

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

										1	4
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

**Etude de l'interaction TCR/peptide/CMH des lymphocytes T
régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} en allotransplantation chez le rat**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : BIOLOGIE MÉDECINE SANTÉ

Spécialité : IMMUNOLOGIE

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Elodie PICARDA

Le 29 Octobre 2013, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Alain LE MOINE, Professeur, Bruxelles
Joost VAN MEERWIJK, Professeur, Toulouse

Examineur :

Dominique HOUSSET, Directeur de Recherche, Grenoble

Directeurs de thèse :

Ignacio ANEGON, Directeur de Recherche, Nantes
Carole GUILLONNEAU, Chargée de Recherche, Nantes

Confidentiel

Remerciements

Je remercie chaleureusement le Dr Joost Van Meerwijk et le Dr Alain Le Moine pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Dr Dominique Housset pour avoir examiné ce travail et collaboré à ce projet.

Je tiens également à remercier le Dr Ignacio Anegon pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire U1064, intégrée dans son équipe, et co-encadrée durant ma thèse. Je le remercie pour sa confiance, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie tout particulièrement le Dr Carole Guillonnet pour m'avoir encadrée depuis mon premier stage de Master 1 et pour m'avoir permis de faire cette thèse. Je te remercie pour ton optimisme sans faille qui m'a portée durant ces quatre années de recherche, pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ta disponibilité, ton implication, tes conseils et la confiance que tu m'as toujours accordée. Ce fût un réel plaisir de travailler à tes côtés.

Je remercie le Dr Bernard Vanhove, le Dr Philippe Blancou et le Dr Marc Bonneville pour leur participation à mes comités de thèse.

*Je remercie l'ensemble de l'équipe 2. Un grand merci à Séverine B (le duo de choc Elo P/Sev B) pour tous ces bons moments passés ensemble, que ce soit au labo en culture 1 pendant nos interminables MLR (96 puits... *1 plaque... *2 plaques... *3 plaques, peptide 1, 2, 3, 4... !), devant l'ARIA pour résoudre les problèmes (tu es une vraie pro maintenant), dans le bureau pour parler de tout et de rien, de science (merci pour ton soutien, toutes nos discussions scientifiques et tes conseils avisés), de nos vies perso (parfois, pour ne pas dire souvent, mouvementées !), des derniers potins du labo (hey, tu sais quoi ???), pour les aventures Congrès (je me souviendrai longtemps du temps pourri de Glasgow et du froid polaire, de la neige et des fondues de Genève !) et enfin pour tes corrections et ton aide précieuse durant ma fin de thèse. Merci à Thomas et Julien, un autre duo de choc, pour votre joyeux désordre (oui, oui..) et votre bonne humeur ! Merci à Séverine R, Séverine M, Tuan, Philippe pour vos conseils et tout particulièrement à Laurent pour ses blagues, sa bonne humeur et son aide précieuse en bio mol. Merci aussi à Reynald (la qPCR n'a plus de secret pour moi !), Angélique, Claire, Alison, Jessica, Cécilia (on a enfin partagé un fest-noz !) et Laure-Hélène pour leur bonne humeur. Enfin, Aurélie, bonne chance pour ta thèse !*

Ces trois années de thèse n'auraient pas été aussi belles sans mes collègues de bureau, en commençant par Antoine et Elodie, les derniers neuros survivants avec qui j'ai tant discuté et partagé de fous rires, Séverine, Jérôme, Claire, Emmanuelle et Alexis (venus d'un autre monde !), Sabrina. Sans oublier les anciens, Anne Laure (le Nord te réussit bien on dirait !), Anne (les sagas protéo et iPS nous auront tenus en haleine) et Virginie (une personne simple, drôle, pleine de bon conseils, un modèle ! finalement, tu as perdu au fameux jeu du pendu ! ou c'est peut-être Séverine ?!! il y avait du niveau...).

Merci à la meilleure équipe du labo, j'ai nommé l'équipe 10 ! Je ne compte plus le nombre de soirées et d'apéros que nous avons partagés, dans les bars, chez les uns et les autres, avec toujours la même joie de se retrouver, de collègues vous êtes devenus des amis. Un grand merci plein d'affection pour Justine (ma Juju), avec qui j'ai partagé tellement de sorties, de potins, de sessions danses (Marlow, Havana, Quatre Sens...), et une passion commune et sans limite pour le Forrò (Ai Que Bom et bientôt Cologne, tudo bem !). Tu as

toujours été là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments et je t'en remercie. Je te souhaite plein de courage pour ta dernière année ! Laura, guapa, garde ton sourire et ta bonne humeur, de mon côté je garderai un excellent souvenir des soirées partagées (français, anglais, espagnol, euh... je ne sais plus !), que du bonheur ! Seba, muchas gracias por tu ayuda y apoyo. Merci à Angélique, Flora, Mélanie C et aux miss du deuxième, Marion, Alex, Annie, Laëtitia (dit Mamie), Mélanie N, à ma chère cousine Gaëlle (enjoy in San Diego). Je n'oublie pas ma petite Titia (ma partenaire de Pilates), partie depuis bientôt un an aux pays des kangourous, qui me manque ! TTS in Berlin was so great with you, lots of fun and food ☺

Merci à Claire, Manu et Bernard pour toutes les greffes que vous avez brillamment réalisées pendant ma thèse et sans lesquelles rien ne serait possible. Claire, merci pour ta gentillesse et ton sourire de tous les jours, Manu, merci pour ta disponibilité, ton aide pour autres palpation, piqûre et gavage (tu m'en as appris des choses), ta bonne humeur (et tes coups de sang !), c'était un réel plaisir de travailler avec vous !

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du labo, qui contribuent à créer un environnement de travail des plus agréables et m'ont apporté conseils et aide au quotidien, en particulier Laurence D. (bonne chance pour la suite de la saga des cytomètres !), Michèle (merci pour ton aide avec l'ARIA !), Flora et Caro (bio mol power !).

Je n'oublie pas mes amis de toujours, mon noyau dur ! depuis un paquet d'année maintenant, vous êtes toujours à mes côtés, pour le meilleur et pour le pire. Merci pour nos nombreuses soirées (j'ai trop la dale, sel sel sel sel, soirée cadeau pourri de Noel, et j'en passe !), WE retrouvailles mémorables (Paris, Saint Quay, Saint Jean de Mont et bientôt WE de fifous à l'Île de Ré !), nos vacances (L'Italie, Molto Bene !!! si si on a gagné à la belote dans le train Christophe.. et les Pyrénées). Vous avez contribué à mon équilibre pendant ces trois ans de thèse et ça n'a pas de prix ! Christophe (merci mille fois pour le sommaire), Edern, Florian, Anne Lise, Clotilde, Anne, Camille (sans oublier Fanny et Manu !) ... je vous aime les choupinous (comme dirait Anne) ! Je vous attends en délégation pour me rendre visite en PostDoc, réservez vos prochaines vacances !!!

Enfin, merci aux membres de ma famille pour leur encouragements durant ma thèse. Spéciale dédicace à Bébé pour chaque année de FIL où je m'envole en terres celtiques loin du labo ! Lise, ma petite sœur (plus si petite), merci pour tout, les cours de danses et fest-noz, nos vacances en Sardaigne (la voiture a failli ne pas survivre), ton moral d'acier, tes conseils et ton soutien à toute épreuve (les gamins n'ont qu'à bien se tenir) ! Merci à mes parents toujours présents et aimants. Merci Papa d'avoir relu et corrigé si consciencieusement ma thèse (apoptose et non apopotose, apoptose et j'en passe ! les Tregs n'ont plus de secrets pour toi !). Merci à tous les deux d'être aussi attentionnés, de me soutenir et m'encourager constamment. Les mots me manquent pour vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi durant ces trois années de thèse, et bien avant... Je vous aime tous les trois et sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui.

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION	9
1 IMMUNOLOGIE DE LA TRANSPLANTATION.....	10
1.1 <i>Historique de la transplantation</i>	10
1.2 <i>Les limites actuelles de la transplantation d'organes</i>	11
1.2.1 La pénurie d'organes.....	11
1.2.2 Le recours à l'immunosuppression chronique.....	12
1.2.3 Les dysfonctions chroniques de l'allogreffe.....	13
1.3 <i>Le rejet de greffe</i>	14
1.3.1 La réponse immunitaire innée.....	14
1.3.2 La réponse immunitaire adaptative.....	16
1.3.2.1 Les cellules dendritiques : des CPA's professionnelles.....	16
1.3.2.2 Les voies d'allorecognition.....	19
1.3.2.2.1 La voie directe de reconnaissance.....	20
1.3.2.2.2 La voie indirecte de reconnaissance.....	21
1.3.2.2.3 La voie semi-directe.....	22
1.3.2.3 L'activation des lymphocytes T.....	24
1.3.2.3.1 Le signal de reconnaissance antigénique : signal 1.....	24
1.3.2.3.2 Le signal de costimulation : signal 2.....	24
1.3.2.3.3 Le signal cytokinique : signal 3.....	30
1.3.2.3.4 La polarisation lymphocytaire.....	31
1.3.2.4 Les mécanismes effecteurs du rejet de greffe.....	35
1.3.2.4.1 La réponse cellulaire cytotoxique.....	35
1.3.2.4.2 L'hypersensibilité retardée (DTH).....	36
1.3.2.4.3 La réponse humorale et du complément.....	37
1.3.2.5 Les phases cliniques du rejet de greffe.....	39
1.3.2.5.1 Le rejet hyperaigu.....	39
1.3.2.5.2 Le rejet aigu.....	40
1.3.2.5.3 Le rejet chronique.....	42
2 LA RECONNAISSANCE DU COMPLEXE CMH/PEPTIDE PAR LE TCR.....	43
2.1 <i>Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité</i>	43
2.1.1 Architecture du complexe CMHp.....	43
2.1.2 Apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH.....	45
2.2 <i>Le récepteur à l'antigène des LTs $\alpha\beta$</i>	47
2.2.1 Le complexe TCR.....	47
2.2.1.1 Structure du TCR.....	47
2.2.1.2 Association du complexe TCR-CD3.....	48
2.2.1.3 Association avec les corécepteurs CD4 et CD8.....	48
2.2.2 Constitution de la diversité du répertoire TCR.....	49
2.3 <i>Aspects structuraux de l'interaction TCR/CMHp</i>	51
2.3.1 Structure du TCR $\alpha\beta$ en complexe avec son ligand.....	51

2.3.2	Spécificité de l'interaction TCR/CMHp allogénique	53
2.3.3	Bases structurales de l'allorecognition.....	55
2.4	<i>Etude du répertoire T</i>	57
2.4.1	Les différents biais du répertoire.....	57
2.4.2	Approches expérimentales de l'étude du répertoire T.....	59
2.4.3	Facteurs influençant le biais du TCR	61
2.4.4	Implications fonctionnelles de la diversité du TCR	62
3	LA TOLÉRANCE EN TRANSPLANTATION	64
3.1	<i>La tolérance centrale</i>	64
3.2	<i>La tolérance périphérique</i>	68
3.2.1	La délétion clonale/l'apoptose	68
3.2.2	L'ignorance	69
3.2.3	L'anergie	69
3.2.4	La suppression/régulation	70
3.3	<i>Les cellules régulatrices</i>	70
3.3.1	Les lymphocytes T régulateurs	71
3.3.1.1	Les Tregs CD4 ⁺	71
3.3.1.1.1	Les Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	71
3.3.1.1.2	Les Tregs CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	77
3.3.1.1.3	Les cellules Tr1	78
3.3.1.2	Les Tregs CD8 ⁺	78
3.3.1.2.1	Les Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	78
3.3.1.2.2	Les Tregs CD8 ⁺ CD28 ⁻	82
3.3.1.2.3	Les Tregs CD8 $\alpha\alpha$ ⁺	84
3.3.1.2.4	Les Tregs CD8 ⁺ CD122 ⁺	85
3.3.1.2.5	Les Tregs CD8 ⁺ CD103 ^{high}	86
3.3.1.3	Le rôle de la spécificité antigénique dans la suppression par les Tregs.....	86
3.3.1.4	Le répertoire des Tregs.....	91
3.3.2	Les cellules dendritiques tolérogènes.....	92
3.3.3	Les autres cellules régulatrices	95
3.3.4	Applications cliniques en transplantation.....	97
	PROJET DE RECHERCHE	100
	RESULTATS	104
	ARTICLE I	105
	RESUME DE L'ARTICLE I	149
	RESULTATS COMPLEMENTAIRES	150
	DISCUSSION/ PERSPECTIVES.....	163
	BIBLIOGRAPHIE.....	180
	ANNEXES	224
	ARTICLE II	225
	ARTICLE III	272
	ARTICLE IV	276
	PRODUCTION SCIENTIFIQUE	283

