogènes (Hackstein & Thomson, 2004). Il a, par exemple, été montré que les DC générées *in vitro* en présence de vitamine A, de vitamine D, de prostaglandine E2, d'IDO (par infection avec un virus exprimant IDO), d'IL-10, de TGF- β , de rétinoïdes, ou de glucocorticoïdes, présentaient des propriétés tolérogéniques qui pouvaient supprimer l'apparition de maladies autoimmunes (Manicassamy & Pulendran, 2011). La surexpression de ces molécules dans les cellules dendritiques *in vitro*, puis leur réintroduction *in vivo* semble efficace pour prévenir l'apparition du rejet allogénique (Coates *et al.*, 2001).

Plusieurs récepteurs présents sur les cellules dendritiques peuvent les rendre tolérogènes. Dans certains cas, les récepteurs de l'immunité innée (*i.e.* TLR, CLR) sont impliqués dans la conversion en DC tolérogènes, mais peuvent aussi rendre les DC tolérogènes immunogènes (Manicassamy & Pulendran, 2011). Dans le cas où le TLR-2 active les DC en DC tolérogènes, il semble que cet état soit dû à l'induction, via ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), des enzymes métabolisant l'acide rétinoïque, RALDH1 et 2 (RetinAL DeHydrogenases) produisant de l'acide rétinoïque, ce qui entraîne l'émergence de lymphocytes T régulateurs (Manicassamy *et al.*, 2009). Lorsque le récepteur de Fc CD32 (Fc γ RIIB), ainsi que les récepteurs ILT3 et ILT4 (Imunoglobulin-Like Transcript ; reconnaissent les CMH de classe I), sont activés, ils induisent l'acquisition de propriétés tolérogènes et permettent l'expansion de lymphocytes T régulateurs (Desai *et al.*, 2007; Manavalan *et al.*, 2003; Brenk *et al.*, 2009). Enfin, un récepteur à activité tyrosine kinase, MerTK (Mer Tyrosine Kinase) est impliqué dans la tolérance induite par les cellules apoptotiques en empêchant l'activation et la maturation des DC (Wallet *et al.*, 2008), en partie par l'expression de SOCS1 et 3 qui inhibent la signalisation via STAT, et donc la sécrétion de cytokines proinflammatoires. Il est important de noter que la coopération des DC avec d'autres cellules, tels que les macrophages, les Treg, les iNKT (invariant Natural Killer T cells), voire même des cellules non hématopoïétiques, peut rendre les DC tolérogènes ou les maintenir tolérogènes (Manicassamy & Pulendran, 2011).

L'importance des DC dans l'établissement, et le maintien, d'une tolérance en transplantation est démontrée, puisque les différents traitements inducteurs de tolérance développés dans notre laboratoire, tels que la transfusion du sang du donneur (DST), l'utilisation de LF15-0195 (un analogue de la déoxyspergualine), de CD40Ig (molécule de fusion contenant le CD40 avec le partie Fc d'une Ig), ou d'anticorps anti-classe II du donneur, semblent dépendants de l'activité des DC (Josien *et al.*, 1998; Chiffolleau, Bériou, Dutartre, Usal, J.-P. Soulillou & M. C. Cuturi, 2002b; X. L. Li *et al.*, 2010; Degauque *et al.*, 2006).

III. Métabolisme des acides aminés soufrés

A. Le soufre

Le soufre est un élément chimique essentiel pour tous les êtres vivants. La preuve en est que, dans une cellule humaine, une molécule sur six contient un atome de soufre (hormis l'eau), tandis qu'une protéine contient, en moyenne, onze atomes de soufre (Freitas, 1999; Glover, 2003). Cet atome, créant une fonction thiol (R-SH), permet aux protéines de prendre un repliement caractéristique, et leur donne une structure tridimensionnelle en accord avec leur fonction en créant des ponts disulfures après liaison entre deux fonctions thiols (R-SS-R), que ce soit au sein d'une même protéine, ou entre des polypeptides distincts. Au niveau enzymatique, la fonction thiol est très importante, puisqu'elle sert généralement de catalyseur au niveau du site actif des enzymes (Lehninger, 2000). Le soufre se distingue aussi par sa capacité à pouvoir être aussi bien un oxydant qu'un réducteur au niveau redox, ce qui fait de lui un atome de choix pour la régulation des potentiels d'oxydoréduction et pour la détoxification (Greenwood, 1997). Physiologiquement, les propriétés du soufre sont exploitées au travers des acides α -aminés soufrés protéinogènes (désignés ci-après acides aminés soufrés), la méthionine et la cystéine, qui sont les précurseurs des diverses biomolécules soufrées.

B. Les acides aminés soufrés

Contrairement aux bactéries et aux plantes, les mammifères ne peuvent pas anaboliser les sulfates, source majoritaire inorganique de soufre, pour effectuer la biosynthèse de leurs acides aminés soufrés. Ils doivent donc inclure dans leur alimentation une source de soufre organique qu'ils pourront cataboliser, notamment à partir de protéines, contenant de la méthionine et de la cystéine, qui seront hydrolysées. La méthionine est considérée comme un acide aminé essentiel, car non synthétisable par les cellules, contrairement à la cystéine qui est synthétisée à partir de la méthionine. Cela démontre l'importance d'un apport alimentaire riche en méthionine dans le cas où celui-ci est pauvre en cystéine (J. T. Brosnan & M. E. Brosnan, 2006).

C. Le métabolisme de la méthionine

Le métabolisme de la méthionine se déroule en trois phases : la transméthylation (catabolisme de la méthionine), la reméthylation (anabolisme de la méthionine) et la

transsulfuration (anabolisme de la cystéine). Cela permet la biosynthèse de cystéine puis la production endogène de molécules soufrées. Il est à noter que, la plupart des études qui sont synthétisées ci-dessous ont été effectuées sur le foie, organe majeur du métabolisme.

1. La transméthylation

En obtenant de la méthionine par l'alimentation, celle-ci devient disponible pour la production des protéines, ou s'engage dans la transméthylation. Cette phase consiste en un transfert du méthyle de la méthionine vers un accepteur, générant de l'homocystéine. La première étape de cette voie forme de la S-adenosylméthionine (SAM), une réaction catalysée par plusieurs isoformes de la méthionine adénosyl transférase (MAT ; EC 2.5.1.6) qui transfèrent l'adénosyl de l'ATP sur le soufre de la méthionine (Stipanuk, 1986). L'ion sulfonium généré rend le méthyle qui lui est lié très réactif, ce qui va entraîner la méthylation d'une molécule accepteuse par action de différentes méthyltransférases spécifiques, et va dégrader la SAM en S-adenosylhomocystéine (SAH). Enfin, la dernière étape de la transméthylation consiste en une conversion de la SAH en homocystéine par action de l'adenosylhomocystéinase (EC 3.3.1.1) en libérant de l'adénosine.

2. La reméthylation

En cas de déficit en méthionine, ce processus consiste à faire l'opération inverse de la transméthylation, c'est-à-dire à convertir l'homocystéine en méthionine. La reméthylation peut être effectuée de deux manières différentes. La première peut être effectuée partout dans l'organisme étant donnée la grande distribution de cette enzyme dans les tissus. L'homocystéine va être convertie par la méthionine synthase (MS; EC 2.1.1.13) à travers une réaction enzymatique dite « ping-pong » (R. V. Banerjee *et al.*, 1990). La MS nécessite la méthylcobalamine (MeB12) comme cofacteur pour former de la méthionine à partir d'homocystéine. Pour cela la MS va convertir le méthyl-tétrahydrofolate (mTHF) en tétrahydrofolate (THF), ce qui va permettre la méthylation de la vitamine B12 en MeB12, et va entraîner la conversion de l'homocystéine en méthionine. La deuxième réaction possible va être effectuée par la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHM ; EC 2.1.1.5) mais sera limitée au foie. Cette enzyme va transférer un méthyle de la bétaine sur l'homocystéine entraînant la production de diméthylglycine et de méthionine. La transméthylation et la reméthylation constituent le cycle de la méthionine.

3. La transsulfuration

A terme, cette voie permet de convertir l'homocystéine en cystéine. Tout d'abord, l'homocystéine est condensée avec la sérine via la cystathionine- β -synthase (CBS ; EC 4.2.1.22) pour former de la cystathionine. Cette enzyme est dépendante du pyridoxal phosphate en tant que cofacteur, elle contient un hème sur lequel peuvent se fixer le NO et le CO afin de l'inhiber, et peut être allostériquement activée par la SAM (Kamoun, 2004). Enfin, la dernière étape est catalysée par la cystathionine- γ -lyase, ou cystathionase (CSE ; EC 4.4.1.1), une enzyme dépendante elle-aussi du pyridoxal phosphate, qui convertit la cystathionine en cystéine tout en générant de l' α -kétobutyrate et de l'ammonium. Cette voie joue un rôle central dans le métabolisme des acides aminés soufrés car la cystéine est le substrat limitant de plusieurs biomolécules aux fonctions physiologiques importantes (Stipanuk, 1986) (cf. **Figure 9**).

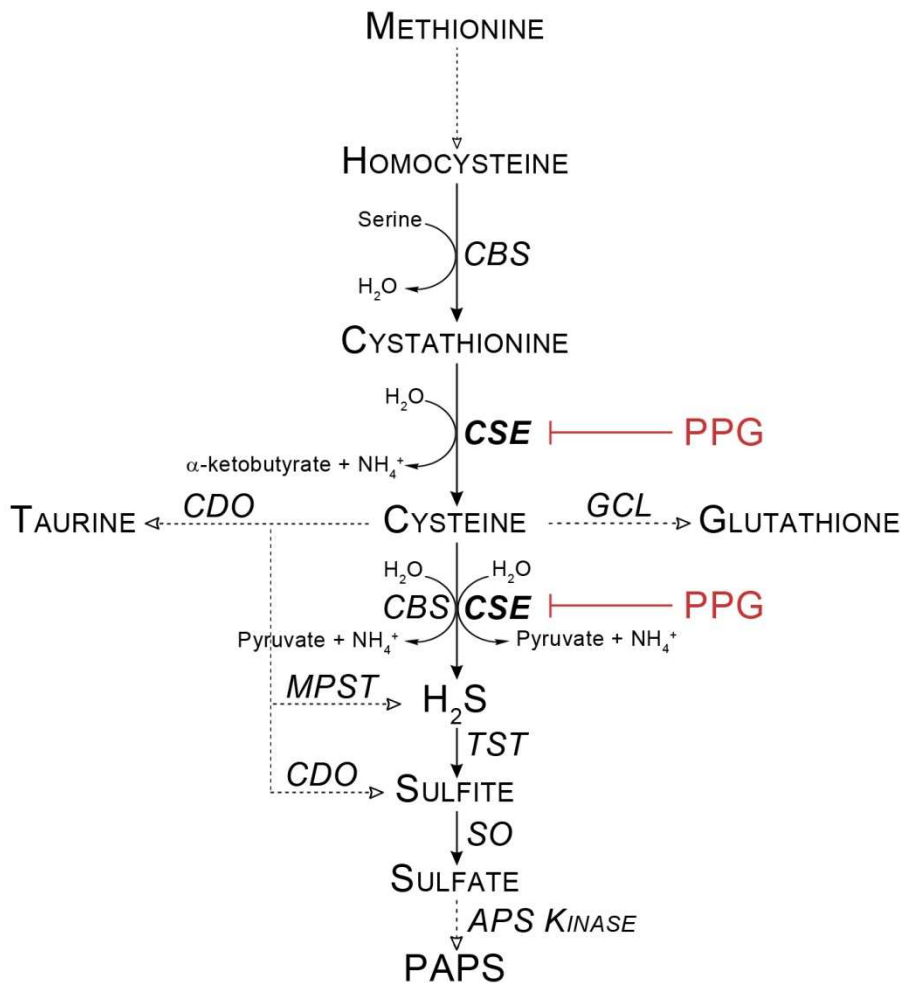


Figure 9 : Métabolisme de la cystéine.

PPG : Propargylglycine.

L'importance de la transsulfuration a été démontrée dans plusieurs études. Ainsi lorsque la CBS ou la CSE ont une faible activité, ou lorsqu'elles sont invalidées, les niveaux d'homocystéine, ou de cystathionine, respectivement, sont augmentés dans le plasma et dans l'urine (Shin & Linkswiler, 1974; Sturman *et al.*, 1970). L'hyperhomocystéinémie, caractérisée par des niveaux élevés d'homocystéine dans le sang, est dépendante d'un défaut de l'activité de la CBS. Elle est associée à diverses pathologies telles que l'athérosclérose, des fibroses des poumons, du foie, et du cœur, ou à des désordres de l'homéostasie lipidique ; la capacité de l'homocystéine à induire un stress oxydatif en serait probablement la cause, même si un lien avec la cystéinémie (*i.e.* concentration en cystéine dans le sang) est aussi proposé (D. Zhang *et al.*, 2009; Hamelet, Maurin, *et al.*, 2007; Hamelet *et al.*, 2008; Raaf *et al.*, 2011; Hamelet, Demuth, *et al.*, 2007; Nuño-Ayala *et al.*, 2010). Les animaux déficients en CBS ou en CSE nécessitent des suppléments en cystéine afin de survivre (Akahoshi *et al.*, 2008; I. Ishii *et al.*, 2010). De même, l'utilisation d'un inhibiteur irréversible de la CSE, la propargylglycine (PPG), bloque la production glutathion (voir la section **III. D. 1**) aboutissant à une toxicité neuronale, ce qui explique la nécessité d'une supplémentation en cystéine chez les animaux déficients en CBS ou en CSE (Diwakar & Ravindranath, 2007). Ces enzymes ont une distribution assez variée dans le corps, mais toutes deux sont fortement exprimées dans le foie, les reins et le pancréas (Stipanuk & Ueki, 2010). Il est intéressant de noter que les personnes atteintes de trisomie 21 surexpriment la CBS, car cette enzyme est codée par le chromosome 21 (Kamoun, 2001).

L'invalidation de la CSE entraîne la prolifération des cellules musculaires lisses et induit de l'hypertension, tandis que son activité semble impliquée dans la fonction des îlots pancréatiques (G. Yang *et al.*, 2010; G. Yang *et al.*, 2008; G. Yang, G. Tang, *et al.*, 2011). La CSE semble importante pour le maintien de l'homéostasie redox puisque la surexpression de la CSE est associée à une baisse des ROS (K. Suzuki *et al.*, 2011), mais peut aussi induire l'apoptose de lignées d'îlots pancréatiques via un mécanisme impliquant un stress du réticulum endoplasmique (G. Yang *et al.*, 2007). La surexpression de la CSE empêche aussi l'apparition des lésions induites par ischémie-reperfusion (Calvert, Elston, *et al.*, 2010). Chez l'homme, les facteurs de transcription de la CSE restent assez peu connus, cependant le NR1H4 (Nuclear Receptor subfamily 1 group H member 4, ou Farnesoid X Receptor), le NR4A1, et Sp1 ont été identifiés depuis peu (Renga *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2011; G. Yang, Pei, *et al.*, 2011). Il a été montré qu'une surexpression de la CSE était induite après activation de p38 et JNK, lorsque le glutathion était déplété (Kandil *et al.*, 2010), ou par le NO sur des

cellules musculaires lisses (Kamoun, 2004). Le rôle de la cystéine et de la CSE dans la réponse immune sera abordé dans la section **IV**.

Considérées comme intracellulaires, une étude a pourtant montré que la CSE et la CBS pouvaient être sécrétées et actives dans le milieu extracellulaire (Bearden *et al.*, 2010). Récemment deux nouveaux métabolites découverts, l'homolanthionine et la lanthionine, semblent être produits *in vitro* et *in vivo* par la CBS et la CSE, mais leurs implications physiopathologiques restent à être démontrées (Singh *et al.*, 2009; Chiku *et al.*, 2009).

D. Le devenir de la cystéine

A moins d'être utilisée pour la production des protéines, la cystéine obtenue via transsulfuration pourra s'engager dans diverses voies : la biosynthèse de glutathion, la formation de coenzyme A (cette étape ne sera pas abordée), la voie du cystéine sulfinat, la production de sulfure d'hydrogène ou la biosynthèse du donneur universel de soufre.

1. La biosynthèse de glutathion (GSH)

Cette réaction se déroule en deux étapes dépendantes d'ATP. La cystéine glutamate ligase (CGL ; EC 6.3.2.2) catalyse la condensation de cystéine et de glutamate pour donner de la γ -glutamylcystéine. Cette étape est la réaction limitante à la production de glutathion. Puis la glycine est condensée avec la γ -glutamylcystéine par action de la glutathion synthétase (GS ; EC 6.3.2.3).

Le glutathion est important pour la détoxification de certaines molécules et pour son activité antioxydante (I. Rahman & MacNee, 2000). C'est la molécule antioxydante la plus représentée dans l'organisme. Elle joue donc un rôle central dans le maintien du potentiel redox intracellulaire et extracellulaire, et est liée à diverses pathologies impliquant un déséquilibre du potentiel redox (*e.g.* maladies d'Alzheimer, de Parkinson,...) (J. B. Schulz, Lindenau, *et al.*, 2000). Les facteurs de transcription responsables de l'inflammation sont majoritairement dépendants du stress oxydatif. Le glutathion, qui est antioxydant, est donc impliqué dans l'activité de ces facteurs, et dans l'inflammation (I. Rahman & MacNee, 2000). Le rôle du glutathion dans la réponse immune sera abordé dans la section **IV**.

2. La voie du cystéine sulfinat

La voie du cystéine sulfinat aboutit à la production de taurine ou de sulfite. La première étape est commune, elle consiste en une oxydation de la cystéine en cystéine

sulfinate par action de la cystéine dioxygénase (CDO ; EC 1.13.11.20). Ensuite le cystéine sulfinate peut être converti en hypotaurine par action de la cystéine sulfinate décarboxylase (CSD ; EC 4.1.1.29) qui formera alors de la taurine (les mécanismes de la transition hypotaurine vers taurine restent à être déterminés), ou le cystéine sulfinate sera converti en β -sulfinyl pyruvate par la cystéine sulfinate aminotransférase (CSAT ; EC 2.6.1) et libèrera spontanément du sulfite et du pyruvate.

3. La production de sulfure d'hydrogène (H_2S)

Le sulfure d'hydrogène peut être produit de deux manières différentes. La première fait intervenir la cystéine aminotransférase (CAT ; EC 2.6.1.3), cette enzyme utilise la cystéine avec de l'oxoglutarate pour former du 3-mercaptopyruvate et du glutamate. Le 3-mercaptopyruvate est ensuite utilisé par la 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST ; EC 2.8.1.2) pour former du sulfure d'hydrogène et du pyruvate. La deuxième fait intervenir les mêmes enzymes que celles de la transsulfuration, c'est-à-dire la CSE et la CBS. La cystéine sera alors directement dégradée en sulfure d'hydrogène, en pyruvate et en ammonium, par action de l'une ou l'autre de ces deux enzymes.

Précédemment connu pour avoir l'odeur caractéristique d'œufs pourris et pour être toxique en inhibant le cytochrome c, le sulfure d'hydrogène est le troisième gasotransmetteur découvert, au même titre que le NO et le CO (Gadalla & Snyder, 2010). Les membres de cette famille sont de petites molécules de gaz qui sont perméables aux membranes, sont générés (et régulés) de manière endogène par des enzymes, et ont des fonctions physiologiques (à des concentrations particulières) médiées, ou non, par un/des second(s) messenger(s).

Il est décrit que dans le cerveau, la majorité de la production de H_2S est dépendante de l'activité de la CBS alors qu'en périphérie, c'est la CSE qui en est majoritairement responsable (Abe & H. Kimura, 1996). Cette molécule a des propriétés antioxydantes et pourrait contrôler les concentrations de calcium et le pH dans le système nerveux central (L.-F. Hu *et al.*, 2011). La plupart des études ayant observé des effets physiologiques sur les animaux invalidés pour la CSE décrits précédemment, ou après utilisation du PPG, l'ont attribué au sulfure d'hydrogène. L'utilisation de donneurs de sulfure d'hydrogène, tel que le NaHS (hydrosulfide de sodium), ont permis, dans ces cas d'induire l'effet inverse d'une inhibition de la CSE (ou de la CBS dans le cerveau), mettant en exergue son rôle. Ainsi ce gaz a-t-il des actions sur la vasodilatation, l'ischémie-reperfusion, la nociception et sur la potentialisation à long-terme. Le H_2S a aussi un rôle dans l'inflammation, mais des rôles anti-

et pro-inflammatoires lui sont attribués (G. Yang *et al.*, 2008; Zanardo *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006; Zhi *et al.*, 2007; Bhatia, Sidhapuriwala, *et al.*, 2005; Collin *et al.*, 2005; Bhatia, F. L. Wong, *et al.*, 2005; Calvert, Elston, *et al.*, 2010; Eto *et al.*, 2002). Même si les cibles du H₂S ne sont pas encore bien connues, il semble que les canaux potassiques ATP-dépendants soient activés et soient responsables de ses effets anti-apoptotiques, anti-nociceptifs, anti-inflammatoires, vasodilatateur, protecteurs de l'ischémie-reperfusion, et empêchant la sécrétion d'insuline (G. Tang *et al.*, 2010). De même, le H₂S induirait une augmentation de l'activité des récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate), responsable de son implication dans la potentialisation à long terme (Eto *et al.*, 2002). Le H₂S agirait par sulfhydratation, en se liant aux cystéines libres des protéines (Mustafa *et al.*, 2009).

Malgré le grand nombre d'étude lui attribuant plusieurs rôles physiologiques, les méthodes de dosages de sulfure d'hydrogène libre restent très peu sensibles, de plus ce gaz à sans doute un rôle très local de par sa forte réactivité et de sa faible demi-vie (Calvert, Coetzee, *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2009). Ainsi voit-on dans la littérature des divergences importantes dans les concentrations plasmatiques de sulfure d'hydrogène qui peuvent aller du nM à des centaines de µM. De plus lorsque des donneurs de H₂S sont utilisés (souvent à des quantités supérieures à 10µM), chacun peut se demander si l'effet observé est réellement spécifique du gaz, ou s'il est dû à son fort pouvoir réducteur puisque les différentes études n'évaluent, généralement, pas l'effet d'autres molécules réductrices. De même, de par sa forte réactivité, on peut raisonnablement se demander si l'ajout de sulfure d'hydrogène en exogène (hors de la cellule) ne pourrait pas modifier la structure des molécules présentes à la membrane sur la partie extracellulaire en les réduisant (au sens redox) (Moriarty-Craige & D. P. Jones, 2004), tandis qu'en conditions physiologiques, ce gaz est produit de manière endogène à l'intérieur de la cellule et doit probablement réagir avec les molécules intracellulaires de manière autocrine.

4. La biosynthèse du donneur universel de soufre

Le sulfure d'hydrogène issu de l'étape précédente est oxydé de manière non enzymatique par des composés héminiques en thiosulfate. Cette molécule est réduite par la thiosulfate sulfurtransférase (TST ; EC 2.8.1.3) en présence de glutathion en anion sulfure, sulfite et glutathion oxydé. Ces sulfites sont ensuite oxydés par la sulfite oxydase (SO ; EC 1.8.3.1) ce qui libère des sulfates (les sulfites issus de la voie du cystéine sulfinatentrent aussi dans cette réaction). Si ces sulfates ne sont pas excrétés par l'urine, ils sont métabolisés

en PAPS (3'-PhosphoAdénosine-5'-PhosphoSulfate) par deux isoformes d'une enzyme bifonctionnelle, la PAPS synthétase, qui a une activité ATP sulfurylase (EC 2.7.7.4) et APS kinase (EC 2.7.1.25). Cette réaction se déroule donc en deux étapes : le sulfate est se lie à de l'ATP via l'activité sulfurylase de l'enzyme, formant de l'adénosine 5'-phosphosulfate (APS), puis l'APS est phosphorylée par une autre molécule d'ATP, via l'activité kinase de l'enzyme, en PAPS. La PAPS sera dès lors utilisée en tant que coenzyme de sulfotransférases afin de permettre la sulfatation de diverses biomolécules (*e.g.* glycoprotéines, protéoglycanes, ...).

IV. Immunométabolisme

« On est ce que l'on mange » : cette expression est aussi légitime pour le système immunitaire qu'elle ne l'est pour d'autres domaines ; les leucocytes nécessitant des nutriments en quantités spécifiques pour être pleinement efficaces (Satyaraj, 2011). Depuis la découverte des cellules régulatrices modulant la réponse immune, les recherches alliant le métabolisme et l'immunité connaissent un essor important, de par les divers mécanismes suppresseurs utilisés par les cellules régulatrices impliquant une modification locale du métabolisme. Nous décrirons, ici, les rôles du métabolisme (et de l'homéostasie) du tryptophane, de l'arginine, de l'hème et de la cystéine dans la réponse immune, et plus particulièrement dans les mécanismes de suppression impliqués dans la tolérance en transplantation.

A. Métabolisme du tryptophane

Chez les mammifères deux enzymes peuvent cataboliser le tryptophane par la voie de la kynurénine : l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO). La réaction catalysée par ces deux enzymes est identique, et représente l'étape limitante à la production de kynurénine. Cependant l'expression de la TDO est confinée au foie, contrairement à IDO que l'on peut retrouver un peu partout, et plus particulièrement dans les CPA (Mellor & Munn, 2004). Sous des conditions particulières, les cellules de l'immunité exprimant IDO peuvent être des MoDC, des pDC, des macrophages dérivés de monocytes, ou les granulocytes (Katz *et al.*, 2008; Mellor & Munn, 2004), mais aussi les cellules endothéliales (Thebault *et al.*, 2007). Le rôle d'IDO dans la tolérance a été démontré dans la tolérance allogénique fœto-maternelle sur des souris traitées avec un inhibiteur spécifique d'IDO, le 1MT (1-Méthyl Tryptophane) (Munn *et al.*, 1998). Chez les CPA, IDO peut être induite par l'IFN- γ produits par les lymphocytes T, sans doute participant à un feedback négatif limitant la réponse des lymphocytes T activés, mais aussi par l'interaction de B7 avec CTLA-4 présents sur les lymphocytes T régulateurs. Les métabolites de la réaction catalysée par IDO sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, mais aussi de dévier la réponse immune vers un profil Th2 (Platten *et al.*, 2005). Il semble aussi que la privation de tryptophane soit importante dans l'effet immunosuppresseur médié par cette enzyme (L. Zhu *et al.*, 2006). L'expression d'IDO par les DC peut induire la différenciation de lymphocytes T CD4⁺, en lymphocytes T régulateurs exprimant FoxP3 (Fallarino & Grohmann, 2011).