Abréviations

AA :	acide aminé
AAV :	adénovirus associé
ACAD :	activated T cells autonomous death
ADCC :	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN :	acide désoxyribonucléique
AgmH :	antigène mineur d'histocompatibilité
AICD :	activation induced cell death
AIRE :	AutoImmune REgulator
AP-1 :	activating protein 1
APECED :	autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy
ARN :	acide ribonucléique
β2m :	β2-microglobuline
Bcl-6 :	B cell lymphoma 6
BCR :	récepteur des cellules B constante
cDC :	cellule dendritique conventionnelle
CDR :	complementary determining region
CE :	cellule endothéliale
CFSE :	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
Chaîne I :	chaîne invariante
CLIP :	class-II associated invariant chain peptide
CLR :	récepteur des lectines de type C
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CMHp :	complexe CMH/peptide
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
C-term :	C-terminal
CTLA-4 :	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DAMPS :	damaged associated molecular patterns
DC :	cellule dendritique
Domaine D :	domaine de diversité
Domaine J :	domaine jonctionnel
Domaine V :	domaine variable
DSA :	anticorps dirigés contre le donneur
DST :	transfusion de sang du donneur
DTH :	hypersensibilité retardée
EBV :	Epstein Barr Virus
ECP :	eosinophil cationic protein
ENDATs :	endothelial associated transcripts
EPO :	eosinophil peroxydase
FasL :	Fas Ligand
GATA-3 :	GATA-binding-factor 3
GC :	centre germinatif
GITR :	Glucocorticoid-Induced TNF Receptor family related protein
GvHD :	réaction du greffon contre l'hôte
HLA :	human leucocyte antigen
HO :	Hème Oxygénase
Hsp :	Heat Shock Protein
ICAM :	intracellular adhesion molecule
ICAM :	intracellular adhesion molecule
IDO :	indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN :	interféron
Ig :	immunoglobuline
IL :	interleukine
ILT :	Ig like transcript

iNOS :	inducible nitric-oxide synthase
IPEX :	Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X linked
ITAM :	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
iTreg :	Treg induite
KLH :	keyhole limpet hemocyanin
LAIR-1 :	Leukocyte-Associated Ig-like Receptor-1
LB :	lymphocyte B
LEW :	Lewis
LFA :	lymphocyte function-associated antigen
LT :	lymphocytes T
MAI :	maladie autoimmune
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MBP :	major basic protein
MCP-1 :	monocyte chemotactic protein 1
MerTK :	Mer Tyrosine Kinase
MICA :	class I polypeptide-related sequence A
MIP1α :	macrophage inflammatory protein a alpha
MMF :	mycophenolate mofetil
MO-DC :	monocyte-derived dendritic cell
mTECs :	cellules épithéliales médullaires thymiques
mTOR :	mammalian target of rapamycin
NFAT :	Nuclear factor of activated T-cells
NF-kB :	nuclear factor-kB
NK :	natural killer
NLR :	NOD-like receptor
NO :	monoxyde d'azote
Nrp-1 :	neuropilin-1
N-term :	N-terminal
OLS :	organe lymphoïde secondaire
OVA :	ovalbumine
PAMPS :	pathogen associated molecular patterns
pDC :	cellules dendritique plasmacytoïde
PKC :	proteine kinase C
PRR :	pattern recognition receptor
RAG :	recombination activating gene
RANK :	receptor-activating NF-kappaB
RE :	réticulum endoplasmique
RLR :	RIG-like receptor
RORγt :	retinoic acid-related orphan receptor gamma t
ROS :	reactive oxygen species
sIg :	Ig de surface
SSR :	séquences signal de recombinaison
STAT-4 :	Signal Transducer and Activator of Transcription 4
TAP :	Transporter Associated with Antigen Processing
Tbet :	T-box expressed in T cells
TCR :	récepteur des cellules T
TdT :	terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF-β :	transforming growth factor
Th :	T helper
TIM :	T cell Ig and mucin containing domain
TLR :	toll like receptor
TNF :	tumor necrosis factor
Tregs :	cellule T régulatrice ou lymphocyte T régulateur
VCAM :	vascular cell adhesion molecule
vWF :	facteur de Von Willebrand

Liste des figures

Figure 1 : Drogues immunosuppressives et sites d'action.....	13
Figure 2 : Les différentes voies d'alloreconnaissance, directe, semi-directe et indirecte et leur intensité relative après transplantation.....	23
Figure 3 : Les différentes molécules de costimulation.....	25
Figure 4 : Conséquences fonctionnelles de l'interaction CD40-CD40L sur différents types cellulaires.....	27
Figure 5 : La différenciation des LTs CD4 ⁺ naïfs en sous-populations effectrices.....	33
Figure 6 : La différenciation des LTs CD8 ⁺ naïfs en sous-populations effectrices.....	35
Figure 7 : L'activation et la différenciation des LBs dans les OLS.....	38
Figure 8 : Mécanismes du rejet aigu à médiation humorale.....	41
Figure 9 : Architecture tridimensionnelle des molécules du CMH avec leurs ligands peptidiques.....	45
Figure 10 : Apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH : voies classiques et exceptions...	47
Figure 11 : Génération de la diversité du TCR par recombinaison somatique.....	50
Figure 12 : Structure générale d'un complexe TCR/CMHp de classe I (à gauche) et empreinte du TCR sur la surface moléculaire de complexe CMHp de classe I et II (à droite).....	53
Figure 13 : Comparaison de l'interaction du TCR LC13 avec le peptide du complexe allogénique (en gris) et le peptide viral FLR (en marron).....	56
Figure 14 : Exemple de différents types de biais du TCR β au sein de répertoires T spécifiques d'antigènes.....	58
Figure 15 : Exemples de profil Immunoscope de longueur CDR3.....	60
Figure 16 : Différentes approches expérimentales de l'analyse du répertoire TCR.....	60
Figure 17 : La structure des complexes CMHp peut directement influencer la diversité du répertoire TCR.....	62
Figure 18 : Sélections positive et négative dans le thymus.....	65
Figure 19 : Génération de nTregs dans le thymus (identifiés FoxP3 ⁺ tTregs).....	67
Figure 20 : Les mécanismes de tolérance passive.....	68
Figure 21 : Mécanismes de suppression par les Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	75
Figure 22 : Représentation schématique des isoformes CD45RABC et CD45RO.....	79
Figure 23 : Transplantation cardiaque d'un donneur LEW.1W à un receveur LEW.1A avec injection intramyocardique de l'AdCD40Ig au moment de la greffe.....	101
Figure 24 : Analyse de l'activation des LTs CD8 ⁺ CD45RC ^{high} d'animaux long terme en réponse à la stimulation par le peptide Du51.....	150
Figure 25 : Les Tregs CD8 ⁺ CD40Ig spécifiques du peptide Du51 inhibent la prolifération des LTs CD4 ⁺ CD25 ⁻ effecteurs syngéniques, de façon significativement plus efficace que les Tregs non spécifiques et que les nTregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	151
Figure 26 : Distribution des cellules spécifiques du Du51 à deux semaines ou quatre mois post-greffe.....	152
Figure 27 : Transfert adoptif des Tregs CD8 ⁺ CD40Ig tef, déplétées en cellules spécifiques du Du51.....	153
Figure 28: L'administration conjointe du peptide Du51 et d'un anticorps déplétant les cellules CD8 ⁺ (OX8) ou d'un anticorps bloquant le CMH-I (OX18) ne prévient pas du rejet aigu d'allogreffe.....	154
Figure 29 : Cliché de diffraction d'un cristal de complexe RT1.A ^a /Du51.....	158
Figure 30 : Analyse de l'activation des Tregs CD8 ⁺ CD40Ig en réponse aux dérivés du peptide Bu31.....	159
Figure 31 : Analyse de l'activation des LTs CD8 ⁺ CD45RC ^{high} d'animaux long terme en réponse à la stimulation par le peptide Bu31.....	160
Figure 32 : Caractérisation phénotypique des Tregs CD8 ⁺ CD40Ig après stimulation ex-vivo avec l'allopeptide Bu31.....	161
Figure 33 : Les Tregs CD8 ⁺ CD40Ig activées par l'allopeptide Bu31 ont une activité suppressive efficace.....	162
Figure 34 : Schéma bilan du rôle de l'interaction TCR/peptide/CMH dans les mécanismes d'induction, d'expansion et de suppression des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	179

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Liste non exhaustive des Tregs spécifiques d'alloantigènes en transplantation. .</i>	<i>90</i>
<i>Tableau 2 : Etudes cliniques publiées et en cours utilisant la thérapie cellulaire en transplantation.</i>	<i>98</i>
<i>Tableau 3 : Caractéristiques du répertoire des Tregs CD8⁺CD40Ig totales ou spécifiques du Du51 de la rate d'animaux traités 120 jours après la greffe.</i>	<i>157</i>

INTRODUCTION

1 Immunologie de la transplantation

La transplantation d'organes ou greffe de cellules est la seule issue thérapeutique pour beaucoup de pathologies qui entraînent une perte de fonction irréversible d'organes vitaux (cœur, foie, rein, poumons...). On distingue plusieurs types de greffe qui diffèrent suivant le degré de disparité génétique entre le donneur et le receveur. Dans le cas d'une autogreffe, le donneur et le receveur sont un seul et même individu. La greffe syngénique (ou isogreffe) est réalisée entre deux individus génétiquement identiques (cas de jumeaux monozygotes). L'allogreffe caractérise la greffe entre deux individus de la même espèce mais génétiquement différents, alors qu'une xéno greffe désigne le cas où donneur et receveur appartiennent à deux espèces différentes. Dans ces deux derniers cas, le greffon est perçu comme un élément étranger, n'appartenant pas « au soi », ce qui déclenche une réponse immunitaire visant à son élimination.

1.1 Historique de la transplantation

Dès 1902, le Français Alexis Carrel tente des transplantations de reins, de cœurs, d'intestins et de membres chez l'animal. Ce chirurgien obtiendra le Prix Nobel en 1912 en reconnaissance de son travail sur les sutures vasculaires et la transplantation de vaisseaux sanguins et d'organes. Il met également en évidence l'intérêt du froid pour la conservation des organes et des tissus. En 1906, Mathieu Jaboulay, professeur de chirurgie à Lyon, échoue dans sa tentative de xéno greffe de rein de porc chez une femme urémique. Près de trente ans plus tard, le Russe Serguey Voronoy réalise la première greffe rénale à partir d'un donneur cadavérique. Quatre jours après la greffe, la patiente décède mais un nouveau pas a été accompli, la notion de rejet immunologique voit le jour. S'ensuit une longue période de sommeil durant l'épisode de Seconde Guerre mondiale. Puis les recherches reprennent et se concentrent sur la transplantation rénale, aidée par de nets progrès chirurgicaux. L'année 1952 sera marquée par la première tentative de transplantation rénale à partir d'un donneur vivant, réalisée par les médecins Jean Hamburger et Jean Vaysse de l'Hopital Necker (MICHON et al., 1953). Le patient survivra 21 jours seulement après la greffe du rein de sa mère. Parallèlement, d'autres tentatives sont effectuées à Boston par David Hume (Peter Bent Brigham Hospital)(Hume et al., 1955). En 1954, une nouvelle avancée est faite : à Boston, les équipes des professeurs Murray (récompensé par le prix Nobel en 1990 pour la greffe du rein), Merrill et Harrison parviennent à réaliser avec succès une greffe rénale entre deux jumeaux homozygotes (MERRILL et al., 1956). En 1958, Jean Dausset (prix Nobel de

médecine en 1980) identifie l'expression tissulaire du complexe majeur d'histocompatibilité de l'Homme (CMH), le système HLA (Human Leucocyte Antigen) (DAUSSET, 1958). La recherche de compatibilité donneur-receveur avant transplantation est rendue possible mais cette avancée ne suffit pas encore à prévenir le rejet d'allogreffe. Afin de réaliser des greffes entre individus non apparentés, les médecins ont compris la nécessité d'un traitement immunosuppresseur pour contrôler la réponse immunitaire. Ainsi, en 1956, sont effectuées des greffes rénales entre faux jumeaux avec irradiation du receveur et administration de corticoïdes. Cette période signe l'entrée dans l'ère des immunosuppresseurs. L'aziathropine, utilisée pour la première fois en 1962 (Murray et al., 1963), donne des résultats prometteurs et améliore la survie des patients greffés. Lors des dix années suivantes, des tentatives de greffes de foie, de poumon, de pancréas et même de cœur seront réalisées. L'année 1972 marque une avancée considérable avec la découverte des propriétés immunosuppressives de la ciclosporine par le biologiste suisse Jean-François Borel. Cette molécule, synthétisée artificiellement dès 1980, diminue significativement la perte des greffons rénaux et améliore considérablement le pronostic des greffes de foie et de cœur. Dans les dernières décennies du 20^{ème} siècle, d'autres drogues immunosuppressives verront le jour, telles le tacrolimus, le mycophenolate mofetil (MMF), le sirolimus. En 100 ans, les progrès considérables effectués ont fait de la transplantation une thérapie de choix pour de nombreuses pathologies. Bien que considérée comme l'un des miracles de la médecine du 20^{ème} siècle (Morris, 2004), la transplantation se confronte néanmoins à plusieurs limites.

1.2 Les limites actuelles de la transplantation d'organes

1.2.1 La pénurie d'organes

D'année en année, le nombre de patients nécessitant une greffe d'organe ne cesse d'augmenter, atteignant 16 371 malades inscrits sur liste d'attente dans l'année 2011 (données de l'Agence de la Biomédecine). 4945 patients ont été greffés au cours de cette même année, représentant seulement 30% des malades en attente. Ces chiffres éloquent soulignent un problème majeur, la pénurie d'organe. De plus, environ la moitié seulement des donneurs en état de mort encéphalique recensés sont prélevés, sans que cette situation n'évolue favorablement au cours des ans (49% prélevés en 2011 contre 53% en 1997). Plusieurs facteurs expliquent ce phénomène : l'opposition au prélèvement d'organe du défunt ou médico-légale, les antécédents du donneur ou un incident médical (problèmes de maintien de l'homéostasie du donneur). Diminuer le taux d'opposition au prélèvement, élargir les critères

de prélevabilité des donneurs, améliorer le prélèvement et promouvoir le don sont des enjeux majeurs actuels pour augmenter la disponibilité des greffons. Parallèlement, la xénotransplantation est une stratégie thérapeutique potentielle pour pallier au manque d'organes et concentre l'activité de nombreux chercheurs dans le monde. Malgré l'amélioration du pronostic de la greffe à court terme, la survie à long terme est restée relativement inchangée, impliquant le recours à des greffes itératives pour la majorité des patients (Lodhi et al., 2011). Un des objectifs majeurs actuels est donc de mieux contrôler la réponse immune afin d'augmenter la durée de vie des greffons à long terme.

1.2.2 Le recours à l'immunosuppression chronique

Les traitements immunosuppresseurs visent à prévenir et inhiber la réponse immunitaire des cellules du receveur contre les cellules du donneur. Ils ont contribué à l'essor de la transplantation et sont aujourd'hui indispensables à la réussite de toute allogreffe. La déplétion de lymphocytes, l'inhibition de leur activation ou prolifération via le blocage des voies de signalisation lymphocytaires constituent différentes voies d'immunosuppression. Les drogues utilisées existent sous différentes formes : des petites molécules (inhibiteurs de la calcineurine, sirolimus, mycophénolate mofétil), des protéines (anticorps déplétants anti-CD3/CD52/CD20 ou non déplétants anti-CD25, protéines de fusion CTLA-4-Ig (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4-Immunglobuline)), des immunoglobulines intraveineuses et des glucocorticoïdes (**Figure 1**)(Halloran, 2004).

Ces drogues empêchent la survenue du rejet aigu d'allogreffe dans la majorité des cas et permettent des survies extrêmement bonnes des greffons dans les trois premières années qui suivent la transplantation. Cependant, elles sont dénuées de spécificité pour les antigènes du donneur et inhibent toutes les défenses immunitaires du receveur, y compris l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale, entraînant une augmentation de l'incidence de cancers et d'infections chez les patients greffés, comme le syndrome lymphoprolifératif post-greffe (Opelz and Döhler, 2004). De plus, ces produits possèdent une toxicité intrinsèque non immune, touchant de nombreux tissus (néphrotoxicité, neurotoxicité, symptômes gastro-intestinaux, etc.).

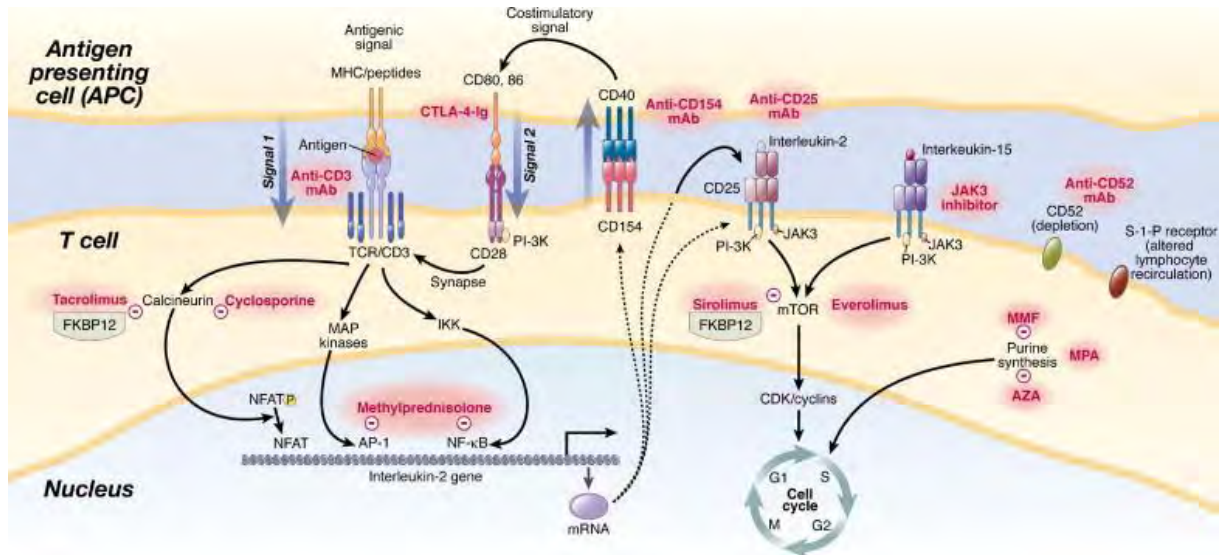


Figure 1 : Drogues immunosuppressives et sites d'action.

D'après (Halloran, 2004). La ciclosporine et le tacrolimus répriment la transcription de différents gènes (dont l'interleukine-2 (IL-2), indispensable à l'activation T) via l'inhibition de la calcineurine. Les corticostéroïdes ciblent les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB, abrogeant ainsi l'expression de nombreuses cytokines, incluant l'IL-1, IL-2, IL-3, et l'IL-6. L'anticorps anti-CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) déplete les lymphocytes T activés et inhibe la prolifération T induite par l'IL-2. Le sirolimus, en complexe avec FKBP12, bloque la prolifération T induite par l'IL-2, via l'inhibition de la voie mTOR initiatrice du cycle cellulaire. Le MMF bloque la synthèse de purines nécessaires à la réplication, empêchant ainsi la différenciation et prolifération des lymphocytes T et B. La molécule de fusion CTLA-4-Ig, en se liant à B7, inhibe la signalisation via CD28 et la transduction du signal 2 de costimulation. AP-1: activating protein 1, mTOR: mammalian target of rapamycin, NF-κB: nuclear factor-κB

A ces limites s'ajoute un autre problème majeur : malgré la diminution nette de l'incidence du rejet aigu, ces traitements immunosuppresseurs ne permettent pas d'enrayer la survenue du rejet chronique à long terme d'allogreffe, responsable de la perte des greffons.

1.2.3 Les dysfonctions chroniques de l'allogreffe

Les dysfonctions chroniques du greffon sont progressives et irréversibles malgré l'administration d'immunosuppresseurs. Elles se développent des mois voire des années après la greffe. Depuis le début des années 1980, la survie des greffons à un an a augmenté de manière très significative (plus de 90 % à un an). Néanmoins, les résultats à long terme ont peu changé. Le pourcentage de greffons perdus chaque année après la première année n'a pas évolué (Meier-Kriesche et al., 2004). L'âge du patient, le tabac, l'alcool, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'ischémie reperfusion de l'organe sont autant de facteurs contribuant aux lésions de rejet chronique. De plus, les épisodes répétés de rejet cellulaire et/ou humoral altèrent la fonction du transplant au cours du temps.

Dans ce contexte, l'identification de biomarqueurs pronostiques, associés au rejet et/ou à la tolérance, dans les échantillons biologiques non invasifs de patients, permettrait d'adapter les traitements immunosuppresseurs à des stades précoces, avant l'atteinte irréversible de la fonction du greffon, et limiterait les effets indésirables occasionnés.

D'autre part, le développement de stratégies visant à améliorer les traitements anti-rejets de manière plus spécifique et non toxique est devenu un objectif majeur en transplantation, avec pour but ultime d'atteindre un état dit de tolérance. La tolérance à l'allogreffe se définit comme l'acceptation à long terme du greffon chez un hôte immunocompétent, sans lésion de rejet chronique et en l'absence de traitement immunosuppresseur. L'induction d'une tolérance immunitaire dite opérationnelle représente une issue de choix face à la situation actuelle en transplantation. Ainsi, de nombreux protocoles ont été testés chez l'animal avec des résultats prometteurs, ouvrant la voie à de nouvelles thérapies chez l'Homme.

Cette thèse s'intéresse aux cellules T régulatrices (Tregs) CD8⁺ induites chez le rat après transplantation par un blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L, qui est une des nombreuses stratégies d'induction de tolérance à l'étude. Dans un premier temps, j'exposerai les mécanismes de la réponse allogénique et du rejet de greffe, suivis par les caractéristiques et rôles de la reconnaissance du complexe CMH/peptide (CMHp) par le TCR (récepteur des cellules T), pour ensuite aborder les mécanismes de la tolérance et en particulier les Tregs. Dans un deuxième temps, je présenterai les résultats obtenus au cours de ma thèse, portant sur l'étude de la spécificité antigénique et le répertoire des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques d'alloantigènes induites dans notre modèle.

1.3 Le rejet de greffe

Le rejet aigu d'allogreffe reste un problème majeur en transplantation d'organes solides car il peut conduire à une perte de fonction de la greffe, aiguë ou chronique. Deux mécanismes immunologiques généraux sont mis en jeu au cours du rejet aigu d'allogreffe : la réponse innée non spécifique, qui prédomine dans la phase précoce de la réponse immune, et la réponse adaptative, spécifique du donneur et résultant de la reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T (LTs) du receveur.