Plusieurs études démontrent l'importance d'IDO dans la tolérance en transplantation. Dans notre laboratoire, en transplantation allogénique rénale chez le rat, lorsque la tolérance était induite par un anti-CD28 bloquant, l'activité d'IDO semblait importante dans le maintien de la tolérance puisque l'utilisation du 1MT l'abrogeait (Haspot *et al.*, 2005). Dans un autre modèle de tolérance en transplantation cardiaque par utilisation du CD40Ig, le blocage de l'IFN- γ ou d'IDO entraînait le rejet (Guillonnet *et al.*, 2007). De plus lorsque le transfert de lymphocytes T régulateurs permet l'induction de tolérance en transplantation de cœur, l'IFN- γ et IDO sont responsables du maintien de la tolérance (Thebault *et al.*, 2007). Enfin l'infection de transplants allogénique de cœur avec un virus exprimant IDO est capable de retarder le rejet aigu chez le rat (J. Li *et al.*, 2007).

B. Métabolisme de l'hème

Trois isoformes dégradant l'hème sont identifiées à ce jour : HO-1, HO-2 et HO-3. Ces enzymes catalysent la dégradation de l'hème en biliverdine, Fe^{2+} et en CO (l'un des trois gasotransmetteurs). HO-1 est induite par plusieurs stimuli de stress tels que l'hème, les métaux lourds, des cytokines inflammatoires et le NO (Ryter *et al.*, 2006). L'activité de HO-1 est décrite comme cytoprotectrice dans des conditions inflammatoires délétères (X.-D. Shen *et al.*, 2002), mais semble aussi empêcher l'apparition du rejet en transplantation allogénique (Braudeau *et al.*, 2004). Ainsi des travaux ont-ils montré que l'activité suppressive des lymphocytes T $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{FoxP3}^+$ était dépendante de l'expression de HO-1 par les DC (J. F. George *et al.*, 2008). Dans notre laboratoire, des cellules dendritiques tolérogènes générées *in vitro* surexpriment HO-1, et inhibent la prolifération de lymphocytes T allogéniques par un mécanisme impliquant HO-1. De plus, leur transfert prévient le rejet via l'activité de HO-1 (A. Moreau *et al.*, 2009). Les mécanismes d'action sont encore à l'étude, mais il semble que les métabolites que sont le CO, ou le Fe^{2+} , induisent le développement de DC tolérogènes, tandis que, *in vivo*, la biliverdine peut induire la tolérance à des allogreffes d'ilôts pancréatiques (Blancou & Anegon, 2010). Cependant, il serait aussi possible que l'activité de HO-1 entraîne une privation d'hème, qui est un facteur important dans l'activité de diverses enzymes, telles que celle de la NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate) oxydase.

C. Métabolisme de l'arginine

Deux enzymes sont principalement impliquées dans le catabolisme de l'arginine : la NOS (Nitric Oxide Synthase) et l'arginase. Trois isoformes de NOS existent à ce jour : iNOS

(inducible NOS), eNOS (endothelial NOS), et nNOS (neuronal NOS). Ces enzymes catalysent la dégradation de l'arginine en NO (l'un des trois gasotransmetteurs) et en citrulline. Plusieurs travaux étudient l'implication d'iNOS en transplantation puisqu'elle est surexprimée lors des rejets aigus, cependant l'inhibition de cette enzyme ou son invalidation donne des résultats opposés sur le devenir des transplants. Le NO étant fortement oxydant, et formant des peroxynitrites toxiques, il semble plutôt délétère pour les tissus transplantés lors du rejet aigu, alors qu'il semblerait que l'expression d'iNOS soit bénéfique contre le rejet chronique (Pieper & Roza, 2008). Plusieurs auteurs démontrent une activité immunosuppressive du NO sur les lymphocytes T. Ainsi, le NO empêche-t-il la signalisation via l'IL-2R et empêche donc la prolifération des lymphocytes T, tandis que sous de fortes concentrations il peut induire leur apoptose (Bronte *et al.*, 2003). Il a aussi été montré que le NO empêche la production d'IL-12 par les macrophages et que l'invalidation d'iNOS induit une réponse Th1 exacerbée (F. P. Huang *et al.*, 1998; X.-qing Wei *et al.*, 1995). Dans notre laboratoire, nous avons démontré que l'activité suppressive des MDSC est en partie dépendante de l'activité d'iNOS, et était nécessaire dans un modèle de tolérance en transplantation allogénique de rein chez le rat (Dugast *et al.*, 2008).

Alors qu'iNOS serait induite par les cytokines de type Th1, l'arginase 1 serait, quant à elle, induite par les cytokines de type Th2 (Rodríguez & A. C. Ochoa, 2008). L'arginase catalyse la dégradation de l'arginine en ornithine et en urée. Il existe deux isoformes de cette enzyme la 1 et la 2. Les propriétés immunosuppressives de l'arginase ont été démontrées lorsque des macrophages exprimant fortement cette enzyme étaient capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T. Les auteurs ont alors remarqué que le milieu était appauvri en arginine, et que l'effet suppresseur était réversé par ajout de cet acide aminé (J. T. Kung *et al.*, 1977). En effet, les lymphocytes T (et principalement les CD8⁺) nécessitent la présence d'arginine afin : d'exprimer le CD3 et le CD8, de proliférer, et de développer une réponse mémoire (J. B. Ochoa *et al.*, 2001). Dans une récente étude, les auteurs ont montré que des MDSC générées *in vitro* exercent leur activité suppressive via l'arginase 1, et que ces cellules étaient capables d'empêcher la maladie du greffon contre l'hôte après greffe de moelle osseuse allogénique par un mécanisme impliquant l'arginase 1, via une privation de l'arginine (Highfill *et al.*, 2010).

D. Le métabolisme du glutathion et de la cystéine, et leur homéostasie

1. Le potentiel redox

Les potentiels redox, influençant la structure et la fonction des macromolécules, sont différents aux niveaux cytoplasmique (*i.e.* réduit) et extracellulaire (*i.e.* oxydé). Les principaux tampons redox sont le GSH, la cystéine (Cys), et la thioredoxine (Trx), avec leur équivalents oxydés la GSSG, la cystine (Cys₂) et la thioredoxine oxydée (Trx-S₂). Quantitativement, le GSH/GSSG est le tampon intracellulaire majoritaire (0,5 à 10 mM ; contre 80 à 200 μM pour la Cys/Cys₂) et il est principalement sous forme réduite. Son potentiel varie de -260mV à -230mV lorsque les cellules prolifèrent, de -220mV à -190mV (*i.e.* plus oxydé) lorsque les cellules sont en différenciation ou qu'elles ont arrêté leur cycle cellulaire, et de -170mV à -150mV lorsqu'elles sont en apoptose. En extracellulaire le couple Cys/Cys₂ est quantitativement majoritaire (*e.g.* le plasma en contient de 110 à 225 μM ; contre 2 à 4 μM de GSH/GSSG) et est principalement présent sous forme oxydée (*i.e.* 75 à 95 % de ce couple est de la Cys₂). En parallèle des changements de potentiel redox du GSH/GSSG, lorsque les cellules prolifèrent le potentiel de la Cys/Cys₂ est inférieur à -80mV, il est proche de -80mV lorsque les cellules se différencient et varie de 0 à -80mV lorsque les cellules sont en apoptose (Z. Yan & R. Banerjee, 2010) (cf. **Figure 10**).

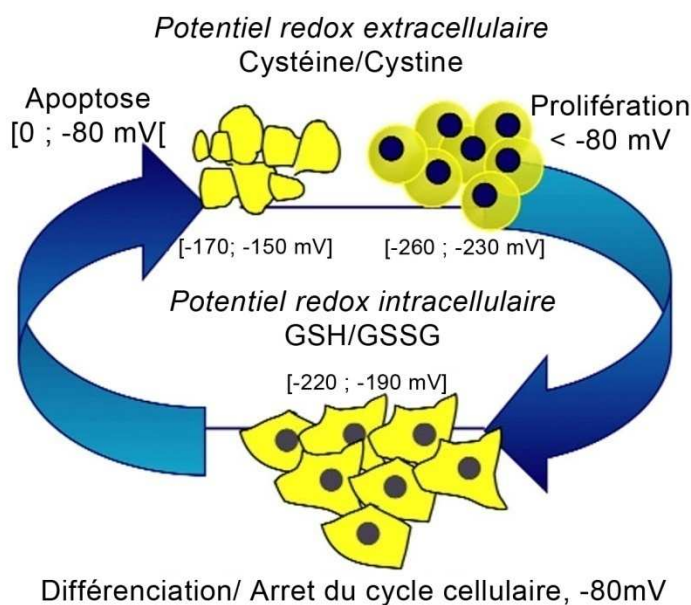


Figure 10 : Changement de potentiel redox en intra- et extra-cellulaire.

D'après Yan et Banerjee, *Biochemistry*, 2010.

2. Les lymphocytes T, la cystéine et le glutathion

Pour proliférer, et plus particulièrement pour synthétiser de l'ADN, les lymphocytes T naïfs activés nécessitent une quantité suffisante de glutathion intracellulaire (Suthanthiran *et al.*, 1990). Cependant, la synthèse de GSH est dépendante de la présence de cystéine, or, le lymphocyte T n'exprime pas la CSE, et ne peut pas importer la cystine, car il n'exprime pas la chaîne xCT du transporteur Xc^- (qui importe de la Cys_2 contre un export de glutamate) (Gmünder *et al.*, 1991; Eagle *et al.*, 1966; Bannai, 1984). Il semble donc dépendant de la présence de cystéine sous forme réduite afin de l'importer via ses transporteurs ASC (Alanine Serine Cysteine). Etant donné la très faible quantité de Cys dans le milieu extracellulaire, il s'avère que ce sont les CPA qui fournissent, aux lymphocytes T, la cystéine sous forme réduite. En utilisant des MoDC, une étude a montré que les DC relarguent de la Cys dans le milieu extracellulaire et que ce phénomène est augmenté par le LPS et le $TNF-\alpha$, ainsi que par les lymphocytes T lorsqu'ils reconnaissent un alloantigène spécifique (dans ce cas, les DC relarguaient, en plus de la Cys, de la Trx). Les DC semblaient importer la cystine via le Xc^- , et la réduisaient en intracellulaire pour la sécréter dans la foulée (Angelini *et al.*, 2002). Lors de l'initiation d'une réponse immune induite par immunisation, une étude a montré que les thiols (*i.e.* molécules contenant une fonction -SH) libres (*i.e.* sous forme réduite, en opposition aux thiols oxydés qui forment des ponts disulfures -S-S-) étaient fortement augmentés dans les organes lymphoïdes (Castellani *et al.*, 2008). Les auteurs ont alors identifiés que les CPA (*i.e.* lymphocytes B activés, macrophages et DC) étaient responsables de ce changement.

3. Mécanismes suppresseurs des cellules régulatrices

Récemment deux études ont remarqué que des cellules régulatrices supprimaient la prolifération des lymphocytes T par un mécanisme impliquant une privation de Cys. La première est celle de l'équipe de Banerjee, qui a étudié les lymphocytes T régulateurs $FoxP3^+$ (Z. Yan *et al.*, 2009). En induisant la prolifération de lymphocytes T naïfs par coculture avec des DC, les DC induisaient une augmentation de Cys extracellulaire, associée à une augmentation de la concentration de GSH intracellulaire sur les lymphocytes T. L'augmentation de l'accumulation de Cys extracellulaire (qui était $NF-\kappa B$ dépendant), et du GSH intracellulaire des lymphocytes T, était indépendante de l'activité de la CSE, mais nécessitait : l'activité du transporteur Xc^- (dont l'expression était induite sur les DC par contact T-DC), et, dans une moindre mesure, un export de GSH par la DC via MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1). La prolifération des lymphocytes T, l'augmentation de leur teneur en GSH intracellulaire, et l'accumulation de Cys extracellulaire étaient inhibés de

manière dose-dépendante de la quantité de lymphocytes T régulateurs ajoutés à la coculture. Réciproquement, l'ajout de Cys en extracellulaire permettait de lever efficacement l'inhibition induite par les lymphocytes T régulateurs. De manière intéressante, les auteurs montrent aussi que les thiols libres membranaires étaient très largement augmentés après coculture T-DC et que cette augmentation était empêchée par la présence des lymphocytes T régulateurs ; sans doute en conséquence de l'augmentation de cystéine réduite en milieu extracellulaire. Leur étude suivante a montré que les lymphocytes T régulateurs semblent, par contact CTLA-4/B7, empêcher l'expression de la γ -glutamylcystéine-synthetase et donc la production de GSH dans les DC. De plus les lymphocytes T régulateurs entraînent en compétition avec les lymphocytes T effecteurs pour l'import de la Cys extracellulaire (Z. Yan *et al.*, 2010).

La deuxième étude est celle de l'équipe d'Ostrand-Rosenberg qui a décrit un mécanisme suppresseur à peu près similaire, mais effectué par les MDSC (Srivastava *et al.*, 2010). Ils démontrent que les MDSC n'expriment pas le transporteur ASC (ni la CSE), contrairement aux DC et aux macrophages, et que celui-ci serait nécessaire à l'export extracellulaire de Cys pour la prolifération des lymphocytes T. Ainsi, en exprimant le transporteur Xc^- , les MDSC accumulent la cystine, et privent donc les DC et macrophages de la cystine extracellulaire par compétition. De cette manière, les DC ou macrophages ne pourraient pas fournir suffisamment de Cys aux lymphocytes T, tandis que les MDSC, étant déficientes en transporteur ASC, ne sécrètent pas de Cys (cf. **Figure 11**).

Les cellules régulatrices utilisent donc le potentiel redox et l'homéostasie de la cystéine et du glutathion comme mécanisme suppresseur ; la cystéine semblant importante pour la prolifération des lymphocytes T sous forme réduite, mais aussi sous forme oxydée (en extracellulaire) afin que les DC puissent l'importer, la réduire, puis la fournir aux lymphocytes T.

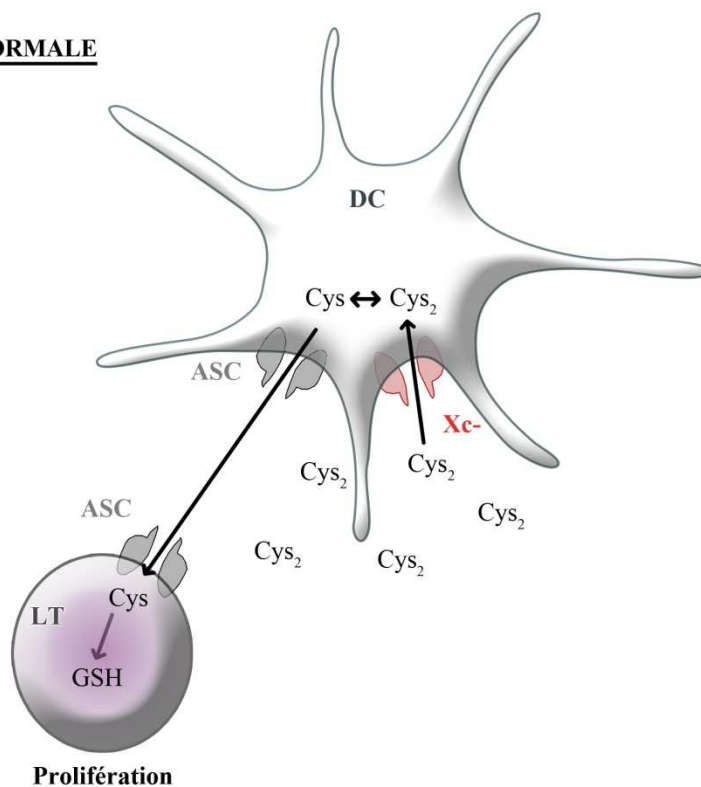
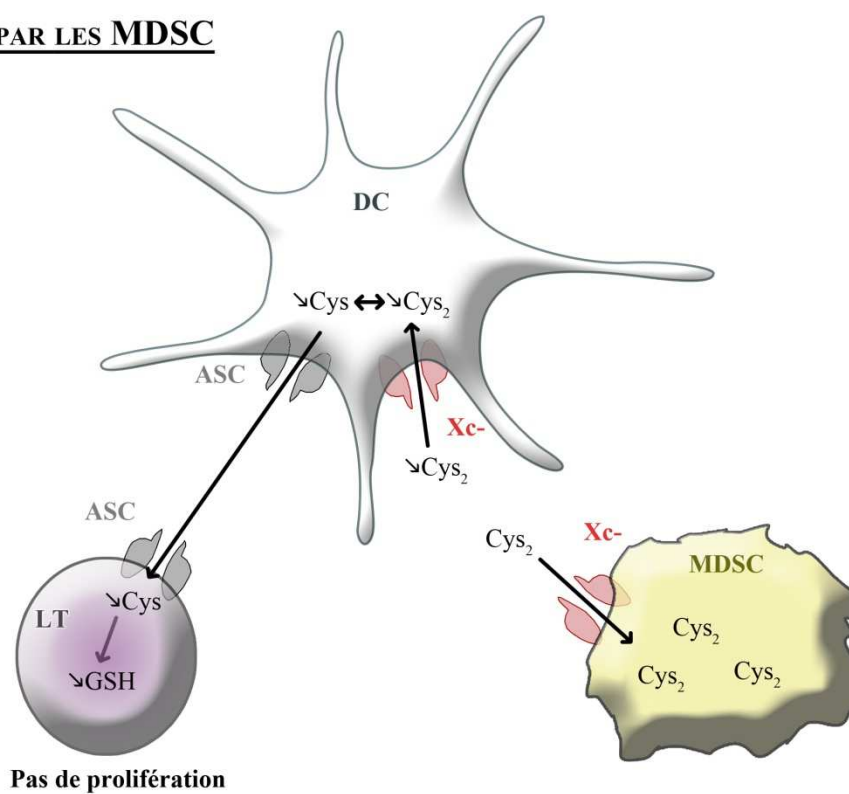
SITUATION NORMALE**SUPPRESSION PAR LES MDSC**

Figure 11: Mécanisme de suppression des MDSC par privation de cystine.

D'après Srivastava *et al.*, *Cancer Res.* 2010.

4. Autres effets impliquant le métabolisme et l'homéostasie de la cystéine et du glutathion

Chez des patients infectés par le HIV, des études montrent une forte baisse en méthionine et en cystéine plasmatique, de la quantité de glutathion intracellulaire des lymphocytes T, et de l'expression de la CSE dans le foie (Dröge *et al.*, 1988; Breitzkreutz *et al.*, 2000; Roederer *et al.*, 1991; Toohey, 2009). De plus ces patients ont des taux d'IL-12 très faibles (X. Ma & Montaner, 2000). De récents travaux indiquent que les molécules donneuses de glutathion seraient prometteuses afin de combler une éventuelle déficience en réponse Th1, induite par l'absence d'IL-12 chez les patients infectés par le HIV (Fraternale *et al.*, 2010; Fraternal *et al.*, 2011).

Le rôle du glutathion est extensivement étudié dans la physiologie des CPA. Ainsi, lorsque des DC sont traitées avec de l'ifosfamide, une équipe a montré que ces cellules étaient moins immunogènes par déplétion du glutathion intracellulaire (Kuppner *et al.*, 2003). D'autres travaux utilisant le diéthylmaléate (DEM) en tant qu'agent déplaçant le glutathion, montrent que l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, et de la sécrétion d'IL-12 induite par le LPS sur des DC, sont inhibées *in vitro* (H.-J. Kim *et al.*, 2007). En effectuant des réactions mixtes lymphocytaires avec ces DC, les réponses prolifératives étaient moins importantes. Lorsqu'ils ont utilisé le DEM *in vivo*, dans un modèle de DTH, la réponse était abrogée. Dans ces études, l'utilisation d'un donneur de cystéine, le NAC (N-Acétyl Cystéine), afin de réapprovisionner les cellules en GSH, permettait d'empêcher les effets observés après déplétion de GSH. Une autre étude a utilisé le DEM en transplantation, et a découvert qu'il retardait le rejet de cœurs allogéniques chez la souris. Ils ont aussi identifiés que l'activité de NF- κ B, induite par le LPS, de cellules endothéliales et de splénocytes, étaient inhibée par le traitement au DEM, et que cela interférait avec l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (G. J. McKenna *et al.*, 2006). Une autre étude montre que le NAC est capable de modifier le ratio GSH/GSSG vers un profil réduit, et que ceci augmente la production d'IL-12, mais pas celle de TNF- α par les macrophages (via une hausse de l'activité de NF- κ B, qui augmente l'expression de la sous-unité p40 de l'IL-12), et permet d'induire des réponses de types Th1 (K. Alam *et al.*, 2010). Cependant l'effet du NAC serait biphasique : alors que de faibles concentrations augmentent l'IL-12 et le ratio GSH/GSSG, de fortes concentrations ont l'effet inverse.

Pour ce qui est de la CSE, elle a été décrite comme étant faiblement exprimée par les leucocytes immatures, et il a été suggéré qu'elle représente un marqueur de l'immaturation des cellules hématopoïétiques (D. Link *et al.*, 1983). D'autre part, il est décrit que son expression est induite par le LPS sur les macrophages, tandis que le dexaméthasone (un glucocorticoïde immunosuppresseur) empêche son expression (X.-Y. Zhu *et al.*, 2010). Enfin, si cette enzyme n'est pas exprimée par les lymphocytes T, une récente étude a montré que la CSE était induite après activation, tout comme le transporteur Xc⁻ (Garg *et al.*, 2011).

V. Objectifs

La transplantation est devenue une thérapeutique de choix afin de restaurer une fonction physiologique défaillante. Paradoxalement, les immunosuppresseurs actuels contribuent à son efficacité, tout en la limitant, de par leurs effets néphrotoxiques et déprimant le système immunitaire de manière non-spécifique. Afin de s'affranchir de ces effets secondaires, l'objectif actuel est d'atteindre un état de tolérance spécifique vis-à-vis du transplant. Malgré l'élaboration, chez l'animal, de divers protocoles inducteurs de tolérance en transplantation, les différents mécanismes impliqués restent à être déterminés, afin de les rendre plus performants.

Le glutathion ayant un rôle dans la réponse immune, et le sulfure d'hydrogène y jouant potentiellement un rôle, nous nous sommes donc intéressés à l'implication de la CSE en transplantation. C'est pourquoi nous avons étudié son expression dans différents modèles de tolérance en transplantation cardiaque et rénale chez le rat, et d'évaluer l'impact de son inhibition *in vivo* dans le modèle de transplantation cardiaque, et dans deux modèles de réponses immunes de type Th1 et Th2. Enfin, nous avons voulu évaluer le rôle de la CSE dans la physiologie de la cellule dendritique humaine *in vitro*.

Résultats

I. Article

La cystathionine- γ -lyase module les réponses immunes de type Th1 en contrôlant la production d'interleukine-12 par les cellules dendritiques, et une baisse de son expression est associée à une tolérance vis-à-vis du transplant.

Romain Vuillefroy de Silly, Flora Coulon, Nicolas Poirier, Vojislav Jovanovic, Sophie Brouard, Véronique Ferchaud-Roucher, Gilles Blancho, Bernard Vanhove.

Article en révision dans *Blood*.

Titre original: *Transplant tolerance is associated with reduced expression of cystathionine- γ -lyase that controls interleukin-12 production by dendritic cells and TH-1 immune responses.*

Transplant tolerance is associated with reduced expression of cystathionine- γ -lyase that controls interleukin-12 production by dendritic cells and TH-1 immune responses.

Short title:

Cysteine metabolism in transplant tolerance

Romain Vuillefroy de Silly^{1,2}, Flora Coulon^{1,2}, Nicolas Poirier^{1,2}, Vojislav Jovanovic¹, Sophie Brouard¹, Véronique Ferchaud-Roucher^{2,3}, Gilles Blancho^{1,2}, Bernard Vanhove^{1,2§}

¹ INSERM, UMR643, ITUN, Nantes, France. ² Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France. ³ INSERM, UMR915, Nantes, France.

§Correspondence to Dr. Bernard Vanhove, ITUN, INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France. Tel.: 33 (0) 240 08 74 17, Fax: 33 (0) 240 08 74 11, E-mail address: Bernard.Vanhove@univ-nantes.fr

Abstract word count: 190

Text word count: 4998

Number of figures: 7 + 4 Supplementary Figures

Number of references: 42

Scientific category: transplantation

Abstract

Antigen-activated T lymphocytes undergo an immune or tolerogenic response in part according to the activation status of their antigen-presenting cells (APCs). However, factors controlling the activation of APCs are not fully understood. In this study, we demonstrate that immune tolerance after organ allotransplantation in the rat is associated with a repressed intragraft expression of several enzymes of the trans-sulfuration pathway including cystathionine- γ -lyase (CSE). The pharmacological blockade of CSE with propargylglycine (PPG) delayed heart allograft rejection and abrogated type IV hypersensitivity but did not modify antibody responses. The dominant biological effect of CSE blockade was a specific repression of IL-12 p40 transcript expression, which could be reproduced in vitro in monocytes and dendritic cells (DCs). Repression of IL-12 cytokine by CSE inhibition was not mediated by changes to nuclear factor-kappa B, or hydrogen sulphide, but could be assigned to a modulation of intracellular cysteine. Intracellular cysteine levels were predominantly controlled by CSE activity, together with extracellular import via the X_c⁻ transporter. Our results indicate that CSE plays a critical role in regulating IL-12 in monocytes and DCs and is down-modulated in transplant tolerance, presumably participating in the maintenance of the tolerant state.

Introduction

Cystathionine- γ -lyase (CSE) is a key pyridoxal-phosphate-dependent enzyme in the transsulfuration pathway. Transsulfuration links methionine metabolism to the biosynthesis of cellular redox-controlling molecules, like cysteine, glutathione, and taurine. CSE also controls the metabolism of cysteine into hydrogen sulphide (H_2S), pyruvate and ammonium ions (Figure 1). CSE is expressed in peripheral tissues whereas in the central nervous system, the transsulfuration pathway and H_2S production are driven by the cystathionine- β -synthase enzyme (CBS)¹.

T lymphocytes being deficient in CSE and inefficient at importing cystine, the predominant form of this amino acid in the extracellular milieu, they are metabolically dependent on dendritic cells for cysteine import and glutathione (GSH) synthesis², two molecules with major anti-oxidant properties required for T cell activation and proliferation^{3,4}. A control on cysteine and GSH availability is part of the mechanism of action of regulatory T cells (Tregs) and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) to mediate immune suppression. Tregs do so by limiting expression of γ -glutamate cysteine ligase (GCL) in DCs, the limiting enzyme for GSH synthesis^{5,6}, and MDSC by limiting DC-induced cysteine feeding of effector T cells⁷. GSH is thought to regulate IL-12 production in DCs and macrophages, probably through the GSH/GSSG balance (the oxidized form of GSH) that determines the intracellular redox state and regulates p38 MAPK and calmodulin expression, which in turn binds and sequesters c-rel in the cytoplasm⁸. Also, GSH depletion reduces the expression of costimulatory molecules in DCs and modifies their ability to stimulate allogeneic MLR responses of T cells⁹. *In vivo*, GSH depletion in antigen-pulsed DCs interferes with the delayed-type hypersensitivity response, probably as a consequence of IL-12 repression¹⁰.