1.3.1 La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée se caractérise par son absence de spécificité antigénique, sa rapidité d'intervention dans la phase précoce post-transplantation et survient quelque soit le

degré de compatibilité génétique entre donneur et receveur. Elle ne peut à elle seule entraîner un rejet mais contribue au processus global de destruction du greffon. Les cellules de l'immunité innée expriment des PRRs (pattern recognition receptor), composés des récepteurs Toll-like (TLR), NOD-like (NLR), RIG-like (RLR) et récepteurs des lectines de type C (CLR). Ces récepteurs peuvent être membranaires, cytoplasmiques ou endosomiaux, permettant ainsi une surveillance efficace de tous les compartiments cellulaires. Les ligands des PRRs sont des produits de pathogènes, les PAMPS (pathogen associated molecular patterns), et des produits de lésion tissulaire, les DAMPS (damage-associated molecular patterns). Différents facteurs tels que la mort cérébrale du donneur (Bos et al., 2007), l'acte chirurgical et le phénomène d'ischémie reperfusion, à savoir la diminution de l'apport sanguin dans le greffon suivi de la restauration d'un flux suffisant, génèrent un grand nombre de DAMPS, incluant des protéines de stress Hsp (Heat Shock Protein), des ROS (reactive oxygen species), l'héparine sulfate et le fibrinogène. La reconnaissance de ces signaux de danger par les PRRs entraîne la production de cytokines proinflammatoires, incluant l'IL-1, l'IL-6, le Tumor Necrosis Factor (TNF), l'interféron (IFN) de type I, de radicaux libres et l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (CEs) (Land, 2005, 2012a, 2012b). Ces événements font du transplant un site de lésion et d'inflammation, entraînant une modification de la perméabilité et de la viabilité des vaisseaux, un relargage d'antigènes, un recrutement de leucocytes inflammatoires au niveau du greffon mais aussi la migration des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) du donneur vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) du receveur. De nombreux polynucléaires neutrophiles sont recrutés, attirés par les chimiokines CXCL10, RANTES, IL-17 et MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), et adhèrent aux CEs du greffon activées via les molécules d'adhésion ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule), E- et P-sélectines. Les neutrophiles vont à leur tour produire des médiateurs pro-inflammatoires et des chimioattractants (CXCL-1, 2, 3 et 8), attirant ainsi d'autres leucocytes tels que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DCs), qui vont maintenir un environnement inflammatoire local. Les DAMPS peuvent aussi activer directement le système du complément, ce qui induit de rapides lésions du greffon. Les DCs sont à l'interface entre les réponses immunes innée et adaptative (Nace et al., 2012). Après activation, elles vont devenir matures et déclencher la réponse immunitaire adaptative spécifique.

1.3.2 La réponse immunitaire adaptative

1.3.2.1 Les cellules dendritiques : des CPAs professionnelles

Les CPAs désignent les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B (LBs) et les DCs. Cependant, seules les DCs sont capables de stimuler la réponse primaire aux LTs et d'initier la réponse adaptative, ce sont les cellules pivots du système immunitaire. Elles sont présentes dans les organes lymphoïdes et à l'interface entre le corps et l'environnement, au niveau de la peau, des voies aériennes et de l'intestin. Initialement décrites en 1868 par P. Langerhans, il a fallu attendre 1973 pour que Steinman et Cohn décrivent les DCs comme une nouvelle classe de globules blancs avec de nombreuses caractéristiques et fonctions différentes (Steinman and Cohn, 1973). Elles jouent le rôle de sentinelles en parcourant l'organisme à la recherche d'éléments étrangers (bactéries, virus, toxines...), suite à quoi elles activent l'immunité cellulaire T. Elles jouent aussi un rôle dans l'immunité des LBs et des cellules Natural Killer (NK). Il existe de nombreuses sous-populations de DCs se distinguant par leur origine, leur localisation, leur spécialisation fonctionnelle et leur phénotype. Leurs caractéristiques communes sont la capture, la présentation d'antigènes et l'activation des cellules effectrices de la réponse immunitaire adaptative. On distingue les DCs conventionnelles (cDCs), les DCs inflammatoires et les DCs plasmacytoïdes (pDCs) (Merad et al., 2013).

Les **cDCs** sont générées en périphérie à partir d'un précurseur myéloïde issu de la moelle osseuse et sont largement distribuées au sein de l'organisme. Les cDCs dites *résidentes* sont localisées dans les organes lymphoïdes et les cDCs dites *migratoires* se trouvent au sein des tissus dont la peau et les muqueuses. Elles se caractérisent par l'expression de l'intégrine α CD11c. Les populations de cDCs diffèrent phénotypiquement chez l'Homme, la souris et le rat (Miller et al., 2012; Segura et al., 2012). Chez le rat en particulier, les cDCs sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD11c⁺, CD103, CMH-II. Le marqueur CD4 identifie deux populations spléniques distinctes : les cDCs CD4⁺ et les cDCs CD4⁻ (Trinité et al., 2000). Les cDCs CD4⁻, de très courte durée de vie, produisent en grande quantité les cytokines proinflammatoires IL-12 et TNF- α et induisent une déviation Th1, tandis que les cDCs CD4⁺ produisent peu d'IL-12, pas de TNF- α et génèrent des réponses Th1 et Th2 (Voisine et al., 2002). Chez la souris, les cDCs interstitielles résidentes se divisent en populations CD8⁺ et CD8⁻CD11b⁺ (Shortman and Heath, 2010). Enfin, parmi les cDCs des tissus non lymphoïdes, on distingue les cDC CD103⁺CD11b⁻ (Helft et al., 2010), les

cDC CD11b⁺ (Bogunovic et al., 2009) ou encore les cellules de Langerhans. Premières cDCs décrites, ces dernières se trouvent au niveau de l'épiderme de la peau, expriment très fortement une C-lectine, la langérine (CD207), impliquée dans la formation de granules de Birbeck dans le cytoplasme (Merad et al., 2008).

Le terme de **DCs inflammatoires** regroupe les populations de DCs qui n'apparaissent qu'au cours d'une infection ou d'une inflammation et ne sont pas observables en condition homéostatique (Naik et al., 2006). Parmi elles, les TipDCs (TNF and iNOS producing DCs) ont été mises en évidence après infection par *Listeria Monocytogenes* et produisent comme leur nom l'indique du TNF- α et iNOS (inducible Nitric-Oxide synthase) (Serbina et al., 2003). Les DCs inflammatoires proviennent majoritairement de la différenciation des monocytes du sang circulant en cellules exprimant des marqueurs de DCs (CD11c^{low/int}CMH-II^{int}) et sont donc également appelées MO-DCs (Monocyte-derived dendritic cells) (Domínguez and Ardavin, 2010). Ces cellules partageraient les mêmes propriétés fonctionnelles que les DCs classiques (Cheong et al., 2010) et sont à l'origine de réponses T effectrices contre les pathogènes (León et al., 2007; Nakano et al., 2009).

Les pDCs se développent dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur plasmacytoïde, et s'accumulent principalement dans le sang et les tissus lymphoïdes. Elles expriment un nombre limité de PRRs, incluant les TLR-7 et TLR-9, qui après stimulation par de l'acide ribonucléique (ARN) ou l'acide désoxyribonucléique (ADN) viral, déclenchent une sécrétion importante d'IFN de type I (α et β) (Cella et al., 1999). Morphologiquement, elles ne ressemblent pas aux cDCs qui arborent de longues dendrites. Ce sont de petites cellules (8 à 10 μ m) rondes avec un noyau excentré et un large cytoplasme faisant penser à des plasmocytes, d'où leur dénomination originelle de cellules T plasmacytoïdes ou monocytes plasmacytoïdes. En revanche, elles changent de morphologie (acquisition de dendrites, surexpression des molécules du CMH et de costimulation) pour ressembler à une DC mature typique après stimulation via leurs TLRs et sont capables de capter, d'apprêter et de présenter des antigènes aux LTs.

Chez la souris, les pDCs sont caractérisées par les marqueurs Ly6C⁺B220⁺CD11c^{low}CD4⁺CD8a⁻CD11b⁻ et produisent de l'IL-12 et l'IFN α (Asselin-Paturel et al., 2001). Chez l'Homme, au sein de la population CD4⁺MHC-II⁺CD11c⁻, les pDCs expriment fortement CD123 (chaîne α du récepteur à l'IL-3) et CD45RA, ILT-7 (Ig-like transcript 7)(Rissoan et al., 2002), BDCA-2 et -4 (Dzionek et al., 2000), LAIR-1 (Leukocyte-Associated Ig-like Receptor-1)(Bonaccorsi et al., 2010) et CD2. Enfin, chez le rat, une population CD4⁺CHM-

II⁺CD11b⁻CD3⁻ homologue aux pDCs humaines et murines a été identifiée par le groupe de Josien. Elle exprime CD45R, CD45RC, CD5, CD90, CD161a, CD200, CD172a, CD32, CD86, TRANCE/RANK-L mais ni CD11b, CD11c ni CD103 (Anjubault et al., 2012; Hubert et al., 2004). Après activation, les pDCs de rat produisent de l'IFN de type 1, de l'IL-12p40 et de l'IL-6.

Dans notre modèle d'allogreffe cardiaque incompatible pour le CMH chez le rat, les pDCs jouent un rôle prédominant dans les processus tolérogènes mis en jeu. Le traitement des receveurs par un adénovirus codant pour la molécule de fusion CD40Ig (CD40 murin+ fragment Fc d'une IgG humaine) le jour de la greffe induit une prolongation de survie indéfinie (Guillot et al., 2002) grâce à la génération de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} allospécifiques (Guillonnet et al., 2007a). Notre groupe a récemment montré que l'accumulation de Tregs CD8⁺ tolérogènes et de pDCs dans la rate et le greffon est associée à l'induction de tolérance, suggérant des interactions privilégiées *in vivo* entre ces deux populations. De plus, *in vitro*, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} inhibent plus efficacement la prolifération des LTs CD4⁺ lorsqu'elles sont en contact avec des pDCs versus des cDCs allogéniques (Li et al., 2010). Les pDCs ont donc été utilisées préférentiellement pour étudier *in vitro* la spécificité antigénique des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} dans cette thèse.

En l'absence d'infection, les DCs situées en périphérie sont à l'état immature et jouent un rôle dans le maintien de la tolérance périphérique aux antigènes du soi (Ohnmacht et al., 2009). Lors d'une infection ou d'une transplantation, les DCs vont détecter les signaux de danger via leur nombreux PRRs et capter l'antigène, ce qui déclenche les processus de maturation et de migration. La maturation s'accompagne de modifications majeures d'expression de plusieurs centaines de gènes de la DC. Elle se traduit par des changements phénotypiques et fonctionnels importants :

- un changement de morphologie avec réorganisation du cytosquelette entraînant la formation de dendrites et l'acquisition d'une forte mobilité cellulaire
- une diminution de la capacité d'endocytose et de phagocytose
- une augmentation considérable d'expression des CMH-II et une meilleure stabilité des complexes CMHp à la membrane
- une augmentation de l'expression des molécules de costimulation B7 et d'adhérence

- la sécrétion de cytokines proinflammatoires et chimiokines qui vont permettre la différenciation des LTs et dont la nature dépend du stimulus initial reçu par les DCs via les PRRs
- la modification de l'expression des récepteurs aux chimiokines (Buckwalter and Albert, 2009). Grâce à l'expression de CCR7 (et la perte de CCR1 et CCR6), récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21, les DCs migrent vers les zones riches en LTs des ganglions lymphatiques drainants (Sozzani, 2005), où elles présentent l'antigène apprêté sur les CMHs aux LTs naïfs.

En transplantation, il existe différentes voies de reconnaissance des complexes CMHp étrangers présentés par les DCs activées, appelées voies d'alloreconnaissance.

1.3.2.2 Les voies d'alloreconnaissance

L'alloreconnaissance désigne les mécanismes par lesquels le système immunitaire du receveur reconnaît comme « étranger » un tissu provenant d'un individu de la même espèce, mais génétiquement différent. Les alloantigènes reconnus se classent en plusieurs familles : les antigènes érythrocytaires ABO, les antigènes des molécules du CMH de classe I ou II, les antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgmH) ou plus rarement les antigènes non polymorphiques, type collagène ou récepteur à l'angiotensine II (Zhang and Reed, 2010).

Chez l'Homme, les molécules du CMH sont appelées HLA : HLA-I d'isotype A, B ou C et HLA-II, d'isotype DP, DQ, DR et HLA non classique d'isotype -E, -F, -G. Chez le rat, le CMH, appelé RT1, se compose de RT1.A (classe I), RT1.B et RT1.D (classe II), et RT1.C, RT1.E, RT1.M (classe I non classique). Les CMHs-I sont exprimés par presque toutes les cellules nucléées alors que les CMHs-II sont principalement restreints aux CPAs. La structure détaillée de ces molécules sera abordée dans le chapitre 2 de cette thèse.

Les AgmH, comme MICA, MICB (MHC class I polypeptide-related sequences A et B) et H-Y, sont présents notamment sur les CEs, les monocytes et sont associés à l'augmentation du risque de rejet (Pabón et al., 2011; Sumitran-Holgersson, 2008).

La reconnaissance des molécules du CMH allogéniques ou d'allopeptides dérivés présentés par les CMHs du « soi », par le TCR des LTs effecteurs du receveur, va induire une réponse immunitaire très forte et conduire au rejet de la greffe. Il existe différentes voies d'alloreconnaissance qui diffèrent par les mécanismes cellulaires mis en jeu et leur implication dans le rejet au cours du temps (**Figure 2**).

1.3.2.2.1 La voie directe de reconnaissance

La voie directe se définit comme la reconnaissance directe, par les LTs du receveur, de complexes CMHp intacts à la surface des cellules du donneur dérivées de l'allogreffe. La présentation directe a été mise en évidence par une expérience du groupe de Talmage. La déplétion des leucocytes du greffon prévenait le rejet d'allogreffe thyroïdienne, alors que l'injection de CPAs du donneur (macrophages essentiellement) le restaurait (Talmage et al., 1976). Lors de l'allogreffe, les CPAs du donneur sont activées au sein du greffon et migrent vers les OLS du receveur où elles activent fortement les LTs (Larsen et al., 1990). Bien que les LTs soient sélectionnés dans le thymus contre des complexes CMHp du « soi », la réponse développée contre les CMHs étrangers est très forte. La voie directe de reconnaissance viole la règle de restriction au CMH du soi et peut être expliquée par la cross-réactivité des TCRs. La fréquence en LTs alloréactifs pré-existants est très élevée, de l'ordre de 1:100 à 1:100 000 chez l'Homme (Benítez and Najafian, 2008; Hornick et al., 1998) et jusqu'à 1:10 chez la souris (Suchin et al., 2001). Différentes hypothèses non exclusives ont été formulées pour expliquer les mécanismes moléculaires de cette forte réponse alloréactive directe. Dans un cas, les LTs sont capables de reconnaître directement les résidus polymorphiques des molécules du CMH du donneur, indépendamment du peptide présenté (Lombardi et al., 1991; Müllbacher et al., 1991). Dans l'autre cas, les LTs alloréactifs sont spécifiques d'un peptide individuel présenté par une molécule du CMH allogénique (Eckels et al., 1988; Weber et al., 1995). Ces deux modèles et leur contribution respective seront détaillés en partie 2. La présentation directe semble jouer un rôle prépondérant dans l'initiation de la réponse allogénique et dans le rejet aigu à court terme lors de greffes incompatibles pour le CMH (Braun et al., 1993). Elle est majoritaire sur une courte période après la greffe puis diminue rapidement avec la mort des CPAs du donneur (**Figure 2**). Différentes études ont montré une diminution de la fréquence des LTs avec une spécificité directe pour le donneur dans les mois suivant la transplantation (Hornick et al., 1998). Cependant, le groupe de Kreisel a décrit un mécanisme alternatif d'alloréconnaissance directe où les CE du greffon, via leur CMH-I, continueraient à activer les LTs CD8⁺ cytotoxiques allogéniques par cette voie (Kreisel et al., 2002).

1.3.2.2.2 La voie indirecte de reconnaissance

La voie indirecte définit la reconnaissance par les LTs du receveur de peptides allogéniques dérivés des CMHs du donneur et présentés par les CPAs du receveur. Les peptides antigéniques dominants présentés par la voie indirecte sont issus des régions hypervariables de liaison au peptide des CMHs allogéniques.

Les travaux d'Auchincloss ont démontré l'existence de cette voie *in vivo*. Dans son modèle de greffe de peau, des souris déficientes en LTs CD8⁺ rejettent rapidement le greffon provenant de souris déficientes pour le CMH-II (Auchincloss et al., 1993). Les LTs CD4⁺ du receveur ont donc reconnu des antigènes du donneur issus des CMHs-I allogéniques et présentés sur les CMHs-II des CPAs du receveur. Contrairement à la voie directe, la présentation indirecte nécessite la capture et l'apprêtement des alloantigènes sur les CMHs du soi à la surface des CPAs. Une source potentielle d'alloantigènes est la migration et la mort des DCs du donneur dans les OLS (Garrod et al., 2010). Egalement, les CPAs du receveur peuvent infiltrer le greffon et y capturer des antigènes, notamment par l'acquisition de fragments de membrane de fibroblastes, de cellules épithéliales et de CEs en apoptose (Samsonov et al., 2012). Les CPAs vont ensuite migrer vers les ganglions drainants pour activer les LTs spécifiques. Une étude récente de P. Bousso utilisant la microscopie biphotonique a mis en évidence ce phénomène *in vivo* (Celli et al., 2011). Elle a permis de visualiser une infiltration rapide des greffes de peau chez la souris par les DCs et les monocytes inflammatoires du receveur, qui migrent ensuite vers les ganglions drainant la greffe et présentent les alloantigènes captés aux LTs alloréactifs. La fréquence endogène des LTs alloréactifs préexistants spécifiques pour la voie indirecte est plus faible que pour la voie directe, en moyenne de 1:100 000 à 1 :1 000 000 des LTs (Baker et al., 2001; Hornick et al., 2000).

De façon générale, la capture d'un antigène exogène par les CPAs résulte en une présentation sur le CMH-II et une activation des LTs CD4⁺ alloréactifs. Cependant, la présentation croisée sur les CMHs-I par les DCs et CEs est possible (Joffre et al., 2012) et permet d'activer les LTs CD8⁺ alloréactifs qui participent alors à la phase effectrice du rejet (Celli et al., 2011; He and Heeger, 2004; Valujskikh et al., 2002).

La voie indirecte est également nécessaire à la fonction des LBs. Leur activation dépend de l'aide des LTs CD4⁺ stimulés via l'alloréconnaissance indirecte (Steele et al., 1996). De plus, la présentation indirecte des alloantigènes par les LBs du receveur joue un rôle important dans le rejet aigu d'allogreffes cardiaques chez la souris (Noorchashm et al., 2006).

Une fois l'organe greffé, la source d'alloantigènes disponibles est inépuisable. Ainsi, la voie indirecte d'alloreconnaissance est initiée rapidement après transplantation, gagne en intensité et se maintient durant toute la vie de l'allogreffé (**Figure 2**). Elle a été associée au rejet aigu d'allogreffé chez le rongeur (Fangmann et al., 1992; Brennan et al., 2009) et chez l'Homme (Liu et al., 1996) mais également et surtout au rejet chronique (Benichou, 1999; Bestard et al., 2008). En effet, la fréquence des LTs avec une allospécificité indirecte augmente au cours du temps chez des patients présentant un rejet chronique à la suite d'une greffe de cœur, de foie ou de rein (Hornick et al., 2000; Liu et al., 1996; Vella et al., 1997). Par ailleurs, Stanford a montré qu'après une greffe de poumon, les patients en rejet chronique ne répondent plus à la voie directe mais deviennent hyper-réactifs à la voie de présentation indirecte des alloantigènes, et conclut que cette voie est associée au rejet chronique (Stanford et al., 2003).

1.3.2.2.3 La voie semi-directe

Cette voie d'alloreconnaissance réfère à la capture de complexes CMHp allogéniques intacts à la surface des cellules du donneur par les CPAs du receveur, qui en retour les présentent et activent de façon directe les LTs alloréactifs. La présentation semi-directe implique le phénomène de trogocytose, à savoir l'échange de fragments de membrane entre cellules en contact. Le groupe de R. I. Lechler a été le premier à mettre en évidence ce phénomène dans une étude en 2004. Ils ont montré qu'après injection chez la souris, des DCs KO pour le CMH (CMH⁰) captent des complexes CMHp intacts par contact avec des DCs et des CEs activées et sont capables *ex vivo* d'induire la prolifération de LTs allospécifiques (Herrera et al., 2004). Plus récemment, dans un modèle de transplantation chez la souris, Brown a décrit *in vivo* la présence de DCs, mais aussi de LBs et macrophages, qui expriment à la fois des molécules du CMHs-I/II intacts du donneur et un allopeptide apprêté sur leur CMH-II propre, du « soi » (Brown et al., 2011). Cette configuration implique la possibilité pour les LTs CD4⁺ activés par la voie indirecte de réguler les LTs CD4⁺ activés de façon directe par la même cellule, ou de fournir une aide à l'activation directe des LTs CD8⁺ (**Figure 2**). La même équipe a également montré un transfert bidirectionnel du CMH-II, les cellules du donneur pouvant aussi capter et présenter des complexes CMHp du receveur (Brown et al., 2008). Ce mode de présentation semi-directe délivre un nouveau regard sur certaines études, comme celle de Lee montrant la capacité des LTs CD4⁺ de spécificité indirecte à amplifier la réponse cytotoxique des LTs CD8⁺ de spécificité directe (Lee et al., 1994). Les LTs sont également capables de présentation semi-directe. En effet, Tsang et

collègues ont montré que les LTs $CD4^+$ peuvent acquérir des complexes CMH-IIp par coculture avec des CPAs allogéniques, et induire l'apoptose et l'anergie de LTs $CD4^+$ naïfs de même spécificité antigénique (Tsang et al., 2003). De plus, l'acquisition de molécules du CMH-II fonctionnelles par les LTs $CD8^+$ chez la souris permet une interaction directe avec les LTs $CD4^+$, fournissant ainsi une aide aux LTs $CD8^+$ (Romagnoli et al., 2013).

La présentation semi-directe semble intervenir rapidement après la greffe et se prolonger sur une longue période (**Figure 2**) (Brown et al., 2008; Toyokawa et al., 2008). Cependant, sa contribution relative au rejet de greffe reste inconnue à ce jour.

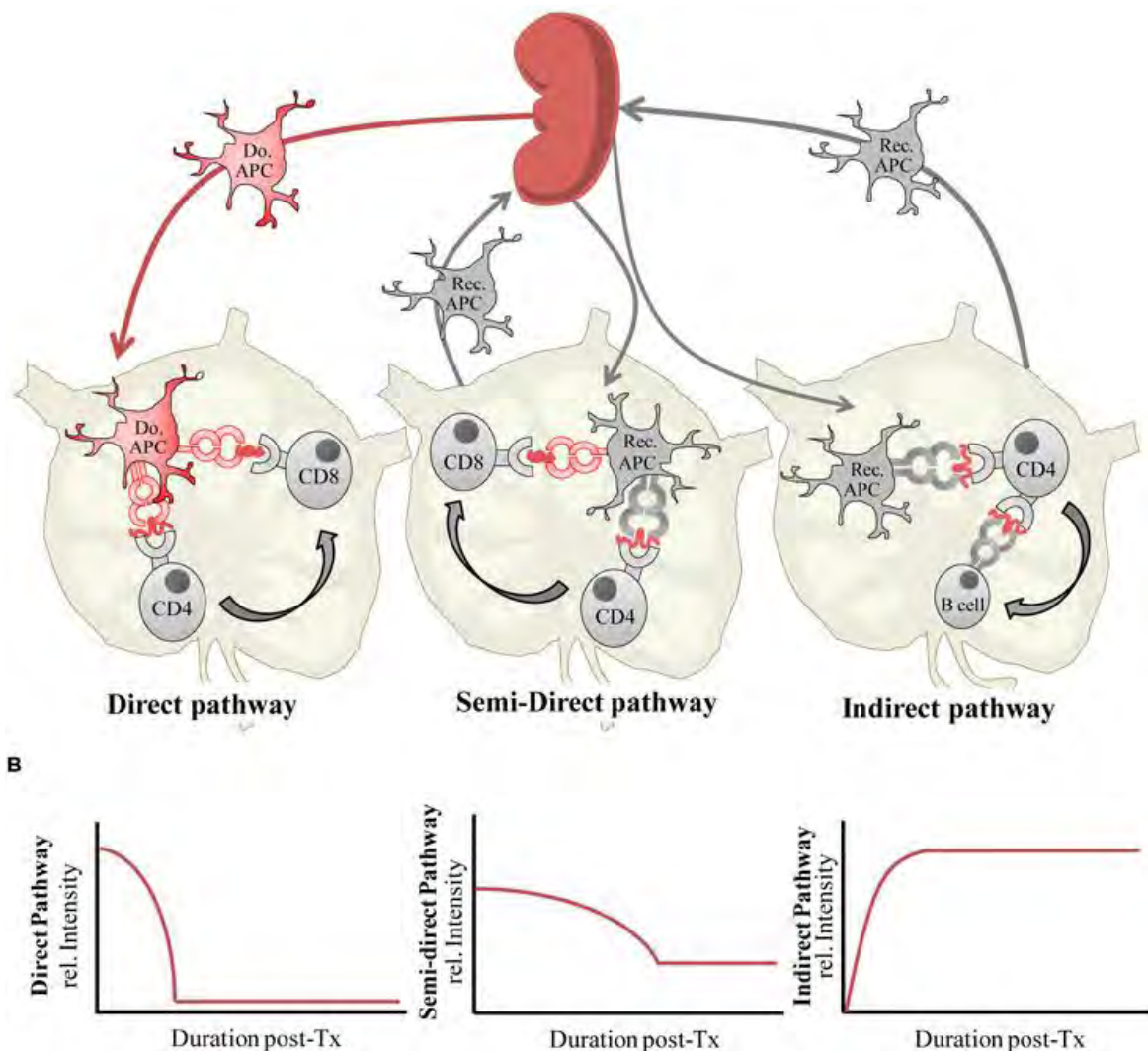


Figure 2 : Les différentes voies d'alloreconnaissance, directe, semi-directe et indirecte et leur intensité relative après transplantation.