H₂S is the final metabolite of the transsulfuration pathway. It is now recognized as the third endogenously produced gasotransmitter after nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) that induce important physiological modifications in mammals such as vasomodulation, synaptic sensitivity, inflammation and the modulation of immune responses¹¹. Among gasotransmitters, the role of H₂S in immune responses is the least understood. It has been deduced from CSE blockade experiments that H₂S was involved in protecting mice from LPS-induced endotoxemia¹², pancreatitis¹³ and sepsis¹⁴. However, other studies have shown that inhibition of H₂S production increased leukocyte-endothelium adherence as well as carrageenan-induced leukocyte infiltration and paw oedema, whereas H₂S donors inhibited those effects^{15,16}. Thus, pro-inflammatory as well as anti-inflammatory roles have been assigned to H₂S.

Immune tolerance to transplanted allografts refers to as an adaptation of the recipient's immune system that either fails to recognize donor alloantigens or controls alloreactivity. It is controlled by the central, thymic depletion of alloreactive T cells and/or by peripheral regulatory cells¹⁷. In experimental transplantation, several T cell subsets with suppressive activity have been described and amongst them predominate the CD4⁺CD25⁺forkhead box P3 (FoxP3)⁺ Tregs. It is becoming increasingly clear that cell types other than T lymphocytes co-operate and form a network of cellular interactions controlling immune responses. These cells include tolerogenic DCs, alternatively activated macrophages, mesenchymal stem cells, B cells and MDSC. Tolerogenic DCs are in an immature state and present antigens in a sub-immunogenic manner, in the absence of costimulatory signals and in a context where proinflammatory cytokine production is inhibited. Several other mechanisms may be responsible for the peripheral tolerance induced by immature DCs, among them the production of interleukin (IL)-10 and transforming growth factor (TGF)- β ¹⁸.

In this study we linked experimental transplant tolerance to the down-regulation of intragraft CSE and found a role for this enzyme in the regulation of DC function. Our results highlight the important role of the transsulfuration pathway lead by CSE in directly controlling intracellular cysteine levels and IL-12 synthesis by DCs, independently of H₂S. *In vivo*, the activity of CSE might also regulate IL-12 levels and specifically control type-1 immune responses and transplant tolerance.

Materials & methods

Chemicals and reagents

Ethyl chloroformate, ethyl acetate, (99.8% purity or better), NH_4OH , sulfosalicylic acid, Dowex 50 W-X8 resin, L-cysteine, D,L-propargylglycine, sulfasalazine, β -cyano-alanine, NaHS, keyhole limpet hemocyanin (KLH) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). L-[3,3- $^2\text{H}_2$]cysteine (98 atom%) was obtained from Cambridge Isotopes (Andover, USA). All other reagents used for GC/MS analyses were of analytical grade. GYY 4137 was purchased from Cayman Chemicals (Tallin, Estonia). Unless specified, all other reagents were from Sigma-Aldrich.

Organ transplantation and tolerance induction and treatments

Lewis 1W (LEW.1W, haplotype RT1^u) and Lewis 1A (LEW.1A, haplotype RT1^a) rats (Centre d'Elevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) share the same genetic background but are MHC I and II mismatched. Heterotopic transplants of 8 to 12 week old LEW.1W hearts into LEW.1A recipients were carried out according to the technique described by Ono & Lindsey¹⁹. For syngeneic transplants LEW.1A hearts were grafted on LEW.1A recipients. Live-sustaining allografts of LEW.1W kidneys in LEW.1A rats were performed aseptically, and a bi-nephrectomy was performed seven days after transplantation as previously described²⁰. Blood urea and creatinine and urine protein/creatinine ratios were measured throughout the posttransplant period. Blood urea <8 mM and blood creatinine <40 mM were considered as normal²¹. Transplant tolerance induction was obtained by treating rats with either anti-CD28 antibodies²², anti-donor anti-class II antibodies²¹, donor-specific blood transfusions (DST)²³, with CD40-Ig²⁴, or with LF015-095, a deoxyspergualin analog²⁵. *De novo* heart-transplanted rats were injected intraperitoneally for 20 days with propargylglycine (PPG; 50 mg/kg/day), an irreversible CSE inhibitor, supplemented with Nacystelyn, a lysine

salt of N-acetylcysteine (NAL; 500mg/kg/day) given to avoid neuronal toxicity. Heart graft survival was evaluated by daily palpation through the abdominal wall. Rats were maintained in an SPF animal facility according to the institutional guidelines of the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM).

Mixed-Leukocytes Reaction (MLR)

MLRs were performed as previously described²⁶. Briefly, T cells from Sprague-Dawley rats (eight to 12 weeks old) or transplanted rats were purified and depleted from His24 (CD45R), OX42 (CD11b/c) and 3.2.3 (CD161) positive cells with magnetic beads (Dyna, Compiègne, France). 35 Gy-irradiated APCs (10^4 cells or 2.10^4 cells) were enriched from transplanted rat spleens by a 14.5% Nicodenz (Gentaur, Paris, France) gradient. After five days, proliferation was measured by ^3H -thymidine (GE Healthcare; 1 μ Ci/well) uptake during the last 16 hours of culture.

Immunostaining

Graft samples were embedded in Tissue Tek OCT compound, snap-frozen in liquid nitrogen, cut into 5- μ m sections, and fixed in acetone. Tissue analysis was performed after saturation using PBS, 4% BSA, 10% goat serum. Immunohistological analysis of the infiltration was evaluated using a mixture of CD45 and TCR α/β mAbs (OX1 + OX30 and R7.3) that were produced in our laboratory from hybridoma obtained from the ECACC (Salisbury, UK). After washing, cells were incubated for one hour at room temperature with FITC-conjugated anti-mouse IgG diluted 1/100 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) and mounted with Dako medium (Dako Cytomation) and analyzed on a Zeiss (Paris, France) Axioskopz microscope. Images were acquired with a Zeiss AxioCamHRC camera and processed using Zeiss AxioVisionRel version 4.2 software. Control sections were performed by replacing the primary Abs with dilution buffer.

RNA preparation, microarray analysis and real-time quantitative PCR

Total RNA obtained by Trizol extraction was cleaned up using RNeasy columns (Qiagen). RNA quantity and quality were determined using a NanoDrop spectrophotometer and an Agilent 2100 bioanalyzer. The Applied Biosystems rat genome survey microarray (part no. 4337467) contained 26,857 60-mer oligonucleotide probes representing 27,088 individual rat genes. Digoxigenin-UTP labeled cRNA was generated and amplified from 0.5 µg of totalRNA from each sample using an Applied Biosystems NanoAmp chemiluminescent reverse transcriptase-in vitro transcription (RT-IVT) labeling kit (part no. 4365715). Array hybridization was performed for 16 hours at 55°C. Chemiluminescence detection, image acquisition, and analysis were performed using the Applied Biosystems chemiluminescence detection kit (part no. 436875D), analyzer (part no. 4338036) and version 1.1 analyzer software (part no. 4336391) according to the manufacturer's protocol. Microarray raw data was analyzed by the R language and environment for statistical computing and graphics. Genes were identified using the Panther Protein Classification System Probe ID database. Microarray data corresponding to syngeneic kidney transplantation in the rat and to kidney allotransplantation induced by anti-donor class II antibodies²¹ were deposited onto the Gene Expression Omnibus web-based data repository, under the reference GSE28474. Real-time quantitative PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 sequence detection system using SYBR-Green PCR core reagents as previously described²¹ or TaqMan gene expression assays according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The following primers were used in this study:

HPRT, CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC (forward)
and TTCGCTGATGACACAAACATGA (reverse); IFN γ ,
TGGATGCTATGGAAGGAAAGA (forward) and GATTCTGGTGACAGCTGGTG
(reverse); IL12p35, TGATGATGACCCTGTGCCTT (forward) and

GCATGGAGCAGGATACAGAGC (reverse); IL12p40, TCATCAGGGGACATCATCAAACC (forward) and CGAGGACGCACCTTTCTG (reverse); IL13, TATGGAGCGTGGACCTGACA (forward) and GCGGAAAAGTTGCTTGGAGTA (reverse); iNOS, GACCAAAGTGTGTGCCTGGA (forward) and TACTCTGAGGGCTGACACAAGG (reverse); HO-1, CCACAGCTCGACAGCATGTC (forward) and GTTTCGCTCTATCTCCTCTTCCA (reverse); TGF β 1, CTCAACACCTGCACAGCTCC (forward) and ACGATCATGTTGGACAACTGCT (reverse); LAG-3, ATATGAATTCACAGAGGAGATGAGGCAG (forward) and ATATGAATTCTCCTGGTCAGAGCTGCCT (reverse); IDO, GCTGCCTCCCATTCTGTCTT (forward) and TGCGATTTCACCATTAGAGAG (reverse); IL-6, GCAAGAGACTTCCAGCCAGTT (forward) and CATCATCGCTGTTTCATACAATCA (reverse); IL-17A, TGCTGTTGCTGCTACTGAACC (forward) and AACTTCCCCTCAGCGTTGAC (reverse); IL-23p19, GGACTCGGACATCTTCACAGG (forward) and GGAACGGAGAAGAGAACGCT (reverse); ROR- γ T, GCAGGAGCAATGGAAGTCG (forward) and CGCTGAGGAAGTGGGAAAA (reverse). HPRT was used as an endogenous control gene to normalize the varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a control sample was calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ threshold cycle method (ABI PRISM 7900 user bulletin 2:11-24 (1997); PEApplied Biosystems). All samples were analyzed in duplicate.

CSE enzymatic activity measurement

H₂S-synthesizing activity was determined as previously described²⁷. Briefly, heart transplants were homogenized (Ultra-Turrax) in 100 mM ice-cold potassium phosphate buffer (pH 7.4). The reaction mixture (1 mL) contained L-cysteine (10 mM; 40 μ l), pyridoxal 5'-phosphate (2

mM; 40 μ L) and tissue homogenate (920 μ L; 7-12 mg of protein, using the BCA method). 0.5mL of 1% zinc acetate was added in the central well for trapping evolved H₂S from the mixture. After flushing the flasks with N₂, the catalytic reaction was initiated by transferring the flask from ice to a 37°C shaking incubator. After 120 minutes, the reaction was stopped by adding 0.5mL of 50% trichloroacetic acid, and the flasks were left an additional 60 minutes to complete trapping of H₂S. The content of the central well was transferred to an Eppendorf tube and mixed with 200 μ L of 72 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride in 7.1 M H₂SO₄ and left for 10 minutes to react. To each tube, 50 μ L of 185mM FeCl₃ in 15 mM H₂SO₄ was added and left for another 10 minutes. Following this, the optical absorbance of the resulting solution at 670nm was measured on a spectrophotometer. The H₂S concentration in the solution was calculated against a calibration curve of NaHS. The H₂S production is expressed as nmoles H₂S formed per mg of protein per hour.

Human monocyte-derived DC (MoDC) generation and cell maturation.

Human peripheral blood monocytes (> 90% pure) were obtained from the “Plateforme DTC” (IFR26, Nantes, France) by countercurrent elutriation. Monocytes were differentiated to immature DC (iDC) by culture (2.10⁶ cells/mL) for five days in RPMI 1640 medium with 10% FCS, 2mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin supplemented with IL-4 (400 IU/mL, CellGro, Paris, France) and GM-CSF (1000 IU/mL, Gentaur, Paris, France). For their maturation, iDCs or THP-1 cells were cultured for 24 hours with LPS in the presence of excipient, PPG, BCA, GYY4137, NaHS or SAS.

MoDC transfections with siRNA

MoDC were transfected in six-well plates at day 4 post differentiation, using RNAi Max lipofectamine (Invitrogen) and siRNA targeting CSE (Ambion, AM16708, 61% knockdown)

or a scrambled negative control (Ambion, AM4615) at a final concentration of 32.5nM. High transfection efficiency (over 85%) was verified with fluorescent siRNA (Fluorescent Block-IT, Invitrogen). Maturation of transfected-DCs was performed 24 hours post transfection using the same protocol as described above.

Assessment of NF κ B p65 activation

MoDC were matured with LPS and treated with PPG for one or two hours. NF- κ B DNA binding activity was assessed using the TransAM NF- κ B family TF assay kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). Nuclear fractions were harvested from cells using the nuclear extraction kit according to the manufacturer's instructions. The protein concentration was determined using the BCA method (Pierce, Rockford, IL, USA). Five μ g of nuclear extract in cell binding buffer were added in triplicate wells containing the 5'-GGGACTTTCC-3' NF- κ B consensus binding site oligonucleotide.

Sample preparation of human MoDC and THP-1 lysates for cysteine content determination by GC/MS

Cellular maturation was carried out as described above. Cells were resuspended in PBS with 10 nmoles of L-[3,3- 2 H $_2$]cysteine added as an internal standard, and sonicated on ice. After deproteinization, cysteine was purified by cation exchange chromatography using NH $_4$ OH 10 M for elution. Following this, samples and standard solutions were dissolved in 0.2 mM sodium phosphate buffer (pH=7.5) with 0.15% DTT.

The preparation of standard solution and the derivatization of the -NH $_2$ and -SH groups of cysteine to obtain their respective N,S-ethoxycarbonyl methyl esters was as previously described³⁵. Briefly, derivatization was performed using ethylchloroformate. After ethylacetate phase extraction, derivatization of the -COOH groups was performed with 1 mM HCl in methanol. Dried samples and standards were dissolved in methanol for GC-MS

analysis. For the preparation of standards, graded amounts of L-cysteine were added in phosphate buffer containing 10 nmoles of L-[3,3-²H₂]cysteine as an internal standard. Calibration curves were obtained by least-squares linear regression analysis of the L-cysteine to L-[3,3-²H₂]cysteine peak area ratio versus the L-[3,3-²H₂]cysteine molar quantity added to the sample. The intracellular cysteine concentration (expressed as nmoles cysteine per million cells) was calculated using the slope (a), the intercept (b) of the cysteine calibration curve and the cell count in the sample (c), corrected for the peak area ratio of cysteine at m/z 220 to that of L-[3,3-²H₂]cysteine (referred to as 2H-Cysteine) at m/z 222:

$$[L\text{-Cysteine}] = n_{2H\text{-Cysteine}} \times [(220_{L\text{-Cysteine}} / 222_{2H\text{-Cysteine}}) - b] / (a \times c)$$

GC-MS procedure

The concentration of L-cysteine and L-[3,3-²H₂]cysteine were determined using a gas chromatograph (5890 series II, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) coupled with a quadrupole mass spectrometer (5971A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Amino-thiols were separated on a fused poly (5% diphenyl/ 95% dimethylsiloxane) capillary column (HP-5MS, 30 m × 0.25-mm inner diameter, 0.25-μm film thickness, Agilent Technologies). The injector and detector temperatures were 270 and 290°C respectively and the EI source was held at 280°C. The column head pressure was set at 8 psi with a helium constant flow rate of 1.2 mL min⁻¹. Splitless injection was used. Injected volumes were 1 μL. The GC oven was programmed as follows: initial temperature 120°C hold for 0.5min, ramp to 260°C at 10°C min⁻¹, then to 290°C at 50°C min⁻¹, hold for one minute. Selected ion monitoring (SIM) mode with ions at mass-to-charge ratio (m/z) 220 and 222 for the N,S-ethoxycarbonyl methyl ester derivative of natural L-cysteine and L-[3,3-²H₂]cysteine, respectively, was used to measure cysteine concentration. The ion dwell time was set at 100 ms.

Delayed-type hypersensitivity (DTH)

LEW.1W rats were immunized subcutaneously using 200 μ L of an emulsion of 50 μ g of KLH mixed in PBS with 50% Freund's complete adjuvant. Delayed-type hypersensitivity was induced by injecting intradermally 20 μ L of a KLH solution (1mg/ml) on a shaved area on the back, seven days after immunization. Erythema swelling and induration were measured using a caliper within 24-72h. Rats were treated with PPG 50mg/kg/day and NAL 500mg/kg/day throughout the experiment.

Dinitrophenol-ovalbumin immunizations

Dinitrophenol-conjugated ovalbumin (DNP-Ova) was a gift from F.Nisol (University of Louvain, Belgium). LEW.1W rats were immunized i.p. with 10 μ g of DNP-Ova. Nineteen days later, sera were collected by blood sinus puncture. Serum levels of anti-dinitrophenol (DNP) IgG1 and IgG2a subclasses were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, as described previously²⁶. Briefly, 96-well microtiter plates (Immulon, Chantilly, VA) were coated with bovine γ -globulin-DNP at 5 μ g/mL and diluted sera added for two hours at 37°C. Plates were developed using horseradish peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-rat isotypes (IgG1, MARG1-2; IgG2a, MARG2a-1; University of Louvain). The concentration of anti-DNP antibody was estimated using standard curves generated by incubating the DNP-coated plates with anti-DNP rat monoclonal antibody (IgG1, LODNP-1; IgG2a, LODNP-16; University of Louvain).

Cytokine measurements

The MoDC and THP-1 secretion of IL-12p40 IL-12p70, IL-10, IL-6, and TNF- α in the supernatants was assessed by ELISA using OptEIA kits (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

Statistical significance was evaluated using Mann-Whitney tests for the comparison of two groups. Graft survival was evaluated by Kaplan-Meier analysis using the log rank test.

Results

CSE is under-expressed in tolerated allografts

Microarray analysis of mRNA from transplanted rat kidney allografts revealed a consistent down-regulation of CSE and of several members of the transsulfuration pathway four month after transplantation in recipients that received a tolerizing regimen based on the administration of anti-donor class II antibodies²¹, as compared with syngeneic grafts (Figure 2A). Quantification by qRT-PCR on independent samples showed that tolerated kidney allografts contained on average three-fold less mRNA for CSE than syngeneic grafts (Figure 2B). In the same kidney transplant model, a similar down regulation of CSE was also observed if tolerance was induced by infusion with antagonist anti-CD28 antibodies, according to a previously described protocol²² (Supplementary Figure 1A). After cardiac transplantation in the rat, tolerance can also be induced by donor-specific blood transfusions²³, administration of CD40Ig²⁴ or of the immunosuppressive molecule LF15-0195²⁸. In these cases, the down-modulation of CSE mRNA could also be observed in tolerant recipients (Supplementary Figure 1B). In the donor-specific blood transfusion model, we could also measure a decrease of CSE enzyme activity in cardiac allografts (Supplementary Figure 1C).

CSE inhibition prevented heart graft rejection

To test the effect of CSE inhibition on the heart graft rejection course, we injected the irreversible CSE inhibitor D,L-propargylglycine (PPG) on a daily basis over 20 days. PPG is known to inhibit the conversion of cysteine to H₂S, as well as the conversion of homocysteine to cysteine, because CSE is implicated in these two conversion steps (Figure 1). Given that cysteine is the rate-limiting substrate for glutathione synthesis, a major ubiquitous antioxidant molecule, we supplemented PPG administration with a cysteine donor, Nacystelyn (NAL),

allowing us to block H₂S release without blocking glutathione synthesis and therefore avoiding neuronal toxicity³⁶. Acute rejection of heart allograft in control animals consistently occurred on day 6 post-transplantation and the effect of administration of cysteine donor NAL alone was not significant (median survival of nine days). By contrast, CSE inhibition by PPG supplemented with NAL induced a significant delay of rejection (median survival of 26.5 days). Furthermore, two of the six treated recipient animals tolerated their allograft indefinitely (Figure 3). Surprisingly, immunohistological analysis performed on day six post-transplantation revealed that allografts were infiltrated with CD45⁺ mononuclear cells and T cells, to a similar extent in control or in PPG/NAL-treated recipients (Figure 4A and supplementary Figure 2). On day six post-transplantation, the *ex vivo* alloreactivity of recipient T cells against donor APCs in mixed lymphocyte reaction was normal, and not different between PPG/NAL treated animals and untreated control animals. Recipient APCs also showed no defect in their direct alloantigen presentation capacities to donor T cells (Figure 4B), or third party T cells (data not shown). However, RT-PCR analyses of mRNA transcripts extracted from these heart transplants on post-operative day six revealed a specific down regulation of IL-12p40 in PPG + NAL treated recipients, compared to rejecting, untreated recipients or with NAL-alone treated recipients (Figure 4C). Other transcripts including IFN γ , TGF β , IL-12p35 and others shown in Figure 4C were not modified.

CSE modulates IL-12 biosynthesis in monocytes and monocyte-derived dendritic cells by decreasing intracellular cysteine

We tested the *in vitro* action of PPG on IL-12 synthesis by monocyte-derived human DC (moDC) and THP-1 monocytic cells after activation by LPS. In MoDC, LPS stimulation resulted in the upregulation of CD80, CD83, CD86 and HLA-DR and in the induction of IL-12 synthesis (Figure 5A). Using PPG during the maturation process we found that IL-12 protein secretion was dose-dependently repressed (both IL-12 p40 subunit and IL-12 p70

complex were tested). In contrast, secretion of IL-6, IL-10 or TNF α was not affected by PPG (Figure 5B). The PPG dose range used here had no effect on cell viability (data not shown). The reduction of IL-12 synthesis was specifically due to the inhibition of the CSE enzyme since repression could be reproduced by transfecting MoDC with CSE siRNA that reduced CSE mRNA expression by 61% (data not shown), and IL-12 p40 secretion by 50% (Figure 5C). In addition, BCA, another CSE inhibitor, gave similar results (Supplementary Figure 3). Other phenotypic characteristics of mature DC such as expression of CD80, CD86, CD83 and Class II molecules were not modified by CSE inhibition (data not shown). The effect of CSE blockade on IL-12 production could not be attributed to the lack of H₂S synthesis since simultaneous addition of NaHS (data not shown) or of GYY4137 (Figure 5D), two donor molecules that respectively release H₂S rapidly or slowly, failed to restore IL-12 production. The NF- κ B pathway, which is a known regulator of IL12-p40 transcription³⁷, was obviously not involved either in the mechanism of action of PPG since no modification in the nuclear NF- κ B binding activity could be observed in LPS-treated MoDC after treatment with PPG (data not shown).

Since CSE is a rate-limiting enzyme in the synthesis of cysteine from methionine but also in the catabolism of cysteine into H₂S, pyruvate and NH₃ (Figure 1), one major effect of CSE blockade might be an alteration of cysteine intracellular content. Because IL-12 synthesis is modulated by GSH¹⁰, for which cysteine is limiting, we thought cysteine levels might also impact IL-12 synthesis. We therefore first tested whether sulfasalazine (SAS), an inhibitor of the cysteine X_c⁻ transporter, whose physiological role is to import cystine which then converts into cysteine, could mimic the effect of PPG on IL-12 synthesis in DC. We observed that SAS prevented IL-12p40 subunit (as well as IL-12p70) production by LPS-stimulated MoDC (Figure 5E). Next we directly measured intracellular levels of cysteine by gas chromatography

coupled with mass spectrometry in MoDC, and in the THP-1 cell line, where CSE inhibition also prevents IL-12p40 secretion induced by LPS challenge (Figure 5F). In THP-1 cells, although there was no modification in cysteine content after LPS challenge as compared to non-treated cells, CSE inhibition by PPG clearly decreased intracellular cysteine levels by 61% without LPS and by 27% with LPS (Figure 6A). Interestingly, in THP-1 cells, X_c^- inhibition with SAS had no effect on cysteine levels (Figure 6A), in accordance with the observation that it could not prevent IL-12p40 secretion either (Figure 5F), and highlights a crucial role for CSE activity in the replenishment of the cysteine content inside this cell line. In contrast, in MoDC, LPS challenge induced an upregulation of intracellular cysteine content from 0.58 nmol to 1.05 nmol per million cells (Figure 6B), indicating that the immature state is associated with less cysteine content in MoDC. CSE inhibition in MoDC decreased intracellular cysteine content to 0.38 nmol without LPS, and to 0.71 nmol per million cells with LPS. Unlike in THP-1 cells, X_c^- inhibition with SAS clearly decreased the intracellular cysteine content of MoDC, giving 0.36 nmol of cysteine without LPS and 0.59 nmol per cell million after LPS challenge (Figure 6B).

Because CSE is implicated in the cysteine synthesis as well as cysteine catabolism, these results indicate that the rate of CSE-induced cysteine synthesis in the transsulfuration pathway dominates the CSE-mediated cysteine catabolism in MoDC and THP-1 cells.

CSE inhibition prevents DTH but does not prevent antibody responses

Since IL-12 cytokine controls TH-1 type immune responses²⁹, we investigated whether CSE blockade specifically blocked TH-1 type responses. DTH is a type IV hypersensitivity reaction mediated by TH-1 T lymphocytes³⁰. Sensitized animals challenged with an antigenic intradermal reaction against keyhole limpet hemocyanin mounted a robust skin DTH reaction. The reaction was not modified by administration of NAL. However, after administration of

PPG + NAL, the reaction was mostly abolished (Figure 7 and Supplementary Figure 5). In contrast, animals immunized with ova-DNP mounted a specific antibody response (the prototypic TH-2 type of immune response) and this response could not be modified by administration of PPG + NAL (Figure 6).

Discussion

This study was initiated after we observed that CSE and several other genes of the transsulfuration pathway were repressed in different rat models of heart and kidney graft tolerance. Reciprocally, pharmacological inhibition of CSE *in vivo* using PPG resulted in a significant prolongation of heart allogeneic graft survival, without modifying the T cells themselves. CSE blockade in grafted animals resulted in the repression of IL-12 synthesis within the graft. *In vitro*, PPG-treated DC also presented a clear alteration of IL-12 production after activation. Other parameters such as activation markers, immunogenicity and secretion of IL-6, IL-10 and TNF- α were not modified. Pertaining to this specific action focused on IL-12, CSE inhibition prevented TH-1 type but not TH-2 type responses *in vivo*. NF- κ B activation or a direct action of the gasotransmitter H₂S could not explain the effect of CSE inhibition on IL-12, which was associated with reduced intracellular levels of cysteine.

Transplant tolerance can be maintained by the action of regulatory lymphocytes and accessory cells that synergize to suppress allogeneic effector lymphocyte immunoreactivity¹⁸. Dendritic cells are seen as dominant regulators of immune tolerance³¹. However, although these cells have been evidence as instrumental in some of these models²¹, the underlying mechanism(s) are still unclear. An accepted common feature is the ability to present alloantigens in the presence of a suboptimal costimulation, resulting in alloreactive T cell anergy, or differentiation into regulatory lymphocytes. Another feature is the alteration of cytokine synthesis that drives T cell differentiation toward TH-1, TH-2 or Treg phenotypes. In five different models of organ transplant tolerance previously described in our laboratory^{21-24,28}, we found an under expression of CSE. Therefore CSE repression is probably a common mechanism independent of the tolerance induction protocol. CSE is a key transsulfuration pathway enzyme that links methionine to cysteine and then controls its catabolism, resulting in the production of H₂S. We initially thought that H₂S might be responsible for the effect of

CSE blockade on repression of IL-12 synthesis by DC. Indeed H₂S is now recognized as a biologically active gasotransmitter able to modulate production of cytokines and chemokines in leukocytes^{32,33}, in addition to the pleiotropic effects on the cardiovascular system³⁴. Moreover, the anti-inflammatory effect of CSE inhibition *in vivo* in the rat has been correlated to the induced reduction of H₂S release¹⁶, suggesting that H₂S is the final mediator of the inflammatory effect. Expression of CSE has also been correlated with cell proliferation via a H₂S-dependent mechanism³⁵. In DC and THP-1 monocytes, however, IL-12 repression following inhibition of CSE could not be directly assigned to the effect of H₂S deprivation, since H₂S supplementation failed to reverse the effect. Another argument against a direct role of H₂S in the control of IL-12 transcription was that NF-κB binding activity in the nucleus was not modified by CSE blockade whereas H₂S has NF-κB inhibitory activity^{14,33}. Another possible mechanism by which CSE inhibition might repress IL-12 synthesis is via the alteration of GSH, which itself regulates IL-12 synthesis in macrophages by modulating the redox balance⁸. However, GSH depletion inhibits NF-κB activation and prevents APCs from stimulating allogeneic T cells³⁶. Our observations are different: inhibition of CSE by PPG did not modify the expression of class II or costimulatory molecules on DCs and did not prevent their allogenicity. Therefore it is likely that the effect of CSE blockade and cysteine reduction on IL-12 is independent of GSH. The intracellular cysteine level is controlled on one hand by the transsulfuration pathway and on the other hand by the import of cystine from the extracellular milieu. We observed that SAS, an X_c⁻ inhibitor, also resulted in a repression of IL-12 synthesis in activated DC. Therefore these arguments indicate that cysteine itself, presumably also by regulating the redox balance, could directly impact IL-12 transcription in DCs.

In vivo, the immunological impact of CSE repression was restricted to less IL-12. T cell and DC alloreactivity *ex-vivo* was normal. The key function of IL-12 is the induction and maintenance of TH-1 responses, which is essential in the antimicrobial responses to intracellular pathogens. Delayed-type hypersensitivity is a pure TH-1 type immune response that is dominantly controlled by IL-12. Antibody production is mediated by a TH-2 type T cell help to B cells. Solid allograft rejection is mediated by both types of responses but TH-2 alloresponses can also be protective³⁷. CSE blockade *in vivo* prevented DTH, did not affect antibody responses and to some extent prolonged allografts with limited induction of transplant tolerance. This data is consistent with past reports suggesting that reduced TH-1 responses induced by administration of neutralizing anti-IL-12 antibodies prolonged allograft survival³⁸. Interestingly CSE mRNA levels were found reduced in tolerated allografts suggesting a correlation between immune repression and CSE expression. The origin of the down-regulation in tolerated organs could be due to the absence of graft infiltrating cells expressing CSE. However we observed that tolerated grafts were infiltrated by mononuclear cells to a similar extent as in rejected grafts and more infiltrated than syngeneic grafts. Another possible cause of CSE down-regulation in tolerated allografts might be a regulation of the transcription of the *Cth* gene (coding for CSE) by graft infiltrating cells, which is transcriptionally controlled by the farnesoid X receptor (FXR), a bile acid-regulated nuclear receptor expressed in enterohepatic tissues and also in immune cells such as macrophages³⁹. Along time ago, it was identified that reduced levels of CSE in human bone marrow may be a marker of cell immaturity⁴⁰. Since transplant tolerance is associated with intragraft infiltration by immature DC⁴¹, it is possible that the low CSE mRNA levels observed here simply reflect immaturity of graft infiltrating cells expressing low CSE levels. The fact that we found that MoDC in an immature state produce less intracellular cysteine than MoDC matured with LPS, together with the role we uncovered for CSE in the replenishment of the

cysteine pool in these cells sustain this hypothesis. In addition, the previous finding that presence of DC in spleen cells is required for adoptive transfer of tolerance from anti-Class II antibodies-treated rats²¹ stresses the central role of DCs in transplant tolerance. Whatever the mechanism responsible for low CSE expression in tolerated allografts, it is reminiscent of the immunosuppression state associated with HIV infection, characterized by depletion of cysteine in leukocytes⁴².

In conclusion, we found that CSE repression is associated with transplant tolerance. CSE specifically controls IL-12 cytokine synthesis by DCs probably by directly controlling the intracellular cysteine level. *In vivo*, CSE controls allograft rejection and TH-1 type immune responses pointing out the role of this enzyme in immune regulation.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Francis Vanderbist from “SMB-Galéphar” (Brussels, Belgium) for providing Nacystelyn, Delphine Coulais from the “Plateforme DTC” (C.H.U. de Nantes, France) for supplying monocytes, and Charlotte Naël from the “Plateforme de Spéctrométrie de masse” for her advice regarding gas chromatography coupled with mass spectrometry. We are grateful to Richard Danger for his DNA chip data management advice.

This work was supported by the “Société Francophone de Transplantation” and by the “Vaincre La Mucoviscidose” associations.

Authorship Contributions

RVS performed experiments and contributed to writing the manuscript. FC and VJ performed experiments. NP, SB and GB discussed results, VFR designed GC/MS experiments. BV founded research, designed experiments and wrote the manuscript.

Disclosure of conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

References

1. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(11):917-935.
2. Angelini G, Gardella S, Ardy M, et al. Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(3):1491-1496.
3. Sen CK. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(11):1747-1758.
4. Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(9):3343-3347.
5. Yan Z, Garg SK, Banerjee R. Regulatory T cells interfere with glutathione metabolism in dendritic cells and T cells. *J Biol Chem.* 2010;285(53):41525-41532.
6. Yan Z, Garg SK, Kipnis J, Banerjee R. Extracellular redox modulation by regulatory T cells. *Nat Chem Biol.* 2009;5(10):721-723.
7. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010;70(1):68-77.
8. Alam K, Ghousunnissa S, Nair S, Valluri VL, Mukhopadhyay S. Glutathione-redox balance regulates c-rel-driven IL-12 production in macrophages: possible implications in antituberculosis immunotherapy. *J Immunol.* 2010;184(6):2918-2929.
9. Kuppner MC, Scharner A, Milani V, et al. Ifosfamide impairs the allostimulatory capacity of human dendritic cells by intracellular glutathione depletion. *Blood.* 2003;102(10):3668-3674.
10. Kim HJ, Barajas B, Chan RC, Nel AE. Glutathione depletion inhibits dendritic cell maturation and delayed-type hypersensitivity: implications for systemic disease and immunosenescence. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(5):1225-1233.

11. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, et al. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*. 2009;2(96):ra72.
12. Collin M, Anuar FB, Murch O, Bhatia M, Moore PK, Thiernemann C. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol*. 2005;146(4):498-505.
13. Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moochhala SM, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *Faseb J*. 2005;19(6):623-625.
14. Zhang H, Zhi L, Moochhala S, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(4):L960-971.
15. Zanardo RC, Brancalione V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*. 2006;20(12):2118-2120.
16. Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moochhala SM, Moore PK. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacol*. 2005;145(2):141-144.
17. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nat Med*. 2005;11(6):605-613.
18. Dugast AS, Vanhove B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2009.
19. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1969;57(2):225-229.
20. Soulillou JP, Carpenter CB, d'Apice AJ, Strom TB. The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J Exp Med*. 1976;143(2):405-421.
21. Degauque N, Lair D, Dupont A, et al. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells. *J Immunol*. 2006;176(7):3915-3922.

22. Haspot F, Seveno C, Dugast AS, et al. Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR Class II B7 Regulatory Cells. *Am J Transplant*. 2005;5(10):2339-2348.
23. Josien R, Pannetier C, Douillard P, et al. Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats. *Transplantation*. 1995;60(10):1131-1139.
24. Guillonnet C, Hill M, Hubert FX, et al. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*. 2007;117(4):1096-1106.
25. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou JP, Cuturi MC. Role for Thymic and Splenic Regulatory CD4(+) T Cells Induced by Donor Dendritic Cells in Allograft Tolerance by LF15-0195 Treatment. *J Immunol*. 2002;168(10):5058-5069.
26. Haspot F, Villemain F, Laflamme G, et al. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood*. 2002;99(6):2228-2234.
27. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydratation in liver and kidney of the rat. *Biochem J*. 1982;206(2):267-277.
28. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant*. 2002;2(8):745-757.
29. Finkelman FD, Madden KB, Cheever AW, et al. Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. *J Exp Med*. 1994;179(5):1563-1572.
30. Black CA. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol Online J*. 1999;5(1):7.
31. van Kooten C, Lombardi G, Gelderman KA, et al. Dendritic Cells as a Tool to Induce Transplantation Tolerance: Obstacles and Opportunities. *Transplantation*. 2010.
32. Zhi L, Ang AD, Zhang H, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol*. 2007;81(5):1322-1332.

33. Oh GS, Pae HO, Lee BS, et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(1):106-119.
34. Yang G, Wu L, Jiang B, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008;322(5901):587-590.
35. Yang G, Cao K, Wu L, Wang R. Cystathionine gamma-lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H₂S-dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation and p21Cip/WAK-1. *J Biol Chem*. 2004;279(47):49199-49205.
36. McKenna GJ, Kim PT, Mui AL, et al. Glutathione depletion of stimulator cells inhibits responder T-cell immunogenicity in vitro and prolongs allograft survival in vivo. *Am J Surg*. 2006;191(5):588-592.
37. Yin H, Li XY, Jin XB, et al. IL-33 prolongs murine cardiac allograft survival through induction of TH2-type immune deviation. *Transplantation*. 2010;89(10):1189-1197.
38. Li XC, Zand MS, Li Y, Zheng XX, Strom TB. On histocompatibility barriers, Th1 to Th2 immune deviation, and the nature of the allograft responses. *J Immunol*. 1998;161(5):2241-2247.
39. Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, Distrutti E, Fiorucci S. Bile-acid-activated farnesoid X receptor regulates hydrogen sulfide production and hepatic microcirculation. *World J Gastroenterol*. 2009;15(17):2097-2108.
40. Link D, Drebing C, Glode LM. Cystathionase: a potential cytoplasmic marker of hematopoietic differentiation. *Blut*. 1983;47(1):31-39.
41. Beriou G, Peche H, Guillonneau C, Merieau E, Cuturi MC. Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. *Transplantation*. 2005;79(8):969-972.
42. Breitkreutz R, Holm S, Pittack N, et al. Massive loss of sulfur in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16(3):203-209.

Figures

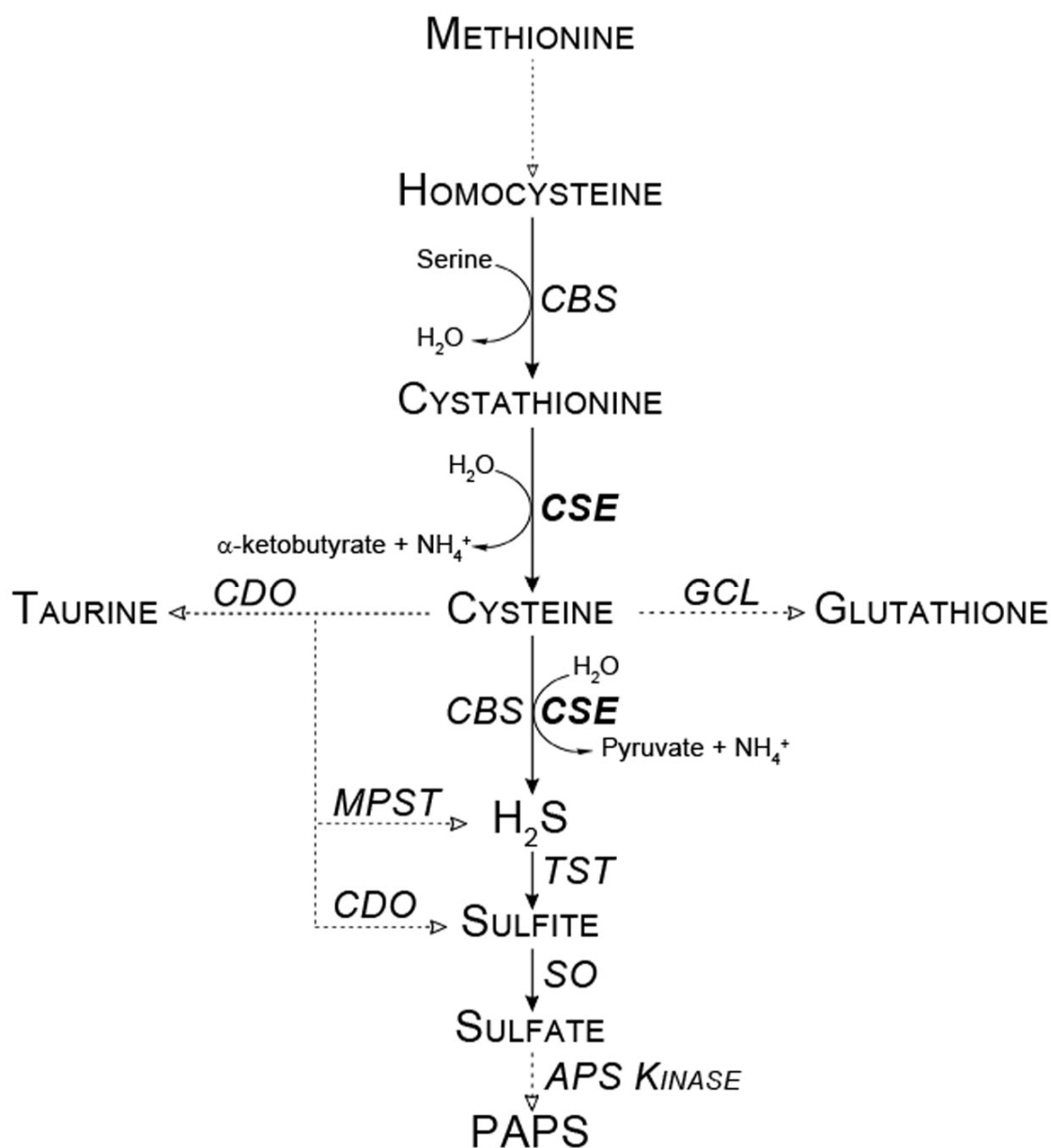


Figure 1: Simplified scheme of the cysteine metabolism. Dotted lines with empty arrows show multi-step conversions. APS Kinase: adenosine 5'-phosphosulfate kinase. CBS: cystathionine-β-synthase. CDO: cysteine dioxygenase. CSE: cystathionine-γ-lyase. GCL: glutamate cysteine ligase. H₂S: hydrogen sulphide. MPST: mercaptopyruvate sulfurtransferase. PAPS: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate. SO: sulfite oxidase. TST: thiosulfate sulfurtransferase.

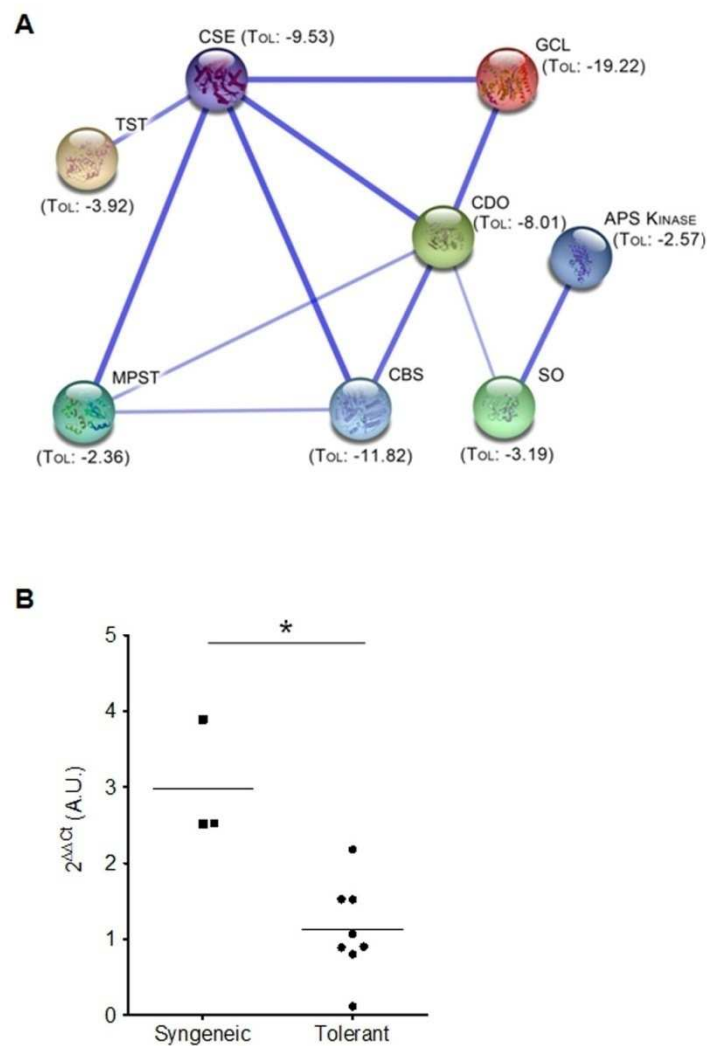


Figure 2: Reduced expression of CSE in transplant tolerance. (A) Tolerance is associated with a down-regulation of transsulfuration network genes. Gene regulation was assayed by microarray analysis at day 150 post transplantation in rats receiving an allogeneic kidney transplant and anti-donor Class II antibodies (Tol) as the tolerizing regimen²¹. Indicated gene expression fold change was normalized to syngeneic transplantation. Data are available on the Gene Expression Omnibus web-based data repository, under the GEO accession number GSE28474. Stronger associations between molecules are represented by thicker lines using STRING 8.3 predictions. Fold changes are expressed as the mean of three animals. APS Kinase: adenosine 5'-phosphosulfate kinase. CBS: cystathionine- β -synthase, CDO: cysteine dioxygenase, CSE: cystathionine- γ -lyase, GCL: glutamate cysteine ligase, MPST: mercaptopyruvate sulfurtransferase, SO: sulfite oxidase, TST: thiosulfate sulfurtransferase. (B) Kidney transplants from rats receiving anti-donor Class II antibodies (Tolerant) and from syngeneic transplants (Syngeneic) were assayed for CSE expression by qRT-PCR at day 100 post-transplant. Individual measurements are shown, and bars represent the mean value*: $P < .05$.

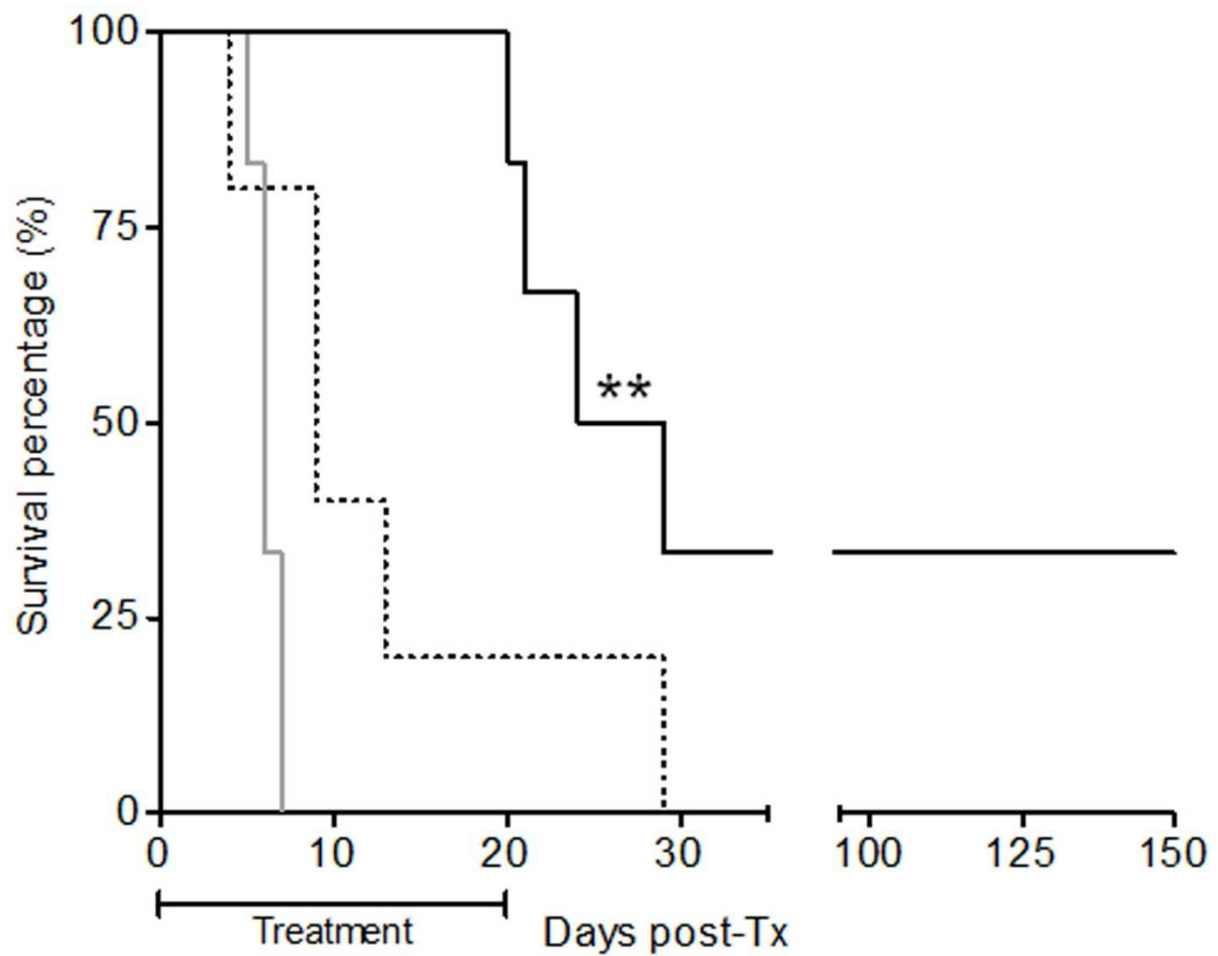


Figure 3: Impact of CSE blockade with PPG on cardiac allograft survival. The grey line represents survival of the rejection group without treatment (n=6), the dotted line shows the rats treated with NAL at 500mg/kg/day alone (n=5) and the black line represents rats treated with PPG at 50mg/kg/day supplemented with NAL at 500mg/kg/day (n=6). *: $P < .05$.

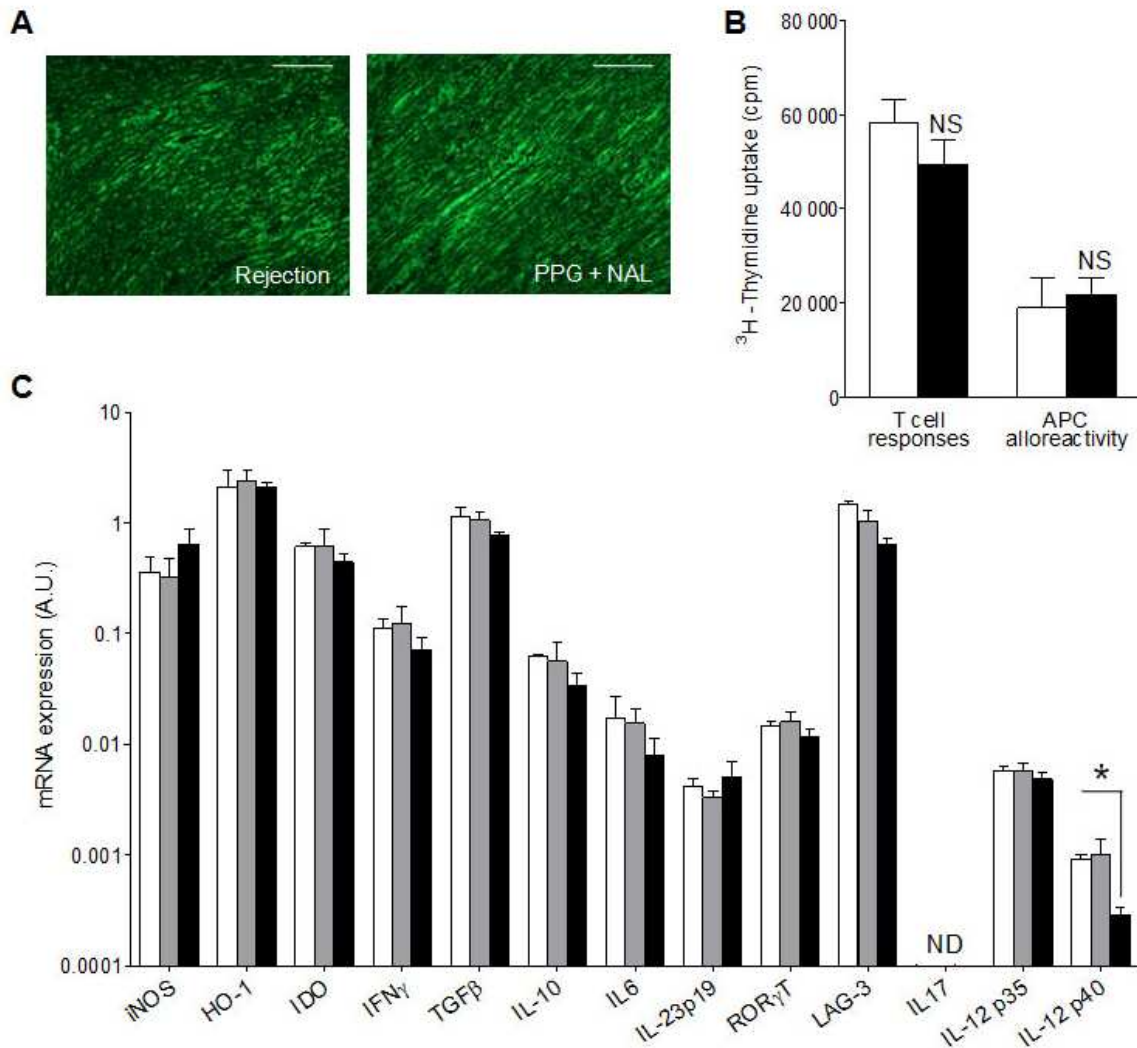


Figure 4: Immunological status of cardiac allografts in PPG-treated animals. (A) Immunofluorescence showing intragraft infiltration of monocytic cells (Ox1-Ox30 labeling) at day 5 post transplantation (original magnification: x100). Left panel: untreated, rejecting recipient. Right panel: PPG/NAL-treated recipients. The scale bar represents 100 μ m. (B) Panel “T cell response”: graft recipient (LEW.1A) T cells purified from the spleen were stimulated at a 1:1 ratio with irradiated donor-type LEW.1W splenocytes used as APCs. Panel “APC alloreactivity”: graft recipient (LEW.1A) DC from the spleen were used as APCs to stimulate at a 1:10 ratio purified donor-type LEW.1W T cells. White bars represent untreated rejecting recipients and black bars recipients treated with PPG + NAL. Cells were harvested on day six post transplantation. Proliferation was measured after five days of culture. Mean $\pm$ SD of triplicates from one experiment representative of three independent experiments is shown. (C) Recipient rats of allogeneic hearts were either untreated (white bars), treated with NAL alone (grey bars) or with PPG/NAL (black bars). Grafts were harvested on day six post transplantation and mRNA levels of indicated factors analyzed by qRT-PCR in comparison with HPRT expression. Each bar is a mean $\pm$ SEM of three (IDO, LAG-3, IL-10, IL-6, IL-17, IL-23p19, ROR γ T) or 4 (iNOS, HO-1, IFN γ , TGF β , IL-12p35, IL-12p40) animals. ND: not detected. *: $P < .05$.