D'après (Sagoo and Lombardi, 2012). Les cellules et molécules (CMH et peptide) du donneur sont représentées en rouge alors que celles du receveur sont représentées en gris.

1.3.2.3 L'activation des lymphocytes T

Comme décrit précédemment, l'allorecognition est la base de la réponse immunitaire adaptative en transplantation et induit l'activation des LTs alloréactifs pré-existants. En réalité, trois signaux indépendants et ordonnés sont nécessaires pour garantir une réponse cellulaire T efficace.

1.3.2.3.1 Le signal de reconnaissance antigénique : signal 1

Le premier contact entre une CPA et un LT s'effectue non spécifiquement via des molécules d'adhésion présentes à la surface de chacune des cellules. Le TCR des LTs va ensuite interagir spécifiquement avec le complexe CMHp porté par la CPA puis s'associer de façon non covalente avec le complexe CD3, ce qui déclenche une cascade de signalisation nécessaire à la transduction du signal antigénique. La structure du TCR et le complexe TCR/CD3 seront détaillés dans la partie 2. Les signaux délivrés par le complexe TCR/CD3 seul ne sont pas suffisants pour activer pleinement les LTs naïfs.

1.3.2.3.2 Le signal de costimulation : signal 2

Un second signal essentiel est apporté par l'interaction de molécules dites de costimulation. La liaison de ces molécules présentes sur les CPAs avec leurs ligands respectifs à la surface des LTs va renforcer l'avidité de l'interaction et amplifier le signal 1 induit par l'engagement du TCR. En l'absence de ce signal, les LTs sont incapables de proliférer en réponse à une nouvelle stimulation antigénique, état d'anergie qui peut être levé par un apport exogène d'IL-2 (Beverly et al., 1992). Enfin, cette interaction induit un signal intracellulaire aux LTs influençant la réponse cellulaire, indépendamment des sous-unités CD3 (Bjorndahl et al., 1989). Les signaux de costimulation sont un ensemble extraordinairement complexe d'interactions qui peuvent agir simultanément ou à des temps différents et ont des effets additifs ou opposés sur l'activation et la différenciation des LTs.

Il existe trois grandes familles de molécules de costimulation : la superfamille des Igs, la superfamille des récepteurs au TNF et la famille émergente TIM pour T cell Ig and mucin containing domain (**Figure 3**). Une classification additionnelle existe selon la nature du signal transduit, activateur ou inhibiteur pour la cellule T. En effet, alors que certaines molécules de costimulation induisent l'activation des LTs naïfs et la génération de LTs mémoires, d'autres inhibent l'activation T et induisent l'anergie ou l'apoptose. De plus, l'effet engendré peut être différent selon le type cellulaire, entre LTs effecteurs et Tregs. La compréhension des signaux

de costimulation dans leur complexité est fondamentale et d'intérêt thérapeutique pour l'induction de tolérance en transplantation.

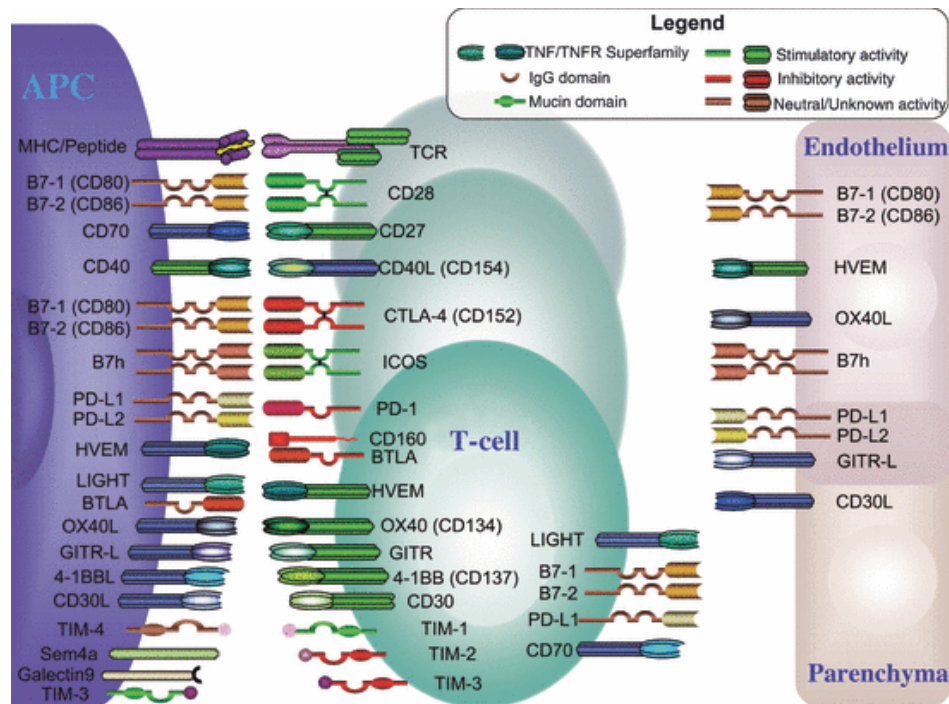


Figure 3 : Les différentes molécules de costimulation.

D'après (Li et al., 2009b). Elles sont représentées par ordre d'expression sur les LTs (milieu) : constitutive (haut), après activation précoce (milieu) et sur les LTs effecteurs ou mémoires (bas). Les ligands exprimés par les CPAs (gauche), par les CEs activées (haut droite), par les cellules parenchymales (bas droite) ou les deux (milieu droite) et par les LTs activés eux-mêmes (milieu droite) sont également représentés.

Les membres les plus connus de la superfamille des Ig sont CD28 et CTLA-4. CD28 est constitutivement exprimé par les LTs (**Figure 3**) et se lie aux membres de la famille B7, CD80 et CD86 sur les CPAs. Les signaux engendrés abaissent le seuil d'activation des LTs, augmentent la stabilité de l'ARNm codant pour l'IL-2 et donc son expression et favorisent la prolifération T et la résistance à l'apoptose. Après activation, les LTs surexpriment CTLA-4, molécule inhibitrice de forte affinité pour CD80 et CD86, qui entre en compétition avec CD28 et agit comme un régulateur négatif de la réponse immune. La signalisation via CD28 entraîne également l'expression d'autres molécules de costimulation par les LTs activés dont la plus connue est le CD154 (CD40L), membre de la famille TNF/TNFR et ligand de CD40.

La molécule **CD40** est une protéine transmembranaire de la superfamille des récepteurs au TNF. Elle est exprimée par les DCs activées, les macrophages, les LBs, les cellules épithéliales et CEs, les plaquettes et les progéniteurs hématopoïétiques (van Kooten and Banchereau, 1997; Kooten and Banchereau, 2000). Son ligand, le **CD40L** (également appelé

gp39 ou CD154), membre de la famille du TNF, existe sous forme membranaire ou soluble, cette dernière forme pouvant jouer le rôle de cytokine sur les cellules CD40⁺ distantes (Ludewig et al., 1996). Il est exprimé par les LTs CD4⁺ et une fraction des LTs CD8⁺ activés, ainsi que sur les éosinophiles (Gauchat et al., 1995), les basophiles, les CEs, les macrophages (Mach et al., 1997), les DCs (Pinchuk et al., 1996) et les LBs (Grammer et al., 1995). Récepteur et ligand peuvent être exprimés par la même cellule, permettant ainsi la génération de signaux bidirectionnels.

La liaison du **CD40 sur les LBs** induit leur prolifération, leur différenciation et augmente leur capacité de présentation antigénique et la production d'anticorps, ce qui favorise la réponse immune humorale et la survenue du rejet aigu et chronique (van Kooten and Banchereau, 1997). Par ailleurs, l'activation dépendante de CD40 permet l'expression de molécules d'adhésion et de costimulation (ICAM, CD23, CD80, CD86) et la production de cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α) par les LBs (**Figure 4**).

La liaison du **CD40 sur les DCs** et monocytes augmente leur survie (Foy et al., 1996), leur sécrétion de cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , Macrophage inflammatory protein 1 alpha MIP1 α) et leur expression de molécules de costimulation (CD80, CD86, ICAM-1, lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3)). L'interaction CD40/CD40L est donc primordiale pour la maturation et la fonction des CPAs et par conséquent pour l'activation des LTs.

En effet, les souris déficientes pour le CD40L présentent un défaut de réponse lymphocytaire Th1, qui résulterait d'un défaut de production d'IL-12 par les CPAs (Campbell et al., 1996). De plus, l'interaction CD40-CD40L entre CPAs et LTs CD4⁺ confère aux CPAs la capacité de stimuler les réponses T CD8⁺ cytotoxiques (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998a) via la liaison du CD27 des LTs CD8⁺ par le CD70 des CPAs (Feau et al., 2012). D'autre part, l'engagement direct du CD40L permet l'activation et la sécrétion de cytokines de type Th1 (IFN γ , IL-2, TNF- α) et de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) par les LTs (Blair et al., 2000; Peng et al., 1996).

Enfin, les interactions CD40-CD40L sont importantes pour l'activation des CEs (Hollenbaugh et al., 1995), des fibroblastes (Sempowski et al., 1998) et des plaquettes (Inwald et al., 2003), conduisant au recrutement et à l'activation des LTs aux sites de l'inflammation.

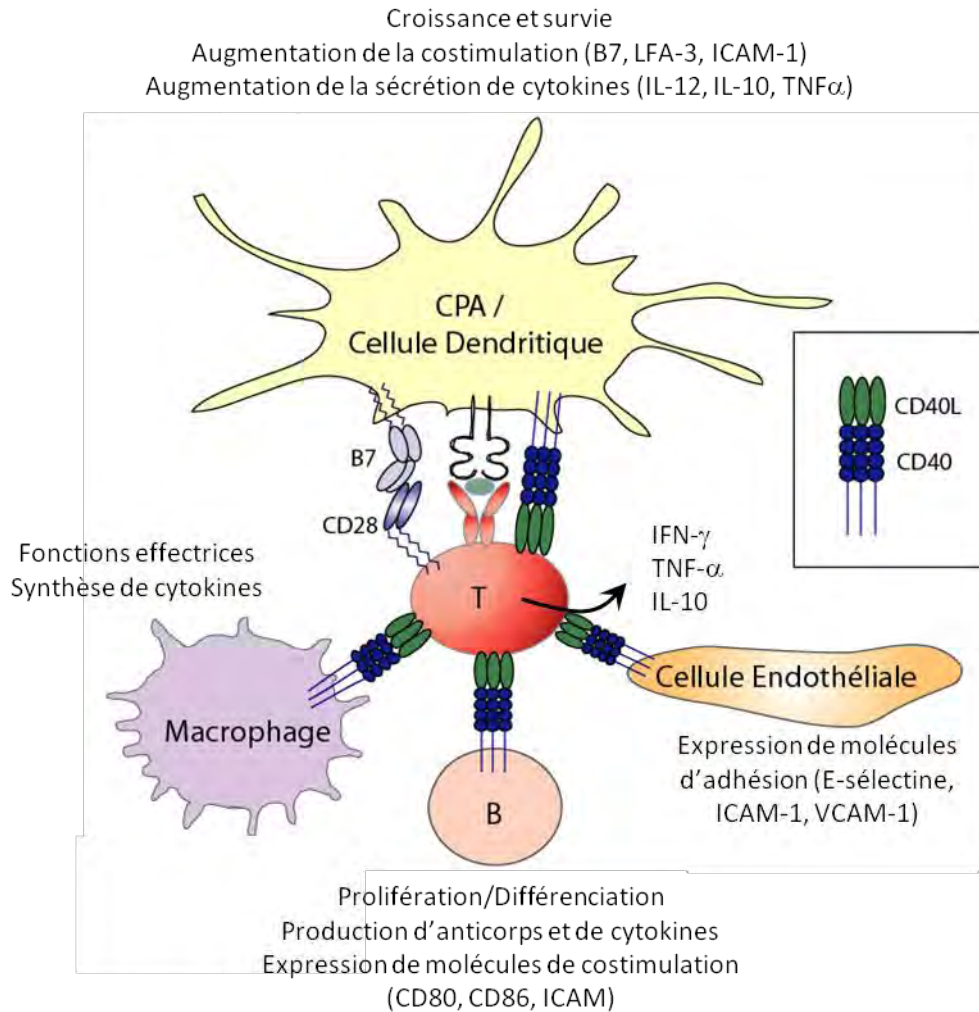


Figure 4 : Conséquences fonctionnelles de l'interaction CD40-CD40L sur différents types cellulaires.

Schéma adapté de la thèse de C. Guillonéau.

Du fait de l'importance de la voie CD40-CD40L dans l'activation de nombreux médiateurs du rejet d'allogreffe, de nombreuses équipes se sont intéressées au blocage de cette voie par différentes stratégies pour empêcher la survenue du rejet du greffon. De prime abord, les chercheurs ont pensé que la monothérapie avec un anticorps anti-CD40L serait efficace à elle seule car elle limiterait la maturation des CPA, modulerait l'interaction B7-CD28 et entraînerait l'anergie des LTs. Plusieurs équipes ont donc testé des **anticorps anti-CD40L** pour inhiber le rejet d'allogreffe dans des modèles expérimentaux variés. Ainsi, le blocage via des anticorps anti-CD40L peut prévenir du rejet d'allogreffe cardiaque chez la souris (Larsen et al., 1996a), d'allogreffe rénale et d'îlots pancréatiques dans le foie chez le primate non humain (Kenyon et al., 1999a, 1999b; Kirk et al., 1999). Cependant, malgré ces résultats prometteurs, l'anticorps anti-CD40L n'induit pas de tolérance complète dans ces modèles et ne peut prévenir du rejet de greffe de peau chez la souris (Larsen et al., 1996b)

induit par la population de LTs CD8⁺ alloréactifs, qu'en association avec des anticorps anti-CD8 (Honey et al., 1999). En effet, Jones a montré que le blocage de CD40L n'a pas d'effet sur l'activation, la prolifération, la différenciation, le recrutement au niveau du greffon cardiaque et la production de cytokines des LTs CD8⁺ médiateurs du rejet d'allogreffe cardiaque (Jones et al., 2000). De plus, les interactions CD40-CD40L sont essentielles pour l'activation des LTs CD8⁺ naïfs et leur différenciation en LTs cytotoxiques mais pas pour celle des LTs mémoires activés (Zhai et al., 2002). D'autre part, les infections virales de souris peuvent modifier la réponse au blocage de CD40L en induisant des cellules mémoires alloréactives capables de cross-réactivité avec les antigènes du donneur (Adams et al., 2003).

Afin d'améliorer ces résultats, le blocage de la voie CD40-CD40L a été associé à **d'autres stratégies thérapeutiques**. Ainsi, le blocage de la voie de costimulation B7-CD28 grâce au CTLA4-Ig (portion extracellulaire du CTLA-4 fusionnée au fragment Fc d'une IgG) agit en synergie avec les anticorps anti-CD40L pour induire la survie à long terme d'allogreffe de peau et inhiber le rejet chronique de cœur chez la souris (Larsen et al., 1996b) et prolonger la survie d'allogreffe de rein chez le primate (Kirk et al., 1997). De même, la combinaison d'anticorps anti-CD40L et anti-CD86 induit la prolongation de survie de l'allogreffe cardiaque via l'action de Tregs CD4⁺ (Coenen et al., 2006) chez la souris. L'association des anti-CD40L avec la transfusion de sang du donneur (DST) induit également la survie à long terme de l'allogreffe cardiaque chez la souris, soit associée à l'augmentation de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-10) dans le greffon et l'inhibition de l'expression de CD80 (Hancock et al., 1996), soit dépendante de l'expression de l'Hème Oxygénase 1 (HO-1) (Yamashita et al., 2006) ou via des NKs qui régulent l'activation et l'infiltration de monocytes et macrophages dans le greffon (van der Touw et al., 2012).

L'association du blocage de la voie CD40-CD40L avec des **drogues immunosuppressives** a également été testée. L'utilisation de la ciclosporine A ne semble pas favorable car elle diminue l'expression de CD40L (Fuleihan et al., 1994) et inhibe la prolifération, l'apoptose et donc la délétion des LTs alloréactifs, nécessaire à l'induction d'une tolérance périphérique (Li et al., 1999b). En revanche, dans cette même étude, la combinaison de la rapamycine avec des anticorps anti-CD40L et CTLA4-Ig induit une apoptose massive de ces LTs alloréactifs et une tolérance à la greffe de peau chez la souris. Chez le primate non humain, l'administration d'un traitement combiné DST/rapamycine/anti-CD40L permet d'induire une survie à long terme d'une allogreffe de peau (Xu et al., 2003) et prévient le rejet d'allogreffe rénale avec induction de tolérance opérationnelle chez certains receveurs (Preston et al., 2005). Enfin, la rapamycine permet de contrôler les LTs mémoires

alloréactifs responsables du rejet observé dans un modèle murin de greffe de moelle osseuse en dépit du blocage de la costimulation avec des anti-CD40L et CTLA4-Ig (Ramsey et al., 2013).

La survenue de complications thromboemboliques lors d'essais cliniques d'anti-CD40L pour le traitement de maladies autoimmunes (MAIs) a freiné l'engouement des chercheurs pour ces anticorps. Dans le cas du lupus systémique érythémateux, les thromboses observées pourraient résulter de l'action des anticorps sur les plaquettes et les CEs (Sidiropoulos and Boumpas, 2004). L'administration d'anticoagulants tels que l'héparine et le kétorolac permet de diminuer l'incidence des thromboses associées avec le traitement anti-CD40L chez le primate (Kawai et al., 2000; Koyama et al., 2004). Afin d'éviter les complications, des approches alternatives se sont développées avec l'utilisation de nouveaux agents bloquants comme la molécule de fusion CD40Ig (portion extracellulaire du CD40 murin fusionné au fragment Fc d'une IgG) ou les anticorps anti-CD40.

Ainsi, le traitement par administration d'un adénovirus codant pour **CD40Ig** (AdCD40Ig) a été développé et permet une production localisée et à long terme de la molécule. Chez le rongeur, il permet l'induction de tolérance à la greffe de foie (Nomura et al., 2002), prolonge la survie de greffe d'îlots (Rehman et al., 2007) et de cœur (Masunaga et al., 2005) et induit la survie à long terme de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Guillot et al., 2002), via la génération de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonnet et al., 2007a). L'association du traitement AdCD40Ig avec un anticorps anti-CD28 diminue les lésions de rejet chronique observées avec l'AdCD40Ig seul (pas de lésions chez 60% des receveurs), inhibe totalement la production d'alloanticorps et modifie les mécanismes régulateurs (Guillonnet et al., 2007b). De même, l'association avec un anticorps anti-ICOS ou la molécule de fusion Rank-Ig (receptor-activating NF-κB) contribue à diminuer les lésions de rejet chronique (Guillonnet et al., 2004, 2005). Toutefois, le traitement avec un adénovirus associé (AAV) codant CD40Ig ne prévient pas le rejet d'allogreffe rénale chez le primate (Angin et al., 2012).

Une deuxième alternative aux anti-CD40L est le **blocage de la molécule CD40**. Plusieurs anticorps ont été récemment testés chez le primate avec des résultats encourageants. En effet, un anticorps anti-CD40 humain (4D11) prolonge significativement la survie de greffe de rein en monothérapie d'induction et de maintenance (Aoyagi et al., 2009), sans complications thromboemboliques. Un autre anticorps anti-CD40 (ASKP1240) en monothérapie pendant 6 mois inhibe efficacement les réponses cellulaires et humorales alloimmunes et prévient le rejet d'allogreffes hépatiques (Oura et al., 2012). La combinaison

avec d'autres agents et immunosuppresseurs améliore grandement les résultats dans plusieurs modèles. Ainsi, l'association Belatacept (variant de CTLA4-Ig)/anti-CD40 (Chi220) ou rapamycine/anti-IL-2/anti-CD40 non déplétant (3A8 ou 2C10) prolonge la survie d'allogreffe d'îlots chez le primate (Adams et al., 2005; Badell et al., 2012; Lowe et al., 2012).

Les mécanismes impliqués dans l'ensemble de ces études sont multiples et incluent la délétion de LTs CD8⁺ alloréactifs (Iwakoshi et al., 2000), de LTs CD4⁺ alloréactifs par apoptose (Blair et al., 2000) ou par l'activation du complément et l'engagement des récepteurs au fragment Fc des anticorps anti-CD40L (Monk et al., 2003), l'anergie des LTs CD4⁺ (Quezada et al., 2005), l'inhibition de la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les DCs (IL-6, TNF, IL1 β , IL-12)(Ferrer et al., 2012) et le développement de Tregs permettant un mécanisme de régulation actif. En effet, le blocage avec des anticorps anti-CD40L génère des Tregs CD4⁺CD25⁺ spécifiques d'alloantigènes capables à la fois de prévenir les rejets de greffe de peau (Maurik et al., 2002) et de cœur (Zhai et al., 2006), induits par des LTs CD8⁺ alloréactifs, mais aussi capables de tolérance infectieuse dans un modèle de greffe de peau chez la souris (Graca et al., 2000). Une étude récente de thérapie anti-CD40L dans un modèle de greffe de poumon chez la souris a également montré une fréquence augmentée de Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ au niveau du greffon associée à une atténuation du rejet aigu cellulaire (Dodd-o et al., 2011). Dans un modèle murin transgénique, l'association DST/anti-CD40L induit la conversion en périphérie de LTs CD4⁺FoxP3⁻ alloréactifs spécifiques de l'ovalbumine (OVA) en Tregs FoxP3⁺CD25^{high} allospécifiques s'accumulant dans la greffe de peau OVA⁺ dont la survie est alors prolongée (Ferrer et al., 2011). Enfin, dans notre modèle de greffe cardiaque au laboratoire, le traitement AdCD40Ig génère des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} qui sécrètent de l'IFN γ , stimulant à son tour la production d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les CEs et les DCs du greffon (Guillonneau et al., 2007a). Plus particulièrement, l'absence de contact *in vitro* entre les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} et les LTs CD4⁺ effecteurs induit une suppression dépendante d'IDO. En revanche, le contact direct avec les LTs CD4⁺ génère des mécanismes alternatifs de suppression impliquant l'IFN γ et la fibroleukin 2 (FGL2) (Li et al., 2010).

1.3.2.3.3 Le signal cytokinique : signal 3

Après la liaison du TCR et des molécules de costimulation, trois voies complexes de signalisation intracellulaire sont activées : la voie de la protéine kinase C (PKC), la voie des calcineurines et la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) qui activent

respectivement les facteurs de transcription NF- κ B, NFAT (Nuclear factor of activated T cells) et AP-1. L'action de ces facteurs entraîne une progression des LTs dans le cycle cellulaire, la production d'IL-2 et la surexpression de la chaîne α de haute affinité du récepteur à l'IL-2 (CD25). La production de grosses quantités d'IL-2 et d'autres cytokines constitue le signal 3 et agit de façon autocrine et paracrine sur les LTs. La transduction des signaux délivrés par l'IL-2 conduit les LTs jusqu'à la mitose et initie l'expansion clonale et la différenciation des LTs pleinement activés. Certains immunosuppresseurs comme la ciclosporine et le tacrolimus inhibent la voie des calcineurines nécessaire à la synthèse de l'IL-2 et donc la prolifération des LTs (Clipstone and Crabtree, 1992).