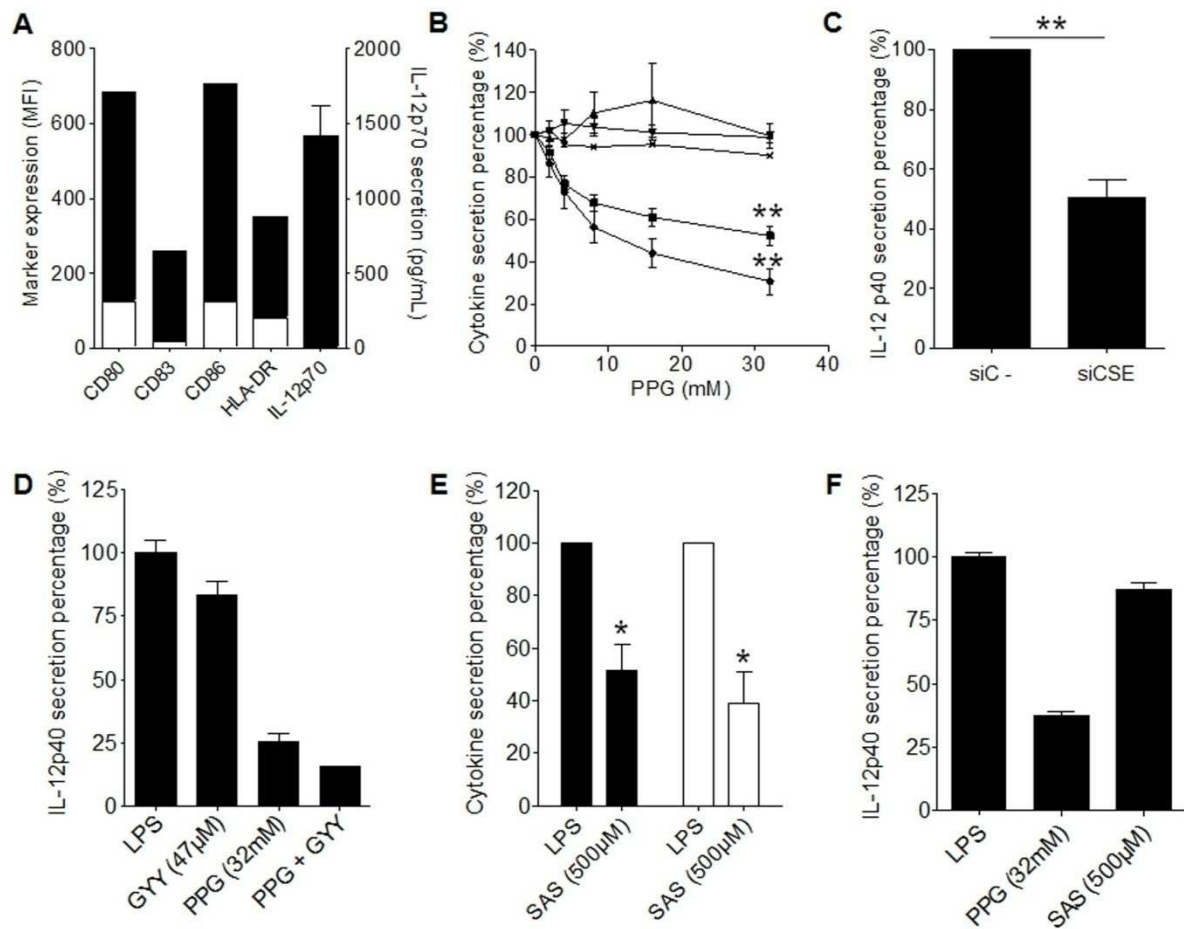


Figure 5: CSE inhibition prevents LPS-induced IL-12 synthesis by MoDC and THP-1 cells. (A) Maturation with LPS induces the upregulation of indicated markers (MFI, mean fluorescence intensity) and the secretion of IL-12 into the supernatant. White bars: non-treated. Black bars: 24 hours after addition of LPS. Data are from one representative of five independent experiments. (B) Human monocytes were differentiated for five days into MoDC with IL-4 and GM-CSF and maturation was induced by LPS for 24 hours, in the presence of increasing doses of PPG, after which time supernatants were analyzed by ELISA. Results represent the mean relative cytokine secretion as compared to secretion without PPG, $\pm$ SEM. Dots ($\bullet$) represent IL-12p70 (n=5), squares ($\blacksquare$) represent IL-12p40 (n=10), triangle ($\blacktriangle$) represent IL-10 (n=4), inverted triangle ($\blacktriangledown$) represent IL-6 (n=2) and crosses ($\times$) represent TNF- α (n=1) secretion. (C) Monocytes were differentiated during 4 days with IL-4 and GM-CSF, and transfected with an siRNA specific for CSE (siCSE), or a scrambled negative control siRNA (siC-) for 24 hours. Then, transfected cells were matured by LPS challenge for 24 hours and supernatants were analyzed. Results represent the relative secretion of IL-12p40 as compared to siC-, and show the mean $\pm$ SEM of four independent experiments. (D) Maturation of MoDC was induced by LPS challenge for 24 hours in the presence of either buffer (LPS), GYY4137 (GYY; H₂S donor), PPG, or combination of PPG and GYY4137 (PPG+GYY), and supernatants were analyzed. Results represent the relative secretion mean of IL-12p40 as compared to LPS alone (LPS), $\pm$ SD of

duplicates from one experiment representative of three independent experiments. (E) Same experiment as in panel D, but sulfasalazine (SAS), a X_c⁻cystine transporter inhibitor was added. Black bars: IL-12p40. White bars, IL-12p70. Results represent the mean relative secretion ± SEM of four independent experiments. (F) Same experiment as in panel D and E, in THP-1 cells. Results are means ± SEM of two independent experiments. *: $P < .05$; **: $P < .01$.

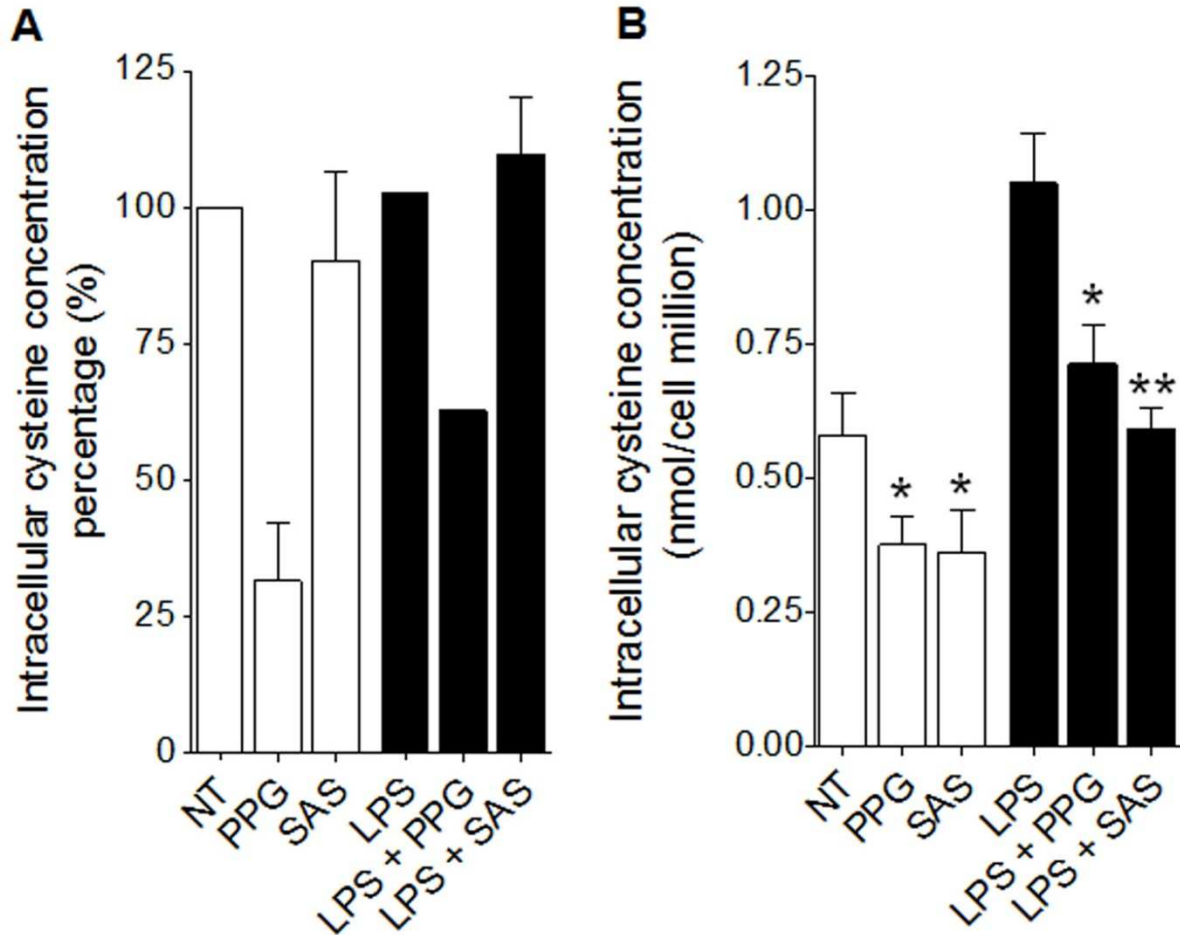


Figure 6: CSE inhibition prevents intracellular cysteine accumulation in THP-1 cells and in MoDC. (A) THP-1 cells were either non-treated (NT), treated with PPG or treated with SAS in the absence (white bars) or presence (black bars) of LPS for 24 hours. Cells were harvested and analyzed by mass spectrometry. Results represent the relative mean percentage of intracellular cysteine concentration as compared to intracellular cysteine concentration when THP-1 cells were non-treated (NT), $\pm$ SEM of two independent experiments. (B) Same experiments as in A on MoDC. Results represent the mean of intracellular cysteine concentration, expressed as nmole of cysteine per 10^6 cells, $\pm$ SEM of five independent experiments (except SAS and LPS+SAS, four experiments). *: $P < .05$; **: $P < .01$.

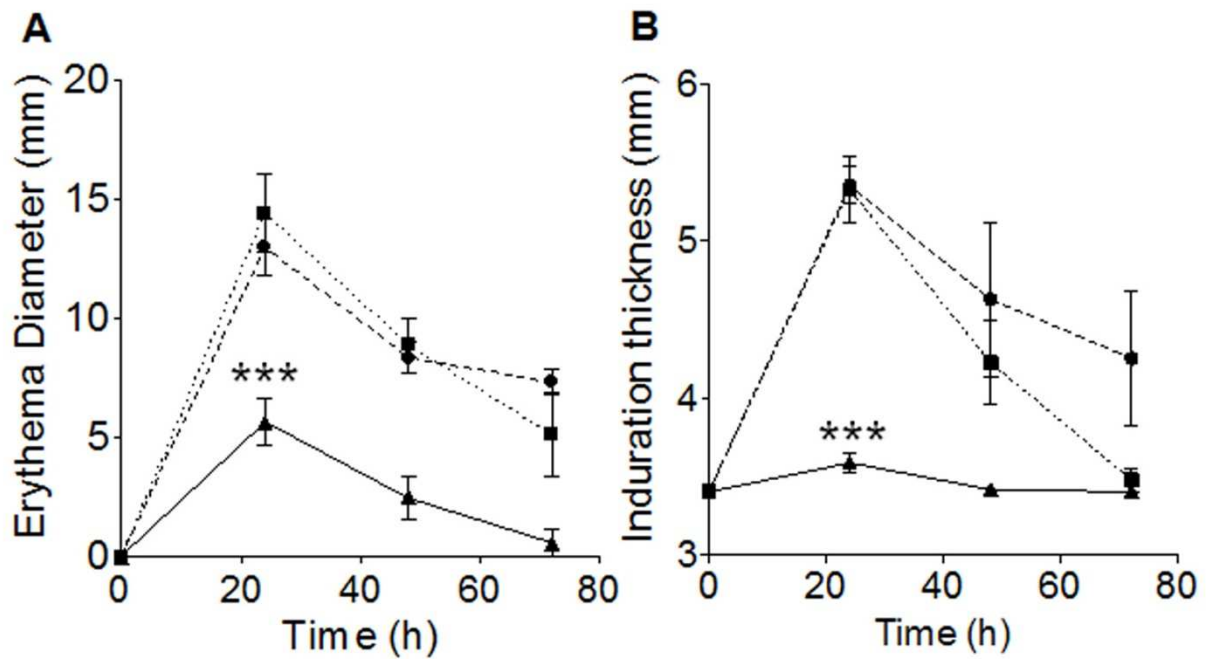
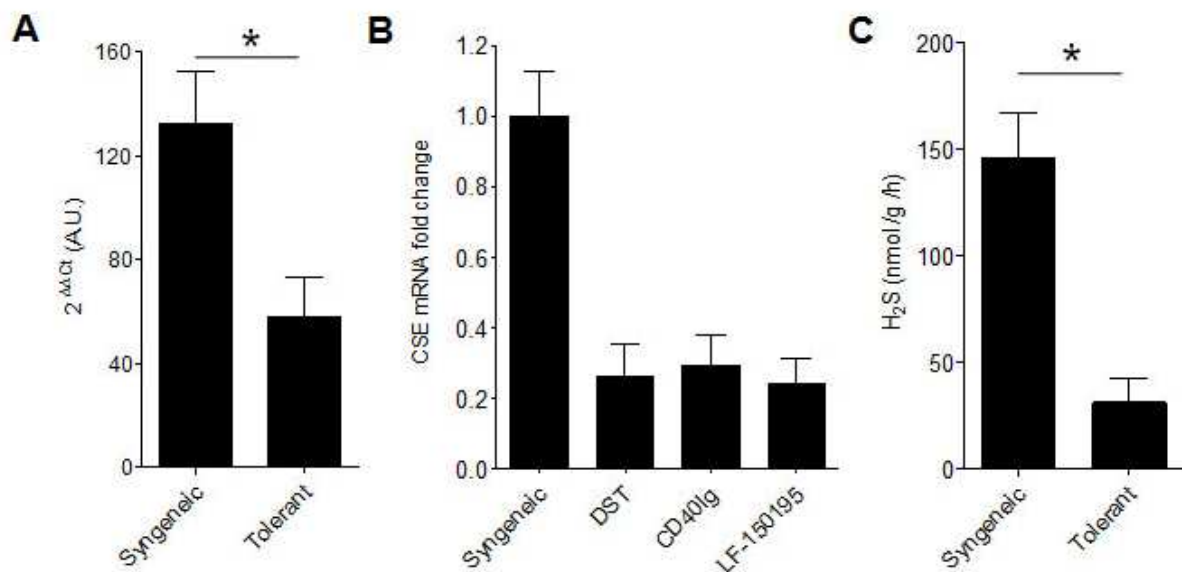


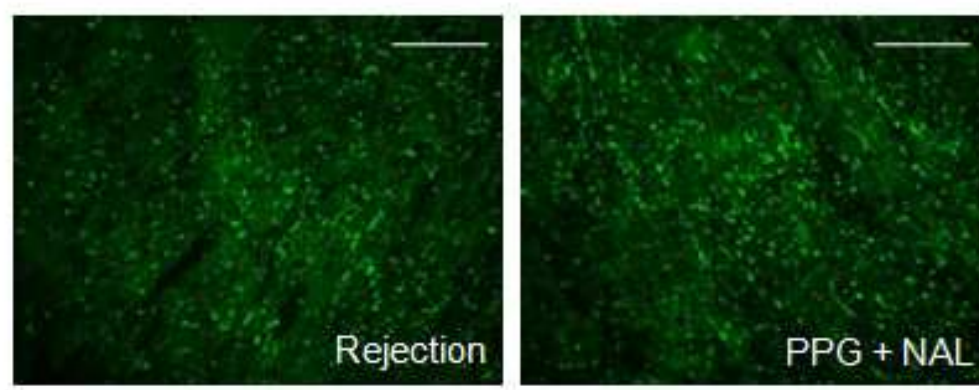
Figure 7: CSE activity controls delayed type hypersensitivity. (A, B) LEW.1W rats were immunized with KLH and subsequently challenged with an intra-dermoreaction. Erythema (A) and induration thickness (B) were recorded at 24, 48 and 72 hours. Dots (•) represent untreated animals, squares (■) represent NAL-treated animals, while triangles (▲) represent PPG/NAL-treated animals. Each point is a mean $\pm$ SEM of four animals, except for the PPG/NAL-treated group which is a mean $\pm$ SEM of seven animals. ***: $P < .001$.

Supplementary figures

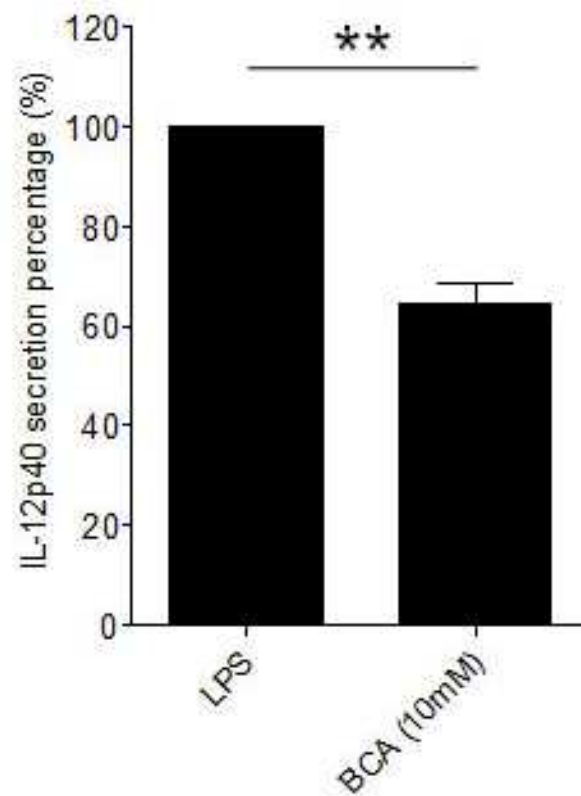


Supplementary Figure 1: Reduced expression of CSE in different transplant tolerance models.

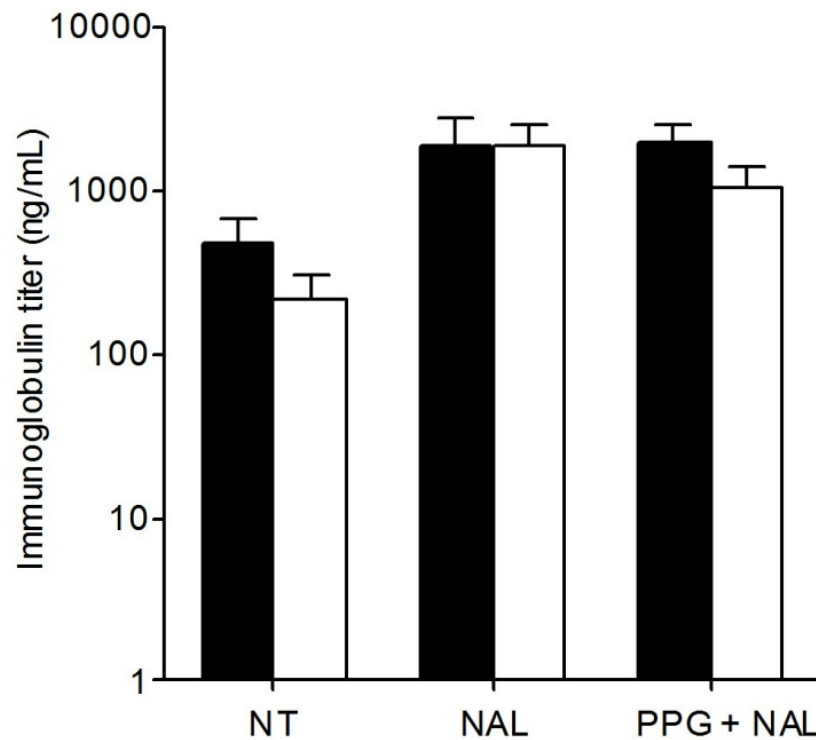
(A) Assessment of CSE mRNA down regulation by qRT-PCR. Kidney transplants from rats receiving anti-CD28 tolerizing regimens²² and from syngeneic transplants were assayed for CSE expression by qRT-PCR at day 100 post-transplantation. Each bar is the mean $\pm$ SEM of three animals for the syngeneic group, and four animals for the tolerant (anti-CD28) group. (B) Relative expression of CSE mRNA assessed by DNA microarrays following three different tolerance inducing protocols, 150 days after cardiac transplantation in the rat. DST: pre-transplant donor-specific blood transfusions²³. CD40Ig: administration of recombinant adenoviruses coding for murine CD40Ig²⁴. LF15-0195: treatment with a deoxyspergualin analogue²⁸. Syngeneic: LEW.1A kidney or heart grafted on a syngeneic LEW.1A recipient. Each bar is the mean $\pm$ SEM of three animals. (C) Assessment of CSE enzymatic activity after tolerance induction post cardiac transplantation. Rats received a tolerance-induction protocol (donor-specific blood transfusions²³) and an allogeneic heart graft or a syngeneic graft. Grafted organs were harvested on day seven post transplantation, homogenized and CSE activity assessed as described in materials and methods. Data are the mean $\pm$ SEM of four animals for syngeneic transplantations, and three animals for tolerated transplantation. *: $P < .05$.



Supplementary Figure 2: T cell infiltration of cardiac allografts in PPG-treated animals. Immunofluorescence showing intragraft infiltration of T cells (TCR α/β labeling with the R7.3 antibody) at day five post transplantation (original magnification: x100). Left panel: untreated, rejecting recipient. Right panel: PPG+NAL-treated recipients. The scale bar represents 100 μ m.



Supplementary Figure 3: BCA, another CSE inhibitor, prevents LPS-induced synthesis by MoDC. Maturation of MoDC was induced by LPS challenge for 24 hours in the presence of either buffer (LPS) or BCA, and supernatants were analyzed by ELISA. Results represent the relative secretion mean of IL-12p40 as compared to LPS alone (LPS), $\pm$ SEM from four independent experiments. **: $P < .01$.



Supplementary Figure 4: CSE blockade does not modify antibody responses. LEW.1W rats were immunized with DNP-Ova and treated during 19 days with NAL or PPG/NAL. Anti-DNP antibodies of the IgG1 (black histograms) and IgG2a (white histograms) isotypes were titrated. Each bar is the mean $\pm$ SEM of five animals.

II. Résultats complémentaires

1. Objectifs

Chez les animaux ayant subi une transplantation allogénique de cœur hétérotopique (précédemment décrits dans l'article ci-dessus), nous avons observé que le rejet était retardé après inhibition de la CSE. Cette enzyme étant décrite comme responsable de la production de sulfure d'hydrogène hors du système nerveux, nous avons voulu déterminer si les concentrations en sulfure d'hydrogène plasmatique étaient corrélées avec l'apparition du rejet. De même nous voulions évaluer si l'inhibition de la CSE bloquait effectivement la production de sulfure d'hydrogène

2. Méthodes

Nous avons effectué les traitements et les transplantations selon les mêmes protocoles que ceux cités précédemment dans l'article. Un suivi de la concentration en sulfure d'hydrogène plasmatique par prélèvement de sang au sinus rétro-orbital a été réalisé. Après extraction du plasma, les quantités de sulfure d'hydrogène ont été immédiatement mesurées par une technique dérivée de la méthode du bleu de méthylène citée dans l'article. Pour cela, 100µL de plasma dilué au demi dans de l'eau, et 500 µL de zinc acétate 1% ont été ajoutés, afin de piéger le H₂S plasmatique, durant 5 minutes à température ambiante (RT). Puis 200µL de DMPPDA 72mM, dans du H₂SO₄ 7,1M, ont été ajouté à la solution qui a été laissée 10 minutes à RT, afin de libérer le H₂S lié au Zn, et de le lier au DMPPDA. Après ajout de FeCl₃ 185mM (50µL) dans du H₂SO₄ 15mM, la solution a été laissée 5minutes à RT pour générer du bleu de méthylène. Enfin, 100µL de TCA 10% ont été additionnés afin d'éliminer les protéines par centrifugation. La solution résultante a été laissée 10 minutes afin de terminer la réaction, et a été lue à 670 nm au spectrophotomètre. Une courbe standard a été effectuée en parallèle avec différentes concentrations de NaHS (3-500µM). Le résultat final est exprimé en µmoles/L de plasma (cf. **Figure 1**).

3. Résultats

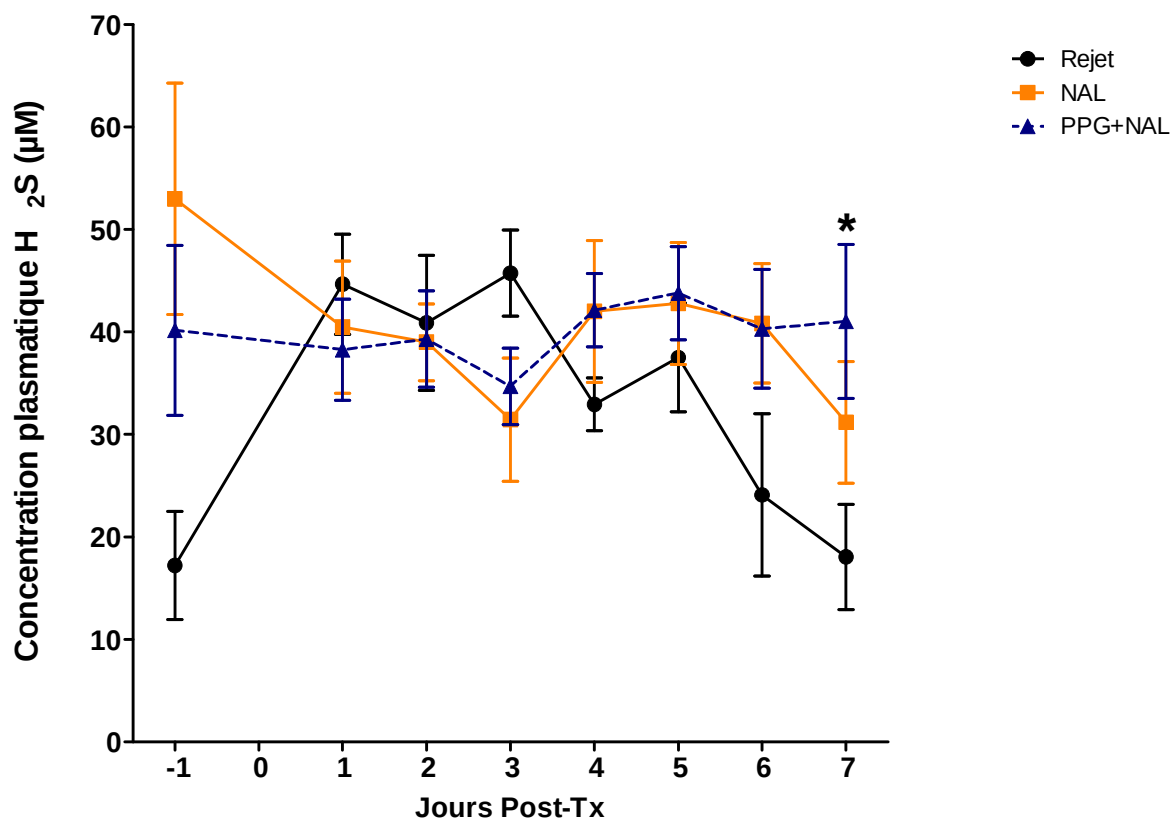


Figure 1 : Concentration en H₂S plasmatique en fonction du temps après transplantation de cœur chez le rat.

A J0, les animaux ont été traités avec du PPG + NAL (▲) (rejet >20 jours) (n=11), traités avec du NAL seul (■) (rejet de 5 à 29 jours) (n=10), ou non (●) (groupe rejetant de 5 à 7 jours) (n=9). Les résultats sont exprimés en µM de H₂S plasmatique +/- SEM. * < .05.

Pour le groupe des animaux non-traités on remarque une augmentation de la concentration en sulfure d'hydrogène (17µM +/-5, à 45µM +/-4), sans doute liée à l'inflammation causée par la chirurgie, de J-1 à J3. Puis, les niveaux baissent graduellement jusqu'à J7 pour retourner à la concentration obtenue pré-transplantation. Etrangement, la concentration plasmatique pré-transplantation en sulfure d'hydrogène semblait 3 fois supérieure pour le groupe NAL (53µM +/-1) et pour le groupe PPG+NAL (40µM +/- 8), à celle des animaux du groupe non-traités. De J1 à J5 les concentrations en sulfure d'hydrogènes pour tous les groupes sont très proches (Rejet: 39µM +/-2 ; NAL : 39µM +/-2 ; PPG+NAL : 40 +/-2), et les groupe PPG+NAL et NAL ne voient pas leur concentrations augmenter après chirurgie. De J1 à J6 ces concentrations restent relativement stables (en

moyenne 39 μ M +/- 1 pour ces deux groupes). Enfin, à J7 la concentration de H₂S diminue pour le groupe NAL (31 μ M +/-6), tandis que le groupe PPG+NAL reste au même niveau (40 μ M +/-8).

4. Discussion

En transplantation cardiaque, dans un groupe de neuf rats, nous avons observé une augmentation de sulfure d'hydrogène plasmatique après transplantation, puis une diminution de son niveau au moment du rejet. Les animaux traités au PPG+NAL, ou NAL, n'ont pas eu de variation dans leurs concentrations, mise à part une légère baisse de J6 à J7 pour le groupe NAL. Etant donné que les animaux rejettent en condition non-traitée vers J7, que les animaux traités au NAL rejettent vers J9 et que les animaux traités au PPG+NAL rejettent vers J29, il semble que la baisse d'une concentration en H₂S plasmatique soit corrélée au rejet et pourrait refléter le niveau général d'inflammation. De manière assez surprenante, l'inhibition de la CSE n'a pas empêché la production de H₂S. Ceci pourrait être dû aux rôles potentiellement prédominants joués par la CBS et par la MPST, des enzymes exprimés dans différents tissus et qui ne sont pas affectées par le PPG. Cependant, la différence de concentration observée entre les animaux naïfs (J-1) utilisés pour les différents groupes, démontre une assez mauvaise sensibilité ou reproductibilité de ce test, et rend difficile l'interprétation.

Discussion/Perspectives

Initialement, nous nous sommes intéressés à la CSE car nous avons remarqué que plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme de la cystéine étaient sous-exprimés dans différents modèles de tolérance en transplantation de rein et de cœur chez le rat, et plus particulièrement la CSE. En accord avec ces résultats, l'utilisation, *in vivo*, d'un inhibiteur irréversible de la CSE, le PPG, a permis une prolongation de la survie d'un transplant de cœur allogénique chez le rat, sans modifier l'activité des lymphocytes T en réaction mixte lymphocytaire *ex vivo*. En analysant les transcrits dans le transplant, nous avons remarqué une baisse de l'expression de l'IL-12 sans modification d'autres cytokines. L'IL-12 étant majoritairement produite par les CPA, et particulièrement par les DC (M. Xu *et al.*, 2010), nous avons remarqué que des MoDC traitées avec du PPG, en présence de LPS, ont un défaut de sécrétion d'IL-12. De manière intéressante, l'inhibition de la CSE a agi spécifiquement sur l'IL-12, puisque la surexpression des marqueurs d'activation (CD83, CD80, CD86, HLA-DR) ou la sécrétion d'IL-6, d'IL-10 et de TNF- α n'étaient pas modifiés. Cet effet n'était apparemment pas dépendant d'une modification de l'activité de NF- κ B, ou de la production de H₂S, mais était associé à une baisse des taux de cystéine intracellulaires. L'IL-12 étant essentielle dans l'établissement des réponses immunes de type Th1, nous avons effectivement remarqué que l'inhibition de la CSE, *in vivo*, a empêché un modèle de réponses Th1 (DTH) sans modifier un modèle de réponses immunes de type Th2 (réponse Ac contre la DNP-Ova).

L'efficacité de la transplantation est actuellement limitée par l'utilisation des immunosuppresseurs de par leurs effets néphrotoxiques et déprimant le système immunitaire de manière non-spécifique. Afin de s'affranchir de ces effets secondaires, l'objectif est donc d'atteindre un état de tolérance spécifique vis-à-vis du transplant. En effet, la découverte de plusieurs populations régulatrices permet d'entrevoir leur utilisation en transplantation. La tolérance en transplantation peut être maintenue par action des lymphocytes régulateurs et des cellules accessoires qui synergisent pour supprimer l'immunoréactivité des lymphocytes effecteurs allogéniques (Dugast & Vanhove, 2009). Les différentes études d'induction de tolérance démontrent l'importance des CPA, et plus particulièrement des DC dans l'initiation et le maintien de cet état (Josien *et al.*, 1998; Chiffolleau, Bériou, Dutartre, Usal, J.-P. Soulillou & M. C. Cuturi, 2002b; X. L. Li *et al.*, 2010; Degauque *et al.*, 2006; van Kooten *et al.*, 2011), cependant les divers mécanismes employés restent à être déterminés et compris. Une des conditions reconnues est la présentation d'alloantigènes en absence de costimulation,

résultant en une anergie des lymphocytes T alloréactifs, ou en une différenciation en lymphocytes T régulateurs. Un autre mécanisme consiste en une altération de la synthèse cytokinique qui entraîne une déviation Th1, Th2 ou Treg. Dans les cinq modèles de tolérance en transplantation précédemment décrits dans notre laboratoire (Degauque *et al.*, 2006; Haspot *et al.*, 2005; Josien *et al.*, 1995; Guillonnet *et al.*, 2007; Chiffolleau, Bériou, Dutartre, Usal, J.-P. Soulillou & M. C. Cuturi, 2002a), nous avons remarqué une sous-expression de la CSE. Ces résultats suggèrent donc qu'une baisse d'expression de la CSE est un mécanisme commun à tous ces modèles et indépendant du protocole d'induction de tolérance. La CSE est une enzyme clé de la voie de transsulfuration qui permet la production de cystéine à partir de méthionine, puis qui contrôle son catabolisme, résultant, entre autres, en une production de H₂S. Initialement, nous pensions que le H₂S serait responsable de la diminution de la synthèse d'IL-12 après inhibition de la CSE sur les DC. En effet, le H₂S est reconnu en tant que gasotransmetteur capable de moduler la production de cytokines et de chimiokines sur des leucocytes (Zhi *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2006), sans oublier ses effets sur le système cardiovasculaire (G. Yang *et al.*, 2008). Les effets anti-inflammatoires d'une inhibition de la CSE *in vivo* chez le rat a été corrélé à une réduction de la production de H₂S (Bhatia, Sidhapuriwala, *et al.*, 2005), suggérant que le H₂S serait le médiateur final des effets anti-inflammatoires. L'expression de la CSE a aussi été associée à la prolifération cellulaire via des mécanismes dépendants du H₂S (G. Yang *et al.*, 2004). Cependant dans nos travaux, que ce soit pour les DC ou les monocytes THP-1, la diminution d'IL-12 induite par inhibition de la CSE ne pouvait pas être assignée à une privation de H₂S, puisque une supplémentation de H₂S n'a pas antagonisé l'effet. De même, le H₂S est un inhibiteur de l'activité NF-κB (H. Zhang *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2006), or nous n'avons remarqué aucune modification de l'activité de NF-κB après inhibition de la CSE. Un autre mécanisme par lequel l'inhibition de la CSE pourrait réprimer la synthèse d'IL-12 serait par altération du contenu de GSH, qui est lui-même décrit comme régulateur de la synthèse d'IL-12 par les macrophages, par modulation du statut redox. Cependant, une déplétion de GSH inhibe l'activation de NF-κB et empêche la capacité des CPA à stimuler des lymphocytes T allogénique (G. J. McKenna *et al.*, 2006). Or, l'inhibition de la CSE n'a pas entraîné de baisse des molécules de costimulation ou du CMH de classe II, et n'a pas empêché les CPA d'induire des réponses allogéniques. Il semble donc que l'effet observé après inhibition de la CSE, et après réduction des contenus en cystéine intracellulaire soit indépendant du GSH. Les niveaux de cystéine intracellulaires chez les DC sont majoritairement dépendants de l'import de cystine à partir du milieu extracellulaire via le transporteur Xc⁻ (Z. Yan *et al.*, 2010). Nous avons aussi observé que la SAS, un inhibiteur du

transporteur Xc^- , induisait une diminution de la synthèse d'IL-12 par les DC activées au LPS. Tout ceci indique que la cystéine pourrait, par elle-même, avoir un impact direct sur la transcription de l'IL-12 dans les DC. *In vivo*, l'impact immunologique de l'inhibition de la CSE était restreint à une baisse d'IL-12 ; l'alloréactivité des lymphocytes T et des DC étant normales *ex-vivo*. La fonction principale de l'IL-12 est l'induction et la maintenance de réponses immunes de type Th1, qui sont essentielles dans les réponses antimicrobiennes contre les pathogènes intracellulaires. La DTH est typiquement une réponse immune de type Th1 qui est contrôlée par l'IL-12 (K. Kobayashi *et al.*, 2001) ; la production d'anticorps par les lymphocytes B étant médiée par le signal help fourni par les lymphocytes Th2. Le rejet allogénique en transplantation est médié par les deux types de réponses, mais les réponses Th2 peuvent être protectrices (H. Yin *et al.*, 2010). *In vivo*, l'inhibition de la CSE a empêché l'apparition d'une DTH, mais n'a pas modifié la réponse anticorps et a retardé le rejet de transplants allogéniques. Ces résultats corroborent d'anciens travaux suggérant qu'une baisse des réponses Th1, induite par neutralisation de l'IL-12 avec des anticorps, prolonge la survie d'allogreffes (X. C. Li *et al.*, 1998; Williamson *et al.*, 1997). Une observation intéressante est la baisse de l'expression de la CSE dans les transplants tolérés, suggérant une corrélation entre une réponse immune et l'expression de la CSE. L'origine de la baisse d'expression de la CSE pourrait être due à l'absence de cellules leucocytaires infiltrant le transplant exprimant la CSE. Cependant ces transplants étaient infiltrés de la même manière que chez les animaux en rejet. Une autre possibilité serait qu'il y ait une régulation de la transcription du gène *Cth*, codant pour la CSE, par les cellules infiltrant le transplant ; ce gène étant contrôlé par le FXR, un récepteur nucléaire régulé par la bile et exprimé par les tissus entérohépatiques, mais aussi par les cellules de l'immunité, tels que les macrophages (Renga *et al.*, 2009).

Il y a 30 ans, une étude avait identifié que des niveaux réduits de CSE seraient un marqueur d'immaturité dans la moelle osseuse chez l'homme (D. Link *et al.*, 1983). Comme la tolérance en transplantation est associée à une infiltration de DC immatures dans le transplant (Bériou *et al.*, 2005), il est possible que le niveau faible de CSE observé ici, reflète tout simplement l'immaturité des cellules infiltrant le transplant. Le fait que nous trouvions que les MoDC immatures produisent moins de cystéine intracellulaire que les MoDC maturées au LPS, ainsi que le rôle, que nous avons découvert, de la CSE dans l'accumulation de cystéine intracellulaire dans ces cellules soutiennent cette hypothèse. De plus, la plupart des modèles de tolérance étudiés dépendent de la présence des DC (Josien *et al.*, 1998; Chiffolleau, Bériou, Dutarte, Usal, J.-P. Soulillou & M. C. Cuturi, 2002b; X. L. Li *et al.*,

2010; Degauque *et al.*, 2006), ce qui montre le rôle central des DC dans la tolérance en transplantation. Quelque soit le mécanisme responsable de la baisse d'expression de la CSE dans les transplants tolérés, cette baisse est réminiscente de l'état d'immunosuppression associé à une infection au HIV, qui est caractérisé par une déplétion de la cystéine dans les leucocytes (Breitkreutz *et al.*, 2000).

En conclusion, nous avons trouvé qu'une baisse de l'expression de la CSE est associée à un état de tolérance en transplantation, et que la CSE contrôle spécifiquement la synthèse d'IL-12 par les DC, probablement en contrôlant les niveaux intracellulaires de cystéine. Au niveau de la physiologie de la DC, nous avons découvert que la CSE jouait un rôle important dans l'accumulation de cystéine intracellulaire, au même titre que le transporteur Xc^- . Enfin, *in vivo*, nous avons trouvé que la CSE est impliquée dans le rejet en transplantation allogénique et dans les réponses immunes de type Th1.

Par extrapolation, on peut imaginer que les pathologies associées à une déviation immune Th1 pourraient être corrigées par injection de DC autologues pour lesquels la CSE est invalidée. Ceci pourrait, par exemple, être évalué sur le modèle de diabète inducible Ins-HA (Insuline-HémAgglutinine), où les cellules pancréatiques expriment l'antigène HA. Dans ce modèle, les souris développent un diabète après injection de DC autologues, maturées au LPS avec de l'HA, suivie de l'injection de lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques de l'HA (Rémy *et al.*, 2009) ; une pathologie dépendante de l'IL-12. De même, les pathologies caractérisées par une déviation Th2 pourraient potentiellement être réversées par supplémentation en cystéine.

Bibliographie

- Abbas, A.K., Murphy, K.M. & Sher, A., 1996. *Nature*, 383(6603), 787-793.
- Abe, K. & Kimura, H., 1996. *J. Neurosci*, 16(3), 1066-1071.
- Adachi, O. *et al.*, 1998. *Immunity*, 9(1), 143-150.
- Afzali, B., Lechler, R.I. & Hernandez-Fuentes, M.P., 2007. *Tissue Antigens*, 69(6), 545-556.
- Afzali, B., Lombardi, G., *et al.*, 2007. *Clin. Exp. Immunol*, 148(1), 32-46.
- Akahoshi, N. *et al.*, 2008. *Hum. Mol. Genet*, 17(13), 1994-2005.
- Akashi, K. *et al.*, 2000. *Nature*, 404(6774), 193-197.
- Akl, A., Luo, S. & Wood, K.J., 2005. *Transpl. Immunol*, 14(3-4), 225-230.
- Aksoy, E. *et al.*, 2005. *Eur. J. Immunol*, 35(7), 2200-2209.
- Alam, K. *et al.*, 2010. *J. Immunol*, 184(6), 2918-2929.
- Alam, S.M. *et al.*, 1996. *Nature*, 381(6583), 616-620.
- Albert, M.L., Jegathesan, M. & Darnell, R.B., 2001. *Nat. Immunol*, 2(11), 1010-1017.
- Albert, M.L. *et al.*, 1998. *J. Exp. Med*, 188(7), 1359-1368.
- Alexopoulou, L. *et al.*, 2001. *Nature*, 413(6857), 732-738.
- Almirall, J. *et al.*, 1993. *Nephron*, 65(2), 304-309.
- Alonso, M.N. *et al.*, 2011. *Blood*.
- Altfield, M. *et al.*, 2011. *Nat. Rev. Immunol*, 11(3), 176-186.
- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M. & Betz, A.G., 2004. *Nat. Immunol*, 5(3), 266-271.
- Amarnath, S. *et al.*, 2011. A. Gregson, éd. *PLoS ONE*, 6(4), e18885.
- Amigorena, S. & Savina, A., 2010. *Curr. Opin. Immunol*, 22(1), 109-117.
- An, H. *et al.*, 2006. *Immunity*, 25(6), 919-928.
- Anderson, M.S. *et al.*, 2002. *Science*, 298(5597), 1395-1401.
- von Andrian, U.H. & Mackay, C.R., 2000. *N. Engl. J. Med*, 343(14), 1020-1034.
- Angelini, G. *et al.*, 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3), 1491-6.
- Arpinati, M. *et al.*, 2000. *Blood*, 95(8), 2484-2490.
- Arslan, F. *et al.*, 2010. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1-8.
- Aschenbrenner, K. *et al.*, 2007. *Nat Immunol*, 8(4), 351-358.
- Atalar, K. *et al.*, 2009. *Curr Opin Organ Transplant*, 14(1), 23-29.
- Auchincloss, H., Jr *et al.*, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90(8), 3373-3377.
- Badley, A.D. *et al.*, 1997. *J. Exp. Med*, 185(1), 55-64.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M., 1998. *Nature*, 392(6673), 245-252.
- Banerjee, R.V. *et al.*, 1990. *Biochemistry*, 29(50), 11101-11109.
- Bannai, S., 1984. *Biochim. Biophys. Acta*, 779(3), 289-306.
- Baratelli, F. *et al.*, 2010. *Am J Transl Res*, 2(4), 356-367.
- Bearden, S.E., Beard, R.S., Jr & Pfau, J.C., 2010. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 299(5), H1568-1576.
- Bell, J.K. *et al.*, 2003. *Trends in Immunology*, 24(10), 528-533.
- Belvin, M.P. & Anderson, K.V., 1996. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 12, 393-416.
- Bendris-Vermare, N. *et al.*, 2001. *J. Clin. Invest*, 107(7), 835-844.
- Benichou, G., 1999. *Front. Biosci*, 4, D476-480.
- Bériou, G. *et al.*, 2005. *Transplantation*, 79(8), 969-972.
- Bevan, M.J., 1987. *Nature*, 325(6101), 192-194.
- Beverly, B. *et al.*, 1992. *Int. Immunol*, 4(6), 661-671.
- Bhatia, M., Sidhapuriwala, J., *et al.*, 2005. *Br. J. Pharmacol*, 145(2), 141-144.
- Bhatia, M., Wong, F.L., *et al.*, 2005. *FASEB J*, 19(6), 623-5.
- Billingham, R.E., Brent, L. & Medawar, P.B., 1953. *Nature*, 172(4379), 603-606.
- Birnberg, T. *et al.*, 2008. *Immunity*, 29(6), 986-997.

- Bjorkman, P.J. *et al.*, 1987. *Nature*, 329(6139), 512-518.
- Bjorndahl, J.M. *et al.*, 1989. *Eur. J. Immunol*, 19(5), 881-887.
- Blancou, P. & Anegon, I., 2010. *J. Leukoc. Biol*, 87(2), 185-187.
- Bluestone, J.A. *et al.*, 2009. *Nat. Rev. Immunol*, 9(11), 811-816.
- Böhmig, G.A. *et al.*, 2009. *Hum. Immunol*, 70(8), 640-644.
- Boone, D.L. *et al.*, 2004. *Nat. Immunol*, 5(10), 1052-1060.
- Bos, E.M. *et al.*, 2007. *Kidney Int*, 72(7), 797-805.
- Bose, A. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 170(4), 1611-1614.
- Boulé, M.W. *et al.*, 2004. *J. Exp. Med*, 199(12), 1631-1640.
- Bradley, L.M. *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 162(5), 2511-2520.
- Braudeau, C. *et al.*, 2004. *Gene Ther*, 11(8), 701-710.
- Braun, M.Y. *et al.*, 2000. *Eur. J. Immunol*, 30(5), 1290-1296.
- Braun, M.Y. *et al.*, 1993. *Transplantation*, 55(1), 177-182.
- Breitkreutz, R. *et al.*, 2000. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 16(3), 203-209.
- Brenan, M. & Puklavec, M., 1992. *J. Exp. Med*, 175(6), 1457-1465.
- Brenan, M. & Rees, D.J., 2000. *Eur. J. Immunol*, 30(6), 1527-1537.
- Brenk, M. *et al.*, 2009. *J. Immunol*, 183(1), 145-154.
- Brocker, T., Riedinger, M. & Karjalainen, K., 1997. *J. Exp. Med*, 185(3), 541-550.
- Brodsky, F.M., Lem, L. & Bresnahan, P.A., 1996. *Tissue Antigens*, 47(6), 464-471.
- Bronte, V. *et al.*, 2003. *Trends Immunol*, 24(6), 302-306.
- Brosnan, J.T. & Brosnan, M.E., 2006. *J. Nutr*, 136(6 Suppl), 1636S-1640S.
- Brusko, T.M., Putnam, A.L. & Bluestone, J.A., 2008. *Immunological Reviews*, 223(1), 371-390.
- Bühler, L.H. *et al.*, 2002. *Transplantation*, 74(10), 1405-1409.
- Buer, J. *et al.*, 1998. *J. Exp. Med*, 187(2), 177-183.
- Burns, K. *et al.*, 2003. *J. Exp. Med*, 197(2), 263-268.
- Calvert, J.W., Coetzee, W.A. & Lefer, D.J., 2010. *Antioxid. Redox Signal*, 12(10), 1203-1217.
- Calvert, J.W., Elston, M., *et al.*, 2010. *Circulation*, 122(1), 11-19.
- Carter, R., 1993. *World J Surg*, 17(4), 563-565.
- Carty, M. *et al.*, 2006. *Nat. Immunol*, 7(10), 1074-1081.
- Castellani, P. *et al.*, 2008. *European Journal of Immunology*, 38(9), 2419-2425.
- Castiello, L. *et al.*, 2011. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60, 457-466.
- Caux, C. *et al.*, 1997. *Blood*, 90(4), 1458-1470.
- Caux, C. *et al.*, 1994. *J. Exp. Med*, 180(4), 1263-1272.
- Caux, C. *et al.*, 1996. *J. Exp. Med*, 184(2), 695-706.
- Cella, M. *et al.*, 1996. *J. Exp. Med*, 184(2), 747-752.
- Cerf-Bensussan, N. *et al.*, 1987. *Eur. J. Immunol*, 17(9), 1279-1285.
- Cerundolo, V. *et al.*, 1995. *Eur. J. Immunol*, 25(2), 554-562.
- Chai, J.G. *et al.*, 1998. *J. Immunol*, 160(8), 3655-3665.
- Chalmin, F. *et al.*, 2010. *J. Clin. Invest.*, 120(2), 457-471.
- Chambers, C.A. & Allison, J.P., 1999. *Curr. Opin. Cell Biol*, 11(2), 203-210.
- Chang, C.C., Wright, A. & Punnonen, J., 2000. *J. Immunol*, 165(7), 3584-3591.
- Chaux, P. *et al.*, 1993. *Eur. J. Immunol*, 23(10), 2517-2525.
- Chen, D. *et al.*, 2003. *Am. J. Transplant*, 3(12), 1538-1549.
- Chen, Z.J., 2005. *Nat. Cell Biol*, 7(8), 758-765.
- Cheong, C. *et al.*, 2010. *Cell*, 143(3), 416-429.
- Chiffolleau, E., Bériou, G., Dutartre, P., Usal, C., Soullillou, J.-P. & Cuturi, M.C., 2002a. *Am J Transplant*, 2(8), 745-57.
- Chiffolleau, E., Bériou, G., Dutartre, P., Usal, C., Soullillou, J.-P. & Cuturi, M.C., 2002b. *J. Immunol*, 168(10), 5058-5069.

- Chiku, T. *et al.*, 2009. *J. Biol. Chem*, 284(17), 11601-11612.
- Chikuma, S. *et al.*, 2009. *J. Immunol*, 182(11), 6682-6689.
- Chomarat, P. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 171(5), 2262-2269.
- Chu, C.-C., Di Meglio, P. & Nestle, F.O., 2011. *Semin. Immunol*, 23(1), 28-41.
- Chuang, T. & Ulevitch, R.J., 2001. *Biochim. Biophys. Acta*, 1518(1-2), 157-161.
- Chung, Y. *et al.*, 2011. *Nat. Med*, 17(8), 983-988.
- Cisse, B. *et al.*, 2008. *Cell*, 135(1), 37-48.
- Clipstone, N.A. & Crabtree, G.R., 1992. *Nature*, 357(6380), 695-697.
- Coates, P.T. *et al.*, 2001. *Gene Ther*, 8(16), 1224-1233.
- Cobbold, S.P. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 172(10), 6003-6010.
- Collin, M. *et al.*, 2005. *Br. J. Pharmacol*, 146(4), 498-505.
- Collins, T. *et al.*, 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 81(15), 4917-4921.
- Corbascio, M. *et al.*, 2002. *Transplantation*, 74(1), 35-41.
- Cornélie, S. *et al.*, 2004. *J. Biol. Chem*, 279(15), 15124-15129.
- Cottrez, F. & Groux, H., 2004. *Transplantation*, 77(Supplement), S12-S15.
- Covert, M.W. *et al.*, 2005. *Science*, 309(5742), 1854-1857.
- Cresswell, P. *et al.*, 1999. *Immunol. Rev*, 172, 21-28.
- Critchfield, J.M. *et al.*, 1994. *Science*, 263(5150), 1139-1143.
- Crozat, K. *et al.*, 2010. *J. Exp. Med*, 207(6), 1283-1292.
- Csorba, T.R., Lyon, A.W. & Hollenberg, M.D., 2010. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 47(2), 51-71.
- Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J., 2009. *Immunity*, 30(5), 626-635.
- Cusson-Hermance, N. *et al.*, 2005. *J. Biol. Chem*, 280(44), 36560-36566.
- Cybulsky, M.I. & Jongstra-Bilen, J., 2010. *Curr. Opin. Lipidol*, 21(5), 397-403.
- D'Elios, M.M. *et al.*, 1997. *Kidney Int*, 51(6), 1876-1884.
- Dabbagh, K. & Lewis, D.B., 2003. *Curr. Opin. Infect. Dis*, 16(3), 199-204.
- Dalloul, A.H. *et al.*, 1996. *J. Immunol*, 156(11), 4114-4119.
- Daniel, C., Horvath, S. & Allen, P.M., 1998. *Immunity*, 8(5), 543-552.
- Darrasse-Jèze, G. *et al.*, 2006. *Immunol. Lett*, 102(1), 106-109.
- Dausset, J., 1958. *Acta Haematol*, 20(1-4), 156-166.
- Degauque, N. *et al.*, 2006. *J Immunol*, 176(7), 3915-22.
- Delves, P.J. & Roitt, I.M., 2000. *N. Engl. J. Med*, 343(1), 37-49.
- Desai, D.D. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 178(10), 6217-6226.
- Dhodapkar, M.V. *et al.*, 2001. *J. Exp. Med*, 193(2), 233-238.
- Diebold, S.S. *et al.*, 2004. *Science*, 303(5663), 1529-1531.
- Diebold, S.S. *et al.*, 2003. *Nature*, 424(6946), 324-328.
- Diwakar, L. & Ravindranath, V., 2007. *Neurochem. Int*, 50(2), 418-426.
- Dröge, W. *et al.*, 1988. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369(3), 143-148.
- Dugast, A.-S. & Vanhove, B., 2009. *Clin. Exp. Immunol.*, 156(1), 25-34.
- Dugast, A.-S. *et al.*, 2008. *J Immunol*, 180(12), 7898-906.
- Dunne, A. *et al.*, 2003. *J. Biol. Chem*, 278(42), 41443-41451.
- Dzionek, A. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 165(11), 6037-6046.
- Eagle, H., Washington, C. & Friedman, S.M., 1966. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 56(1), 156-163.
- Emamaullee, J.A. *et al.*, 2010. *Diabetes*, 59(6), 1469-1477.
- Erridge, C., 2010. *J. Leukoc. Biol*, 87(6), 989-999.
- Eto, K. *et al.*, 2002. *J. Neurosci*, 22(9), 3386-3391.
- Fallarino, F. & Grohmann, U., 2011. *Curr. Med. Chem*, 18(15), 2215-2221.
- Fallarino, F., Fields, P.E. & Gajewski, T.F., 1998. *J. Exp. Med*, 188(1), 205-210.
- Fangmann, J., Dalchau, R. & Fabre, J.W., 1992. *J. Exp. Med*, 175(6), 1521-1529.
- Fazilleau, N. *et al.*, 2009. *Immunity*, 30(3), 324-335.

- Ferber, I. *et al.*, 1994. *Science*, 263(5147), 674-676.
- Fernandez, N.C. *et al.*, 1999. *Nat. Med*, 5(4), 405-411.
- Fernández-Lago, L., Rodríguez-Tarazona, E. & Vizcaíno, N., 1999. *J. Med. Microbiol*, 48(12), 1065-1073.
- Fitzgerald, K.A. *et al.*, 2003. *J. Exp. Med*, 198(7), 1043-1055.
- Förster, I. *et al.*, 1995. *Immunity*, 2(6), 573-585.
- Franchimont, D., 2004. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1024, 124-137.
- Fraternale, A. *et al.*, 2011. *Vaccine*.
- Fraternale, A. *et al.*, 2010. *Vaccine*, 28(48), 7676-7682.
- Freeman, G.J. *et al.*, 2000. *J. Exp. Med*, 192(7), 1027-1034.
- Freitas, R., 1999. *Nanomedicine*, Austin TX: Landes Bioscience.
- Gadalla, M.M. & Snyder, S.H., 2010. *Journal of Neurochemistry*, 113(1), 14-26.
- Gallin, J., 1999. *Inflammation : basic principles and clinical correlates* 3^e éd., Philadelphia PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P., 1999. *Nat. Med*, 5(11), 1249-1255.
- Garg, S.K. *et al.*, 2011. *Antioxid. Redox Signal*, 15(1), 39-47.
- Gautam, J.K. *et al.*, 2006. *J. Biol. Chem*, 281(40), 30132-30142.
- George, J.F. *et al.*, 2008. *Am. J. Pathol*, 173(1), 154-160.
- Germain, R.N. & Margulies, D.H., 1993. *Annu. Rev. Immunol*, 11, 403-450.
- Gimmi, C.D. *et al.*, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90(14), 6586-6590.
- Glover, T., 2003. *Pocket ref* 3^e éd., Littleton Colo.: Sequoia Pub.
- Gmünder, H., Eck, H.P. & Dröge, W., 1991. *Eur. J. Biochem*, 201(1), 113-117.
- Gohda, J., Matsumura, T. & Inoue, J.-I., 2004. *J. Immunol*, 173(5), 2913-2917.
- Goldrath, A.W. & Bevan, M.J., 1999. *Nature*, 402(6759), 255-262.
- Goubier, A. *et al.*, 2008. *Immunity*, 29(3), 464-475.
- Grauer, O. *et al.*, 2002. *Histochem. Cell Biol*, 117(4), 351-362.
- Gray, P. *et al.*, 2006. *J. Biol. Chem*, 281(15), 10489-10495.
- Greenwood, N., 1997. *Chemistry of the elements* 2^e éd., Oxford ;; Boston: Butterworth-Heinemann.
- Grouard, G. *et al.*, 1997. *J. Exp. Med*, 185(6), 1101-1111.
- Guillonnet, C. *et al.*, 2005. *Transplantation*, 80(4), 546-554.
- Guillonnet, C. *et al.*, 2007. *J. Clin. Invest*, 117(4), 1096-1106.
- Häcker, H. *et al.*, 2006. *Nature*, 439(7073), 204-207.
- Hackstein, H. & Thomson, A.W., 2004. *Nat. Rev. Immunol*, 4(1), 24-34.
- Hadeiba, H. *et al.*, 2008. *Nat. Immunol*, 9(11), 1253-1260.
- Hamelet, J., Demuth, K., *et al.*, 2007. *J. Hepatol*, 46(1), 151-159.
- Hamelet, J., Maurin, N., *et al.*, 2007. *Exp. Mol. Pathol*, 83(2), 249-253.
- Hamelet, J. *et al.*, 2008. *Biochim. Biophys. Acta*, 1782(7-8), 482-488.
- Han, K.-J. *et al.*, 2004. *J. Biol. Chem*, 279(15), 15652-15661.
- Hancock, W.W. *et al.*, 1998. *Nat. Med*, 4(12), 1392-1396.
- Hart, D.N., 1997. *Blood*, 90(9), 3245-3287.
- Hart, D.N. & Fabre, J.W., 1981. *J. Exp. Med*, 154(2), 347-361.
- Hasan, U. *et al.*, 2005. *J. Immunol*, 174(5), 2942-2950.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L. & Anderson, K.V., 1988. *Cell*, 52(2), 269-279.
- Haspot, F. *et al.*, 2005. *Am J Transplant*, 5(10), 2339-48.
- Hayashi, F. *et al.*, 2001. *Nature*, 410(6832), 1099-1103.
- Heeger, P.S., 2003. *Am. J. Transplant*, 3(5), 525-533.
- Heil, F. *et al.*, 2003. *Eur. J. Immunol*, 33(11), 2987-2997.
- Hemmi, H. *et al.*, 2002. *Nat. Immunol*, 3(2), 196-200.
- Hemmi, H. *et al.*, 2000. *Nature*, 408(6813), 740-745.

- Hemmi, H. *et al.*, 2001. *Int. Immunol*, 13(5), 695-704.
- Highfill, S.L. *et al.*, 2010. *Blood*, 116(25), 5738-5747.
- Hill, M. *et al.*, 2011. *Am J Transplant*.
- Hirschfeld, M. *et al.*, 2001. *Infect. Immun*, 69(3), 1477-1482.
- Ho, I.-C. & Glimcher, L.H., 2002. *Cell*, 109 Suppl, S109-120.
- Hochrein, H. *et al.*, 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(31), 11416-11421.
- Hoebe, K. *et al.*, 2003. *Nat. Immunol*, 4(12), 1223-1229.
- Hogquist, K.A. & Bevan, M.J., 1996. *Semin. Immunol*, 8(2), 63-68.
- Holt, P.G., Schon-Hegrad, M.A. & Oliver, J., 1988. *J. Exp. Med*, 167(2), 262-274.
- Holzkecht, Z.E. *et al.*, 2002. *Circ. Res*, 91(12), 1135-1141.
- Honda, K. *et al.*, 2005. *Nature*, 434(7036), 1035-1040.
- Hornig, T., Barton, G.M. & Medzhitov, R., 2001. *Nat. Immunol*, 2(9), 835-841.
- Hornick, P.I. *et al.*, 2000. *Circulation*, 101(20), 2405-2410.
- Hoves, S. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(4), 2691-2698.
- Hu, L.-F. *et al.*, 2011. *Antioxid. Redox Signal*, 15(2), 405-419.
- Huang, F.P. *et al.*, 1998. *Eur. J. Immunol*, 28(12), 4062-4070.
- Huang, F.P. *et al.*, 2000. *J. Exp. Med*, 191(3), 435-444.
- Huang, J.F. *et al.*, 1999. *Science*, 286(5441), 952-954.
- Huard, B. *et al.*, 1994. *Eur. J. Immunol*, 24(12), 3216-3221.
- Hughes, M.N., Centelles, M.N. & Moore, K.P., 2009. *Free Radic. Biol. Med*, 47(10), 1346-1353.
- Illigens, B.M. *et al.*, 2009. *Eur. J. Immunol*, 39(11), 3000-3009.
- Inaba, K. *et al.*, 1998. *J. Exp. Med*, 188(11), 2163-2173.
- Inaba, K., Witmer, M.D. & Steinman, R.M., 1984. *J. Exp. Med*, 160(3), 858-876.
- Inohara, N. *et al.*, 2001. *J. Biol. Chem*, 276(4), 2551-2554.
- Ishii, I. *et al.*, 2010. *J. Biol. Chem*, 285(34), 26358-26368.
- Ito, A. *et al.*, 2008. *Int. Immunol*, 20(10), 1343-1349.
- Iwashima, M. *et al.*, 1994. *Science*, 263(5150), 1136-1139.
- Janeway & Medzhitov, 1998. *Semin. Immunol*, 10(5), 349-350.
- Janeway, C.A., Jr, 1989. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*, 54 Pt 1, 1-13.
- Janssens, S. *et al.*, 2003. *FEBS Lett*, 548(1-3), 103-107.
- Jefferies, C.A. *et al.*, 2003. *J. Biol. Chem*, 278(28), 26258-26264.
- Jenkins, M.K. & Schwartz, R.H., 1987. *J. Exp. Med*, 165(2), 302-319.
- Jiang, A. *et al.*, 2007. *Immunity*, 27(4), 610-624.
- Jiang, Q. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 165(7), 3541-3544.
- Jiang, X.-F. *et al.*, 2010. *Int Surg*, 95(2), 135-141.
- Jiang, Z. *et al.*, 2005. *Nat. Immunol*, 6(6), 565-570.
- Jiang, Z. *et al.*, 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(10), 3533-3538.
- Jones, N.D. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 165(2), 1111-1118.
- de Jong, E.C. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 168(4), 1704-1709.
- Josien, R. *et al.*, 1998. *Blood*, 92(12), 4539-4544.
- Josien, R. *et al.*, 1997. *J. Exp. Med*, 186(3), 467-472.
- Josien, R. *et al.*, 1995. *Transplantation*, 60(10), 1131-1139.
- Ju, S.T. *et al.*, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(10), 4185-4189.
- Kagan, J.C. & Medzhitov, R., 2006. *Cell*, 125(5), 943-955.
- Kaisho, T. *et al.*, 2001. *J. Immunol*, 166(9), 5688-5694.
- Kamon, H. *et al.*, 2006. *EMBO J*, 25(17), 4108-4119.
- Kamoun, P., 2004. *Amino Acids*, 26(3).
- Kamoun, P., 2001. *Med. Hypotheses*, 57(3), 389-392.
- Kandil, S., Brennan, L. & McBean, G.J., 2010. *Neurochem. Int*, 56(4), 611-619.

- Kapsenberg, M.L., 2003. *Nat. Rev. Immunol*, 3(12), 984-993.
- Karczewski, J. *et al.*, 2008. *Transplant. Proc*, 40(10), 3390-3392.
- Karikó, K. *et al.*, 2005. *Immunity*, 23(2), 165-175.
- Katz, J.B., Muller, A.J. & Prendergast, G.C., 2008. *Immunol. Rev*, 222, 206-221.
- Kawai, T. *et al.*, 1999. *Immunity*, 11(1), 115-122.
- Kawai, T. *et al.*, 1995. *Transplantation*, 59(2), 256-262.
- Kawai, T. *et al.*, 2008. *N. Engl. J. Med*, 358(4), 353-361.
- Kawai, T. *et al.*, 2004. *Nat. Immunol*, 5(10), 1061-1068.
- Kim, C.H., Nagata, K. & Butcher, E.C., 2003. *J. Immunol*, 171(1), 152-158.
- Kim, H.-J. *et al.*, 2007. *J. Allergy Clin. Immunol*, 119(5), 1225-1233.
- Kimura, A. & Kishimoto, T., 2011. *International Immunopharmacology*, 11(3), 319-322.
- Kloetzel, P.M. & Ossendorp, F., 2004. *Curr. Opin. Immunol*, 16(1), 76-81.
- Knoechel, B. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 176(11), 6473-6483.
- Kobayashi, K. *et al.*, 2002. *Cell*, 110(2), 191-202.
- Kobayashi, K., Kaneda, K. & Kasama, T., 2001. *Microsc. Res. Tech.*, 53(4), 241-245.
- van Kooten, C. *et al.*, 2011. *Transplantation*, 91(1), 2-7.
- Koshiba, T. *et al.*, 2003. *Transplantation*, 76(3), 588-596.
- Kosieradzki, M. & Rowiński, W., 2008. *Transplant. Proc*, 40(10), 3279-3288.
- Kown, M.H. *et al.*, 2000. *Circulation*, 102(19 Suppl 3), III228-232.
- Kreisel, D., Krupnick, A.S., Balsara, K.R., *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 169(11), 6154-6161.
- Kreisel, D., Krupnick, A.S., Gelman, A.E., *et al.*, 2002. *Nat. Med*, 8(3), 233-239.
- Krug, A. *et al.*, 2001. *Eur. J. Immunol*, 31(7), 2154-2163.
- Krupnick, A.S. *et al.*, 2002. *Transplantation*, 74(6), 871-876.
- Kung, J.T. *et al.*, 1977. *J. Exp. Med*, 146(3), 665-672.
- Kuppner, M.C. *et al.*, 2003. *Blood*, 102(10), 3668-3674.
- Kurts, C. *et al.*, 1997. *J. Exp. Med*, 186(12), 2057-2062.
- Kurtz, J. *et al.*, 2004. *Blood*, 103(11), 4336-4343.
- Lakkis, F.G. *et al.*, 2000. *Nat. Med*, 6(6), 686-688.
- Langenkamp, A. *et al.*, 2000. *Nat. Immunol*, 1(4), 311-316.
- Langerhans, P., 1868. *Archiv f. pathol. Anat.*, 44(2-3), 325-337.
- LaRosa, D.F., Rahman, A.H. & Turka, L.A., 2007. *J. Immunol*, 178(12), 7503-7509.
- Lasky, L.A., 1992. *Science*, 258(5084), 964-969.
- Latz, E. *et al.*, 2004. *Nat. Immunol*, 5(2), 190-198.
- Lautwein, A. *et al.*, 2002. *Eur. J. Immunol*, 32(12), 3348-3357.
- Leadbetter, E.A. *et al.*, 2002. *Nature*, 416(6881), 603-607.
- Lehner, P.J. & Cresswell, P., 1996. *Curr. Opin. Immunol*, 8(1), 59-67.
- Lehninger, A., 2000. *Principios de bioquímica* 3^e éd., New York: Worth Publishers.
- Leventhal, J.R. *et al.*, 1993. *Transplantation*, 56(1), 1-8.
- Levings, M.K. *et al.*, 2002. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 129(4), 263-276.
- Li, J. *et al.*, 2007. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 293(6), H3415-3423.
- Li, X.C. *et al.*, 1998. *J. Immunol.*, 161(5), 2241-2247.
- Li, X.L. *et al.*, 2010. *J. Immunol*, 185(2), 823-833.
- Liang, X. *et al.*, 2003. *Transplantation*, 76(4), 721-729.
- Libetta, C. *et al.*, 2007. *Kidney Int*, 72(1), 114-120.
- Lin, C.L. *et al.*, 1998. *Eur. J. Immunol*, 28(12), 4114-4122.
- Lin, E., Calvano, S.E. & Lowry, S.F., 2000. *Surgery*, 127(2), 117-126.
- Lindstedt, M., Lundberg, K. & Borrebaeck, C.A.K., 2005. *J. Immunol*, 175(8), 4839-4846.
- Link, D., Drebing, C. & Glode, L.M., 1983. *Blut*, 47(1), 31-39.
- Liu, L. *et al.*, 1998. *J. Immunol*, 161(3), 1146-1155.
- Liu, Z. *et al.*, 1996. *J. Clin. Invest*, 98(5), 1150-1157.

- Lohr, J., Knoechel, B. & Abbas, A.K., 2006. *Immunol. Rev*, 212, 149-162.
- Louis, S. *et al.*, 2006. *Transplantation*, 81(3), 398-407.
- Loukas, M. *et al.*, 2010. *J. Anat*, 217(6), 646-650.
- Loverre, A. *et al.*, 2011. *Transpl. Int*, 24(3), 233-242.
- Luther, S.A. & Cyster, J.G., 2001. *Nat. Immunol*, 2(2), 102-107.
- Lyakh, L. *et al.*, 2008. *Immunological Reviews*, 226, 112-131.
- Ma, X. & Montaner, L.J., 2000. *J. Leukoc. Biol*, 68(3), 383-390.
- Ma, X. & Trinchieri, G., 2001. *Adv. Immunol.*, 79, 55-92.
- MacDonald, K.P.A. *et al.*, 2002. *Blood*, 100(13), 4512-4520.
- Mahnke, K. *et al.*, 2003. *Blood*, 101(12), 4862-4869.
- Maier, S. *et al.*, 2001. *Nat. Med*, 7(5), 557-562.
- Manavalan, J.S. *et al.*, 2003. *Transpl. Immunol*, 11(3-4), 245-258.
- Manicassamy, S. & Pulendran, B., 2011. *Immunol. Rev*, 241(1), 206-227.
- Manicassamy, S. *et al.*, 2009. *Nat. Med*, 15(4), 401-409.
- Mansell, A. *et al.*, 2006. *Nat. Immunol*, 7(2), 148-155.
- Maraskovsky, E. *et al.*, 2000. *Blood*, 96(3), 878-884.
- Maric, I. *et al.*, 1996. *J. Immunol*, 156(4), 1408-1414.
- Martinez, O.M. *et al.*, 1993. *Transplantation*, 55(4), 909-918.
- de la Mata, M., Riera, C.M. & Iribarren, P., 2001. *Clin. Immunol*, 101(3), 371-378.
- Matsumoto, M. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 171(6), 3154-3162.
- Matzinger, P., 1994. *Annu. Rev. Immunol*, 12, 991-1045.
- Mauzyedy, S. & Colvin, R.B., 2002. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*, 11(6), 609-618.
- Mazzoni, A. & Segal, D.M., 2004. *J. Leukoc. Biol*, 75(5), 721-730.
- Mc Dermott, R. *et al.*, 2002. *Mol. Biol. Cell*, 13(1), 317-335.
- McCarthy, G.P. & Roberts, I.S.D., 2002. *Transplantation*, 73(9), 1518-1521.
- McCaughy, T.M. *et al.*, 2008. *J. Exp. Med*, 205(11), 2575-2584.
- McCurdy, J.D., Lin, T.J. & Marshall, J.S., 2001. *J. Leukoc. Biol*, 70(6), 977-984.
- McEver, R.P. & Cummings, R.D., 1997. *J. Clin. Invest*, 100(11 Suppl), S97-103.
- McGettrick, A.F. *et al.*, 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103(24), 9196-9201.
- McIlroy, D. *et al.*, 2001. *Blood*, 97(11), 3470-3477.
- McKenna, G.J. *et al.*, 2006. *Am. J. Surg*, 191(5), 588-592.
- McKenna, H.J. *et al.*, 2000. *Blood*, 95(11), 3489-3497.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr, 1997. *Nature*, 388(6640), 394-397.
- Mellor, A.L. & Munn, D.H., 2004. *Nat. Rev. Immunol*, 4(10), 762-774.
- Merad, M., Ginhoux, F. & Collin, M., 2008. *Nat. Rev. Immunol*, 8(12), 935-947.
- Merrill, J.P. *et al.*, 1956. *J Am Med Assoc*, 160(4), 277-282.
- Metkar, S.S. *et al.*, 2002. *Immunity*, 16(3), 417-428.
- Meylan, E. *et al.*, 2004. *Nat. Immunol*, 5(5), 503-507.
- Michon, L. *et al.*, 1953. *Presse Med*, 61(70), 1419-1423.
- Miller, J.F., 1961. *Lancet*, 2(7205), 748-749.
- Le Moine, A., Flamand, V., *et al.*, 1999. *J. Clin. Invest*, 103(12), 1659-1667.
- Le Moine, A., Goldman, M. & Abramowicz, D., 2002. *Transplantation*, 73(9), 1373-1381.
- Le Moine, A., Surquin, M., *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 163(7), 3778-3784.
- Mold, J.E. *et al.*, 2008. *Science*, 322(5907), 1562-1565.
- Moreau, A. *et al.*, 2009. *FASEB J*, 23(9), 3070-3077.
- Moreau, P. *et al.*, 1998. *Am. J. Reprod. Immunol*, 40(3), 136-144.
- Morel, S. *et al.*, 2000. *Immunity*, 12(1), 107-117.
- Moriarty-Craige, S.E. & Jones, D.P., 2004. *Annu. Rev. Nutr.*, 24(1), 481-509.
- Morón, G., Dadaglio, G. & Leclerc, C., 2004. *Trends Immunol*, 25(2), 92-97.
- Morris, P.J., 2004. *N. Engl. J. Med*, 351(26), 2678-2680.

- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L., 1989. *Annu. Rev. Immunol*, 7, 145-173.
- Mosmann, T.R. *et al.*, 1986. *J. Immunol*, 136(7), 2348-2357.
- Mullen, A.C. *et al.*, 2001. *Science*, 292(5523), 1907-1910.
- Munn, D.H. *et al.*, 2002. *Science*, 297(5588), 1867-1870.
- Munn, D.H. *et al.*, 1998. *Science*, 281(5380), 1191-1193.
- Murphy, K.M. & Reiner, S.L., 2002. *Nat. Rev. Immunol*, 2(12), 933-944.
- Murphy, W.J., Kumar, V. & Bennett, M., 1987. *J. Exp. Med*, 165(4), 1212-1217.
- Mustafa, A.K. *et al.*, 2009. *Sci Signal*, 2(96), ra72.
- Muzio, M. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 164(11), 5998-6004.
- Naiki, Y. *et al.*, 2005. *J. Biol. Chem*, 280(7), 5491-5495.
- Nakashima, S. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 169(8), 4620-4627.
- Narula, J. *et al.*, 2001. *Nat. Med*, 7(12), 1347-1352.
- Negishi, H. *et al.*, 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103(41), 15136-15141.
- Nestle, F.O. *et al.*, 1993. *J. Immunol*, 151(11), 6535-6545.
- Netea, M.G. *et al.*, 2005. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49(10), 3991-3996.
- Ni Choileain, N. & Redmond, H.P., 2006. *Arch Surg*, 141(11), 1132-1140.
- Nijman, H.W. *et al.*, 1995. *J. Exp. Med*, 182(1), 163-174.
- Nomura, F. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 164(7), 3476-3479.
- Nossal, G.J., 1994. *Cell*, 76(2), 229-239.
- Noval Rivas, M. *et al.*, 2010. *J. Immunol*, 184(12), 6790-6798.
- Nuño-Ayala, M. *et al.*, 2010. *Atherosclerosis*, 212(1), 268-273.
- O'Doherty, U. *et al.*, 1994. *Immunology*, 82(3), 487-493.
- O'Neill, L.A.J. & Bowie, A.G., 2007. *Nat Rev Immunol*, 7(5), 353-364.
- Obata, F. *et al.*, 2005. *Transpl. Immunol*, 14(1), 21-25.
- Ochando, J.C. *et al.*, 2006. *Nat. Immunol*, 7(6), 652-662.
- Ochoa, J.B. *et al.*, 2001. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 25(1), 23-29.
- Ogura, Y. *et al.*, 2001. *Transplantation*, 71(12), 1827-1834.
- Oh, G.-S. *et al.*, 2006. *Free Radic. Biol. Med.*, 41(1), 106-119.
- Ohashi, P.S. *et al.*, 1991. *Cell*, 65(2), 305-317.
- Ohnmacht, C. *et al.*, 2009. *J. Exp. Med*, 206(3), 549-559.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., *et al.*, 2003. *Nat. Immunol*, 4(2), 161-167.
- Oshiumi, H., Sasai, M., *et al.*, 2003. *J. Biol. Chem*, 278(50), 49751-49762.
- d' Ostiani, C.F. *et al.*, 2000. *J. Exp. Med*, 191(10), 1661-1674.
- de Paiva, V.N. *et al.*, 2009. *Int. Immunopharmacol*, 9(6), 668-672.
- Parham, P., 2009. *The immune system* 3^e éd., London ; New York: Garland Science.
- Pelletier, R.P. *et al.*, 2002. *Am. J. Transplant*, 2(2), 134-141.
- Penna, G. *et al.*, 2002. *Hum. Immunol*, 63(12), 1164-1171.
- Pettersson, A. *et al.*, 2004. *Clin. Exp. Immunol*, 137(3), 486-495.
- Piccioli, D. *et al.*, 2007. *Blood*, 109(12), 5371-5379.
- Pieper, G.M. & Roza, A.M., 2008. *Free Radic. Biol. Med*, 44(8), 1536-1552.
- Pierre, P. & Mellman, I., 1998. *Cell*, 93(7), 1135-1145.
- Pietra, B.A. *et al.*, 2000. *J. Clin. Invest*, 106(8), 1003-1010.
- Pillai, A.B. *et al.*, 2009. *Blood*, 113(18), 4458-4467.
- Pirenne, J. *et al.*, 2005. *Transplantation*, 79(3 Suppl), S25-27.
- Platten, M. *et al.*, 2005. *Science*, 310(5749), 850-855.
- Plissonnier, D. *et al.*, 2000. *Transplantation*, 69(12), 2601-2608.
- Pober, J.S. & Cotran, R.S., 1990. *Transplantation*, 50(4), 537-544.
- Poirier, N. *et al.*, 2010. *Sci Transl Med*, 2(17), 17ra10.
- Poirier, N. *et al.*, 2011. *Clin. Exp. Immunol*, 164(2), 265-274.
- Poltorak, A. *et al.*, 1998. *Science*, 282(5396), 2085-2088.

- Porter, C.J., Ronan, J.E. & Cassidy, M.J., 2000. *Transplantation*, 69(6), 1091-1094.
- Powell, J.D., 2006. *Clin. Immunol*, 120(3), 239-246.
- Pradeu, T. & Carosella, E.D., 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103(47), 17858-17861.
- Pratschke, J., Neuhaus, P. & Tullius, S.G., 2005. *Transpl. Int*, 18(1), 15-21.
- Pratschke, J. *et al.*, 2008. *Transpl. Int*, 21(6), 512-522.
- Pratt, J.R., Basheer, S.A. & Sacks, S.H., 2002. *Nat. Med*, 8(6), 582-587.
- Pugh, C.W., MacPherson, G.G. & Steer, H.W., 1983. *J. Exp. Med*, 157(6), 1758-1779.
- Pulendran, B. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 165(1), 566-572.
- Pulendran, B. *et al.*, 2001. *Trends Immunol*, 22(1), 41-47.
- Pulskens, W.P. *et al.*, 2008. *PLoS ONE*, 3(10), e3596.
- Qi, H., Denning, T.L. & Soong, L., 2003. *Infect. Immun*, 71(6), 3337-3342.
- Raaf, L. *et al.*, 2011. *Mol. Cell. Biochem*, 347(1-2), 63-70.
- Rahman, I. & MacNee, W., 2000. *Free Radic. Biol. Med*, 28(9), 1405-1420.
- Ramachandra, L., Simmons, D. & Harding, C.V., 2009. *Curr. Opin. Immunol*, 21(1), 98-104.
- Randolph, G.J. *et al.*, 1998. *Science*, 282(5388), 480-483.
- Randolph, G.J. *et al.*, 1999. *Immunity*, 11(6), 753-761.
- Re, F. & Strominger, J.L., 2001. *J. Biol. Chem*, 276(40), 37692-37699.
- Reis e Sousa, C., 2006. *Nat. Rev. Immunol*, 6(6), 476-483.
- Reizis, B. *et al.*, 2011. *Annu. Rev. Immunol*, 29, 163-183.
- Rémy, S. *et al.*, 2009. *J. Immunol.*, 182(4), 1877-1884.
- Renga, B. *et al.*, 2009. *World J. Gastroenterol*, 15(17), 2097-2108.
- Rescigno, M. *et al.*, 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 95(9), 5229-5234.
- Richters, C.D. *et al.*, 1995. *Br. J. Dermatol*, 133(5), 721-727.
- Rissoan, M.C. *et al.*, 1999. *Science*, 283(5405), 1183-1186.
- Rizzo, L.V. *et al.*, 1995. *Eur. J. Immunol*, 25(3), 708-716.
- Roach, J.C., 2005. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9577-9582.
- Robinson, S.P. *et al.*, 1999. *Eur. J. Immunol*, 29(9), 2769-2778.
- Rocha, P.N. *et al.*, 2003. *Immunol. Rev*, 196, 51-64.
- Röcken, M., Urban, J.F. & Shevach, E.M., 1992. *Nature*, 359(6390), 79-82.
- Rodríguez, P.C. & Ochoa, A.C., 2008. *Immunol. Rev*, 222, 180-191.
- Roederer, M. *et al.*, 1991. *Int. Immunol*, 3(9), 933-937.
- Rogers, N.J. & Lechler, R.I., 2001. *Am. J. Transplant*, 1(2), 97-102.
- Romagnani, S., 1991. *Immunol. Today*, 12(8), 256-257.
- Romagnani, S., 2006. *Clin. Exp. Allergy*, 36(11), 1357-1366.
- Romani, N. *et al.*, 2001. *Int. Rev. Cytol*, 207, 237-270.
- Romani, N. *et al.*, 1996. *J. Immunol. Methods*, 196(2), 137-151.
- Roncarolo, M.G., Levings, M.K. & Traversari, C., 2001. *J. Exp. Med*, 193(2), F5-9.
- Rossi, D. & Zlotnik, A., 2000. *Annu. Rev. Immunol*, 18, 217-242.
- Ruckdeschel, K. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 173(5), 3320-3328.
- Russell, J.H. & Ley, T.J., 2002. *Annu. Rev. Immunol*, 20, 323-370.
- Russell, P.S. *et al.*, 1994. *J. Immunol*, 152(10), 5135-5141.
- Rutella, S., Danese, S. & Leone, G., 2006. *Blood*, 108(5), 1435-1440.
- Ryter, S.W., Alam, J. & Choi, A.M.K., 2006. *Physiol. Rev*, 86(2), 583-650.
- Saadi, S. *et al.*, 2004. *Am. J. Pathol*, 164(3), 1073-1080.
- Sakaguchi, S., 2004. *Annu. Rev. Immunol*, 22, 531-562.
- Sakaguchi, S. *et al.*, 2010. *Nat. Rev. Immunol*, 10(7), 490-500.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A., 1994. *J. Exp. Med*, 179(4), 1109-1118.
- Sallusto, F. *et al.*, 1995. *J. Exp. Med*, 182(2), 389-400.
- Salomon, B. & Bluestone, J.A., 1998. *J. Immunol*, 161(10), 5138-5142.
- Sarwal, M. *et al.*, 2003. *N. Engl. J. Med*, 349(2), 125-138.

- Sasai, M. *et al.*, 2005. *J. Immunol*, 174(1), 27-30.
- Satyaraj, E., 2011. *Top Companion Anim Med*, 26(1), 25-32.
- Sayegh, M.H. & Colvin, R.B., 2003. *N. Engl. J. Med*, 348(11), 1033-1044.
- Scheu, S. *et al.*, 2002. *J. Exp. Med*, 195(12), 1613-1624.
- Schön, M.P. *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 162(11), 6641-6649.
- Schulz, J.B., Lindenau, J., *et al.*, 2000. *Eur. J. Biochem*, 267(16), 4904-4911.
- Schulz, O., Edwards, A.D., *et al.*, 2000. *Immunity*, 13(4), 453-462.
- Schwartz, R.H., 1992. *Cell*, 71(7), 1065-1068.
- Shatry, A. *et al.*, 2009. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 15(10), 1239-1243.
- Shen, X.-D. *et al.*, 2002. *Transplantation*, 74(3), 315-319.
- Shevach, E.M., 2006. *Immunity*, 25(2), 195-201.
- Shimazu, R. *et al.*, 1999. *J. Exp. Med*, 189(11), 1777-1782.
- Shimizu, K. & Fujii, S.-ichiro, 2008. *Front. Biosci*, 13, 6193-6201.
- Shin, H.K. & Linkswiler, H.M., 1974. *J. Nutr*, 104(10), 1348-1355.
- Shortman, K. & Liu, Y.-J., 2002. *Nat. Rev. Immunol*, 2(3), 151-161.
- Shortman, K. *et al.*, 1990. *Semin. Immunol*, 2(1), 3-12.
- da Silva Correia, J. & Ulevitch, R.J., 2002. *J. Biol. Chem*, 277(3), 1845-1854.
- da Silva Correia, J. *et al.*, 2001. *J. Biol. Chem*, 276(24), 21129-21135.
- Silva-Campa, E. *et al.*, 2009. *Virology*, 387(2), 373-379.
- Sing, A. *et al.*, 2002. *J. Exp. Med*, 196(8), 1017-1024.
- Singh, S. *et al.*, 2009. *J. Biol. Chem*, 284(33), 22457-22466.
- Soilleux, E.J. *et al.*, 2002. *J. Leukoc. Biol*, 71(3), 445-457.
- Solez, K. *et al.*, 2008. *Am. J. Transplant*, 8(4), 753-760.
- Sozzani, S. *et al.*, 1998. *J. Immunol*, 161(3), 1083-1086.
- Speiser, D.E. & Romero, P., 2010. *Semin. Immunol*, 22(3), 144-154.
- Srivastava, M.K. *et al.*, 2010. *Cancer Res*, 70(1), 68-77.
- Steiniger, B., Klempnauer, J. & Wonigeit, K., 1984. *Transplantation*, 38(2), 169-174.
- Steinman, R.M., 1991. *Annu. Rev. Immunol*, 9, 271-296.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A., 1973. *J. Exp. Med*, 137(5), 1142-1162.
- Steinman, R.M. & Inaba, K., 1999. *J. Leukoc. Biol*, 66(2), 205-208.
- Steinman, R.M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M.C., 2003. *Annu. Rev. Immunol*, 21, 685-711.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., *et al.*, 2003. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 987, 15-25.
- Steinman, R.M., Pack, M. & Inaba, K., 1997. *Immunol. Rev*, 156, 25-37.
- Steinman, R.M. *et al.*, 2000. *J. Exp. Med*, 191(3), 411-416.
- Stipanuk, M.H., 1986. *Annu. Rev. Nutr*, 6, 179-209.
- Stipanuk, M.H. & Ueki, I., 2010. *J Inherit Metab Dis*, 34(1), 17-32.
- Strobl, H. *et al.*, 1996. *J. Immunol*, 157(4), 1499-1507.
- Strominger, J.L., 2002. *Immunol. Rev*, 185, 69-77.
- Strunk, D. *et al.*, 1997. *J. Exp. Med*, 185(6), 1131-1136.
- Sturman, J.A., Cohen, P.A. & Gaull, G.E., 1970. *Biochem Med*, 3(6), 510-523.
- Su, X. *et al.*, 2006. *Eur. J. Immunol*, 36(1), 199-206.
- Suffia, I.J. *et al.*, 2006. *J. Exp. Med*, 203(3), 777-788.
- Sumitran, S., 2000. *Adv. Nephrol. Necker Hosp*, 30, 29-39.
- Summers, K.L. *et al.*, 2001. *Am. J. Pathol*, 159(1), 285-295.
- Sun, D. & Ding, A., 2006. *Nat. Immunol*, 7(4), 375-381.
- Supajatura, V. *et al.*, 2001. *J. Immunol*, 167(4), 2250-2256.
- Suthanthiran, M. *et al.*, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 87(9), 3343-3347.
- Sutton, V.R. *et al.*, 2000. *J. Exp. Med*, 192(10), 1403-1414.
- Suzuki, K. *et al.*, 2011. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 108(33), 13829-13834.
- Sykes, M., 2007. *J Intern Med*, 262(3), 288-310.

- Sykes, M. & Sachs, D.H., 1988. *Transplantation*, 46(2 Suppl), 135S-142S.
- Szabo, S.J. *et al.*, 2000. *Cell*, 100(6), 655-669.
- Tait, B.D. *et al.*, 2009. *Nephrology (Carlton)*, 14(2), 247-254.
- Takahashi, K. *et al.*, 1998. *Am. J. Pathol*, 153(3), 745-755.
- Takahashi, K. *et al.*, 2001. *Am. J. Pathol*, 159(1), 131-138.
- Takaoka, A. *et al.*, 2005. *Nature*, 434(7030), 243-249.
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S., 2003. *Annu. Rev. Immunol*, 21, 335-376.
- Takeuchi, O. *et al.*, 1999. *Immunity*, 11(4), 443-451.
- Takeuchi, O. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 169(1), 10-14.
- Takeuchi, O. *et al.*, 2000. *Int. Immunol*, 12(1), 113-117.
- Talmage, D.W. *et al.*, 1976. *Science*, 191(4225), 385-388.
- Talmor, M. *et al.*, 1998. *Eur. J. Immunol*, 28(3), 811-817.
- Tan, P.H. *et al.*, 2005. *Blood*, 106(9), 2936-2943.
- Tang, A. *et al.*, 1993. *Nature*, 361(6407), 82-85.
- Tang, G., Wu, L. & Wang, R., 2010. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 37(7), 753-763.
- Tang, Q. & Bluestone, J.A., 2008. *Nat. Immunol*, 9(3), 239-244.
- Terasaki, P.I. *et al.*, 1995. *N. Engl. J. Med*, 333(6), 333-336.
- Thebault, P. *et al.*, 2007. *Am. J. Transplant*, 7(11), 2472-2482.
- Thornley, T.B. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 176(3), 1561-1570.
- Thornton, A.M. *et al.*, 2010. *J. Immunol*, 184(7), 3433-3441.
- Toohey, J.I., 2009. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 25(11), 1057-1060.
- Tourneur, L. *et al.*, 2001. *J. Immunol*, 167(3), 1338-1346.
- De Trez, C. *et al.*, 2005. *J. Immunol*, 175(2), 839-846.
- Triantafilou, K., Triantafilou, M. & Dedrick, R.L., 2001. *Nat. Immunol*, 2(4), 338-345.
- Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R.A., 2003. *Immunity*, 19(5), 641-644.
- Trombetta, E.S. & Mellman, I., 2005. *Annu. Rev. Immunol*, 23, 975-1028.
- Trombetta, E.S. *et al.*, 2003. *Science*, 299(5611), 1400-1403.
- Tsang, J.Y.S., Chai, J.G. & Lechler, R., 2003. *Blood*, 101(7), 2704-2710.
- Turner, J.E. *et al.*, 2007. *Mini Rev Med Chem*, 7(11), 1089-1096.
- Turville, S.G. *et al.*, 2002. *Nat. Immunol*, 3(10), 975-983.
- Valladeau, J. *et al.*, 1999. *Eur. J. Immunol*, 29(9), 2695-2704.
- Valladeau, J. *et al.*, 2000. *Immunity*, 12(1), 71-81.
- Valujskikh, A. *et al.*, 1998. *J. Clin. Invest*, 101(6), 1398-1407.
- Vanasek, T.L. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 176(10), 5880-5889.
- VanBuskirk, A.M. *et al.*, 2000. *J. Clin. Invest*, 106(1), 145-155.
- Vandenabeele, S. *et al.*, 2001. *Blood*, 97(6), 1733-1741.
- Veeraswamy, R.K. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 170(11), 5367-5372.
- Vella, J.P. *et al.*, 1997. *Transplantation*, 64(6), 795-800.
- Vendetti, S. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 165(3), 1175-1181.
- Verdijk, P. *et al.*, 2005. *J. Invest. Dermatol*, 124(4), 714-717.
- Verthelyi, D. *et al.*, 2001. *J. Immunol*, 166(4), 2372-2377.
- Vieira, P.L. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 172(10), 5986-5993.
- Viglianti, G.A. *et al.*, 2003. *Immunity*, 19(6), 837-847.
- Villadangos, J.A. & Ploegh, H.L., 2000. *Immunity*, 12(3), 233-239.
- van Vliet, S.J. *et al.*, 2007. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), 435-440.
- Waaga-Gasser, A.M. *et al.*, 2009. *J. Am. Soc. Nephrol*, 20(4), 820-830.
- Walker, W.E. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(8), 5307-5316.
- Wallet, M.A. *et al.*, 2008. *J. Exp. Med*, 205(1), 219-232.
- Walunas, T.L. & Bluestone, J.A., 1998. *J. Immunol*, 160(8), 3855-3860.
- Wang, G.Q. *et al.*, 2001. *J. Exp. Med*, 194(9), 1325-1337.

- Wang, L. *et al.*, 2011. *J. Exp. Med*, 208(3), 577-592.
- Wasowska, B.A. *et al.*, 2001. *Transplantation*, 71(6), 727-736.
- Watanabe, N. *et al.*, 2005. *Nature*, 436(7054), 1181-1185.
- Wei, X.-qing *et al.*, 1995. *Nature*, 375(6530), 408-411.
- Weiss, A. & Littman, D.R., 1994. *Cell*, 76(2), 263-274.
- Werner, S.L., Barken, D. & Hoffmann, A., 2005. *Science*, 309(5742), 1857-1861.
- Wietek, C. *et al.*, 2003. *J. Biol. Chem*, 278(51), 50923-50931.
- De Wilde, V. *et al.*, 2009. *Am. J. Transplant.*, 9(9), 2034-2047.
- Williams, G.M. *et al.*, 1968. *N. Engl. J. Med*, 279(12), 611-618.
- Williamson, E. *et al.*, 1997. *J. Immunol*, 159(3), 1208-1215.
- Wilson, C.B., Rowell, E. & Sekimata, M., 2009. *Nat. Rev. Immunol*, 9(2), 91-105.
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D. & Villadangos, J.A., 2004. *Blood*, 103(6), 2187-2195.
- Wing, K. *et al.*, 2008. *Science*, 322(5899), 271-275.
- Wood, K.J., 2011. *Transplantation Proceedings*, 43(6), 2135-2136.
- Wood, K.J. & Sakaguchi, S., 2003. *Nat. Rev. Immunol*, 3(3), 199-210.
- Worth, A., Thrasher, A.J. & Gaspar, H.B., 2006. *Br. J. Haematol*, 133(2), 124-140.
- Wu, L. & Liu, Y.-J., 2007. *Immunity*, 26(6), 741-750.
- Xie, A. *et al.*, 2011. *Transplantation*, 91(1), 27-34.
- Xing, J., Wu, Y. & Ni, B., 2011. *J Asthma*, 48(2), 115-125.
- Xu, M. *et al.*, 2010. *Clinical and Developmental Immunology*, 2010, 1-9.
- Xu, Y. *et al.*, 2000. *Nature*, 408(6808), 111-115.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., *et al.*, 2003. *Science*, 301(5633), 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., *et al.*, 2003. *Nat. Immunol*, 4(11), 1144-1150.
- Yamamoto, M. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 169(12), 6668-6672.
- Yamazaki, S. *et al.*, 2011. *PLoS ONE*, 6(4), e18833.
- Yan, Z. & Banerjee, R., 2010. *Biochemistry*, 49(6), 1059-1066.
- Yan, Z., Garg, S.K. & Banerjee, R., 2010. *J. Biol. Chem*, 285(53), 41525-41532.
- Yan, Z. *et al.*, 2009. *Nat. Chem. Biol*, 5(10), 721-723.
- Yanagawa, Y. *et al.*, 2011. *Immunol Lett*.
- Yang, G. *et al.*, 2004. *J. Biol. Chem.*, 279(47), 49199-49205.
- Yang, G., Pei, Y., *et al.*, 2011. *J. Biol. Chem*, 286(30), 26450-26460.
- Yang, G., Tang, G., *et al.*, 2011. *Am. J. Pathol*, 179(2), 869-879.
- Yang, G. *et al.*, 2010. *Cardiovasc. Res*, 86(3), 487-495.
- Yang, G. *et al.*, 2008. *Science*, 322(5901), 587-590.
- Yang, G. *et al.*, 2007. *J. Biol. Chem*, 282(22), 16567-16576.
- Yin, H. *et al.*, 2010. *Transplantation*, 89(10), 1189-1197.
- Yoneyama, H., Matsuno, K. & Matsushimaa, K., 2005. *Int. J. Hematol*, 81(3), 204-207.
- Yoon, K. *et al.*, 2011. *Carcinogenesis*, 32(6), 836-842.
- Young, D.A. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 164(7), 3563-3572.
- Young, J.W., Szabolcs, P. & Moore, M.A., 1995. *J. Exp. Med*, 182(4), 1111-1119.
- Zanardo, R.C.O. *et al.*, 2006. *FASEB J*, 20(12), 2118-2120.
- Zarembek, K.A. & Godowski, P.J., 2002. *J. Immunol*, 168(2), 554-561.
- Zhai, Y. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 170(6), 3024-3028.
- Zhang, D. *et al.*, 2009. *Circulation*, 120(19), 1893-1902.
- Zhang, D. *et al.*, 2010. *Cytokine*, 51(3), 311-319.
- Zhang, D. *et al.*, 2004. *Science*, 303(5663), 1522-1526.
- Zhang, H. *et al.*, 2007. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292(4), L960-971.
- Zhao, P. *et al.*, 2009. *J. Cell. Mol. Med*, 13(8A), 1513-1525.
- Zheng, X. *et al.*, 2009. *Blood*, 113(12), 2646-2654.

- Zhi, L. *et al.*, 2007. *J. Leukoc. Biol.*, 81(5), 1322-1332.
Zhou, X. *et al.*, 2009. *Nat. Immunol*, 10(9), 1000-1007.
Zhu, L. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(11), 8226-8233.
Zhu, X.-Y. *et al.*, 2010. *Cell. Mol. Life Sci*, 67(7), 1119-1132.

Production scientifique

PUBLICATIONS

- **R. Vuillefroy de Silly**, F.Coulon, N. Poirier, V. Jovanovic, V. Ferchaud-Roucher, G. Blanco et B. Vanhove, « Transplant tolerance is associated with reduced expression of cystathionine γ -lyase which controls interleukin-12 production by dendritic cells and TH-1 type immune responses », *Blood*, En revision.
- N. Poirier, T. Haudebourg, C. Brignone, N. Dilek, J. Hervouet, D. Minault, F. Coulon, **R.V. de Silly**, F. Triebel, G. Blanco, et B. Vanhove, « Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3(+))-activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates », *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 164, mai. 2011, p. 265-274.
- A.-S. Dugast, T. Haudebourg, F. Coulon, M. Heslan, F. Haspot, N. Poirier, **R. Vuillefroy de Silly**, C. Usal, H. Smit, B. Martinet, P. Thebault, K. Renaudin, et B. Vanhove, « Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion », *Journal of Immunology*, vol. 180, juin. 2008, p. 7898-906.

COMMUNICATIONS ORALES

- **R.Vuillefroy de Silly** et al., 10^{ème} congrès annuel de la Société Francophone de Transplantation, « La γ -cystathionase module l'activation des cellules dendritiques et les réponses de type Th1 », Genève, Suisse, Décembre 2010.
- **R.Vuillefroy de Silly** et al., *Vaincre La Mucoviscidose : Réunion programme recherche en transplantation pulmonaire*, « Régulation de la réponse immune en transplantation par le sulfure d'hydrogène », Paris, France, Mai 2010.
- **R.Vuillefroy de Silly** et al., 9^{ème} congrès annuel de la Société Francophone de Transplantation, « Régulation de la réponse immune en transplantation par le sulfure d'hydrogène », Nice, France, Décembre 2009.
- **R.Vuillefroy de Silly** et al., 8^{ème} congrès annuel de la Société Francophone de Transplantation, « Régulation de la réponse immune en transplantation par le sulfure d'hydrogène », Québec, Canada, Octobre 2008.

POSTERS

- **R.Vuillefroy de Silly** et al., *Basic Science Symposium 2011*, « Down-modulation of γ -cystathionase in transplant tolerance controls dendritic cells activation and Th1-type immune responses », Cap Cod, Etats-Unis, Juin 2011.
- **R.Vuillefroy de Silly** et al., *Vaincre La Mucoviscidose : 12^{ème} Colloque des jeunes chercheurs*, « La γ -cystathionase module l'activation des cellules dendritiques et les réponses de type Th1 », Paris, France, Mars 2011.
- **R.Vuillefroy de Silly** et al., 9^{ème} congrès annuel de la Société Francophone de Transplantation, « Régulation de la réponse immune en transplantation par le sulfure d'hydrogène », Nice, France, Décembre 2009.

- **R.Vuillefroy de Silly**, et al., *1st International Conference on Immune Tolerance*. « Regulation of immune response to transplantation by hydrogen sulfide » Boston, Etats-Unis, Octobre 20

Rôle du métabolisme de la cystéine dans la tolérance en transplantation et dans les réponses immunes de type Th1

L'induction de réponses immunogènes ou tolérogènes par les lymphocytes T dépend, en grande partie, du statut d'activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). Cependant, les facteurs contrôlant l'activation des CPAs ne sont pas tous connus, ni compris. Dans cette thèse, nous démontrons qu'un état de tolérance immunologique, après allotransplantation d'organes chez le rat, est associé à une diminution de l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme de la cystéine dans le transplant, et plus particulièrement de la cystathionine- γ -lyase (CSE). L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la CSE, la propargylglycine (PPG), a retardé le rejet de transplants de cœur allogéniques, et a inhibé l'apparition d'hypersensibilité de type IV, mais pas la réponse anticorps. L'effet biologique majeur de l'inhibition de la CSE était une répression de l'expression des transcrits d'IL-12p40, ce qui pouvait être reproduit *in vitro* sur des monocytes et des cellules dendritiques (DC). La répression de l'IL-12 induite par inhibition de la CSE n'était pas due à une modulation de l'activité de NF- κ B, ou de la production de sulfure d'hydrogène, mais pourrait être médiée par une modulation du contenu intracellulaire de cystéine. Les niveaux de cystéine intracellulaires étaient contrôlés majoritairement par l'activité de la CSE, ainsi que par l'import extracellulaire de cystine via le transporteur Xc⁻. Nos résultats indiquent que la CSE joue un rôle important dans la régulation de l'IL-12 chez les monocytes et DC, et qu'elle est sous-exprimée dans la tolérance en transplantation, probablement en participant à la maintenance d'un état de tolérance.

Mots-clés : Cellules dendritiques - Interleukine 12 – Cystéine – Alloréactivité

Role of cysteine metabolism in transplantation tolerance and Th1 immune responses

Antigen-activated T lymphocytes undergo an immune or tolerogenic response in part according to the activation status of their antigen-presenting cells (APCs). However, factors controlling the activation of APCs are not fully understood. In this study, we demonstrate that immune tolerance after organ allotransplantation in the rat is associated with a repressed intragraft expression of several enzymes of the transsulfuration pathway including cystathionine- γ -lyase (CSE). The pharmacological blockade of CSE with propargylglycine (PPG) delayed heart allograft rejection and abrogated type IV hypersensitivity but did not modify antibody responses. The dominant biological effect of CSE blockade was a specific repression of IL-12 p40 transcript expression, which could be reproduced *in vitro* in monocytes and dendritic cells (DCs). Repression of IL-12 cytokine by CSE inhibition was not mediated by changes to nuclear factor-kappa B, or hydrogen sulphide, but could be assigned to a modulation of intracellular cysteine content. Intracellular cysteine levels were predominantly controlled by CSE activity, together with extracellular import via the Xc⁻ transporter. Our results indicate that CSE plays a critical role in regulating IL-12 in monocytes and DCs and is down-modulated in transplant tolerance, presumably participating in the maintenance of the tolerant state.

Keywords: Dendritic cells - Interleukin 12 - Cysteine –Alloreactivity

VUILLEFROY de SILLY Romain

INSERM UMR643 – Equipe 3

30, Bvd Jean Monnet

44093 Nantes, cedex 01