1.3.2.3.4 La polarisation lymphocytaire

Après activation, les LTs CD4⁺ naïfs Th0 vont se différencier en cellules effectrices T CD4⁺ « helper » (Th) ou en Tregs, caractérisées par leur facteur de transcription, leur signature cytokinique et leurs capacités fonctionnelles (**Figure 5**). De nombreux facteurs vont influencer cette différenciation, parmi lesquels le statut immunologique et le traitement immunosuppresseur du receveur, les lésions induites par l'ischémie reperfusion et le degré de disparité entre le donneur et le receveur. Ces éléments influent sur la sécrétion de cytokines et chimiokines et sur le recrutement de différents types cellulaires dans le microenvironnement lié à l'activation T. La polarisation est également dépendante des signaux de costimulation délivrés par les CPAs. Cette déviation vers un profil particulier n'est toutefois pas définitive. Les LTs gardent une certaine plasticité et sont capables de dévier vers un autre type de helper sous l'influence des cytokines du microenvironnement ou de la costimulation.

La production d'IL-12 par les DCs activées et d'IFN γ par les DCs, NKs, NKTs et les LTs entraîne la différenciation des LTs CD4⁺ Th0 en LTs **Th1** via la signalisation par STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4). Ces cellules expriment le facteur de transcription Tbet (T-box expressed in T cells), qui active le programme génétique Th1 et réprime les facteurs de différenciation Th2 (Szabo et al., 2000), et sécrètent de l'IFN γ , de l'IL-2 et du TNF- α principalement. Ces cytokines induisent une différenciation Th1, l'activité cytotoxique des T CD8⁺, l'activation des NK, la production d'IgG2a par les LBs et la réaction d'hypersensibilité retardée par les macrophages. La liaison de LFA-1 à ICAM favoriserait également la différenciation Th1 (Smits et al., 2002). Les cellules Th1 sont associées à des maladies inflammatoires et autoimmunes dont le diabète (Csorba et al., 2010). En transplantation, elles sont impliquées à la fois dans le rejet aigu (D'Elios et al., 1997) et chronique de l'allogreffe (Obata et al., 2005).

A l'inverse, l'IL-4 sécrétée par les LTs Th2, les mastocytes, les basophiles et les DCs favorise la différenciation en LTs **Th2** via la signalisation par STAT6 (Shimoda et al., 1996). Par ailleurs, la présence d'IL-33 ou une forte costimulation de CD28 semble favorable au développement d'une réponse Th2 (Rodríguez-Palmero et al., 1999; Schmitz et al., 2005). Les cellules Th2 expriment le facteur de transcription GATA-3 (GATA-binding-factor 3) (Zheng and Flavell, 1997) et sécrètent elles-mêmes de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13. Elles sont impliquées dans la réponse immune humorale et entraînent une commutation isotypique en faveur des IgG1 et IgGE (Rizzo et al., 1995); elle activent également les mastocytes et éosinophiles (Goldman et al., 2001), médiateurs du rejet d'allogreffe. Les Th2 sont prédominants dans l'asthme et l'allergie et sont classiquement associés au rejet chronique en transplantation (Illigens et al., 2009; Nocera et al., 2004) ou à l'induction de tolérance (Amarnath et al., 2011; Waaga-Gasser et al., 2009; Yin et al., 2010) selon les études.

La cytokine immunosuppressive TGF- β (transforming growth factor) permet la génération de **Tregs** CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ sécrétrices d'IL-10 et de TGF- β et inhibe la différenciation Th1 et Th2.

Le TGF- β , en association avec l'IL-4, conduit également à la différenciation en cellules **Th9** proinflammatoires, qui comme leur nom l'indique, sécrètent majoritairement de l'IL-9 et recrutent des mastocytes (Tan and Gery, 2012). Elles sont associées aux MAIs et à l'allergie; leur rôle en transplantation reste à étudier.

La présence de TGF- β , d'IL-6 et d'IL-23 dans le microenvironnement favorise la différenciation en cellules **Th17**, décrites en 2005 pour la première fois (Harrington et al., 2005), exprimant le facteur de transcription ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor gamma t) et sécrétant de l'IL-17, IL-21, IL-22, IL-6 et TNF. L'IL-17 est proinflammatoire *in vivo*, stimule la granulopoïèse et le recrutement des neutrophiles au niveau du greffon et induit des lésions précoces après une allotransplantation hétérotopique de trachée chez la souris (Lemaître et al., 2013a). Les Th17 proinflammatoires sont associées aux MAIs et au rejet aigu d'allogreffe (Antonysamy et al., 1999; Li et al., 2006; Tang et al., 2001). Les patients présentant un rejet aigu d'allogreffe de foie ont des taux sériques d'IL-23 et d'IL-17 plus élevés, suggérant un rôle des Th17 dans l'attaque précoce du greffon (Fàbrega et al., 2009). D'autres études suggèrent une implication des Th17 dans le rejet chronique d'allogreffe, notamment dans la survenue de vasculopathie chronique d'allogreffe chez la souris (Yuan et al., 2008) et dans la physiopathologie de la bronchiolite oblitérante chez l'Homme

(Vanaudenaerde et al., 2008) et la souris traitée avec de la ciclosporine A (Lemaître et al., 2013b).

L'association IL-6 et IL-21 proinflammatoires induit des lymphocytes **T_{fh}** folliculaires, exprimant le facteur de transcription Bcl-6 (B cell lymphoma 6) et sécrétant de l'IL-4 et de l'IL-21. Les T_{fh} se trouvent dans les follicules des OLS et sont importants pour la maturation des cellules B et la production durable d'alloanticorps, jouant ainsi un rôle dans le rejet humoral (Conlon et al., 2012).

Enfin, la combinaison des cytokines proinflammatoires IL-6 et TNF- α induit la polarisation en lymphocytes **Th₂₂** sécrétant d'IL-22. Ces cellules ont été identifiées en 2009 chez l'Homme dans un contexte d'inflammation de la peau (Trifari et al., 2009). Leur implication dans le rejet de greffe n'a pas été démontrée.

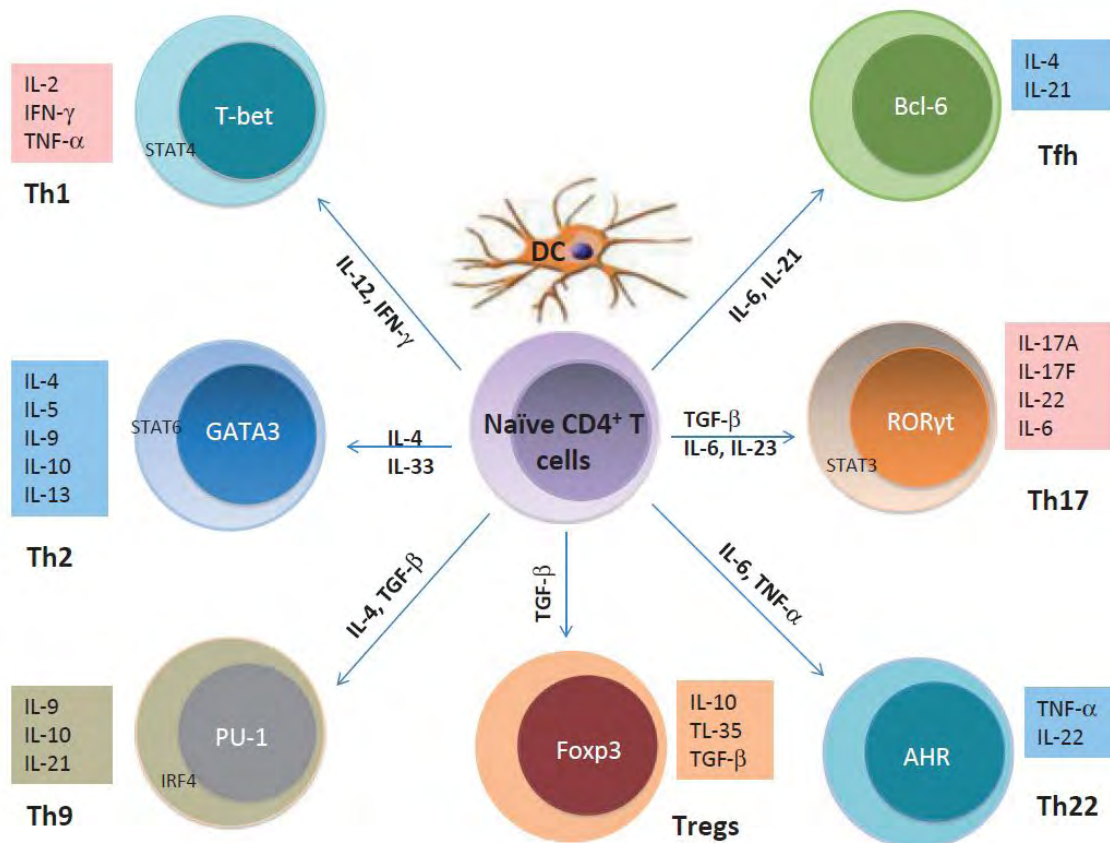


Figure 5 : La différenciation des LTs CD4⁺ naïfs en sous-populations effectrices.
D'après (Liu et al., 2013c).

Les **LTs CD8⁺** se différencient quant à eux en lymphocytes T cytotoxiques (CTL), en cellules cytotoxiques Tc2, en Tc9, en Tregs, ou en Tc17 (**Figure 6**) producteurs d'IL-17 (Burrell and Bishop, 2010).

La production d'IL-12 par les DCs, activées via l'engagement de leur TLRs ou de CD40 par les Th CD4⁺ activés (Schoenberger et al., 1998b), entraîne la différenciation des LTs CD8⁺ naïfs en **CTLs** (ou **Tc1**) (Filatenkov et al., 2005). Ces cellules expriment les facteurs de transcription Tbet et Eomes et sécrètent de l'IFN γ et du TNF- α . Après activation, les CTLs vont proliférer et acquérir des fonctions effectrices cytotoxiques impliquées dans le rejet de greffe (cf § 1.3.2.4.1 La réponse cellulaire cytotoxique).

L'IL-4 favorise la différenciation en LTs **Tc2**, qui sécrètent de l'IL-5, IL-4, IL-13, IL-6 et IL-10 (Sad et al., 1995) et possèdent une activité cytotoxique (Halverson et al., 1997). Comme leurs homologues Th2, les Tc2 sont impliqués dans la pathogénèse de l'asthme (Betts and Kemeny, 2009). En transplantation, les Tc2 inhibent le rejet d'allogreffe de moelle osseuse et la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD)(Erdmann et al., 2004; Fowler and Gress, 1998) mais sont aussi impliqués dans le rejet d'allogreffe cardiaque chez la souris par recrutement d'éosinophiles dans le greffon (Delfs et al., 2001).

Comme pour la différenciation Th17, la présence de TGF- β , IL-23 et IL-6 dans le microenvironnement favorise la différenciation en cellules **Tc17** récemment décrites, exprimant le facteur de transcription ROR γ t (Huber et al., 2009) et sécrétant de l'IL-17, IL-21 et IL-22. Les Tc17 proinflammatoires sont associées aux MAIs (diabète, arthrite rhumatoïde, colite, sclérose multiple...) et au cancer. Les Tc17 ont également été associés à des lésions tissulaires de la peau en cas de GvHD chez l'Homme (Lai et al., 2012).

Le TGF- β , en association avec l'IL-4, conduit à la différenciation en cellules **Tc9** proinflammatoires, qui sécrètent majoritairement de l'IL-9 et sont impliquées dans l'inflammation des voies aériennes induite par les Th2 (Visekruna et al., 2013).

Enfin, les cytokines immunosuppressives TGF- β et IL-15 permettent la génération de **Tregs** CD8⁺ sécrétrices d'IL-10, de TGF- β et d'IFN γ (cf. § 3.3.1 Les lymphocytes T régulateurs).

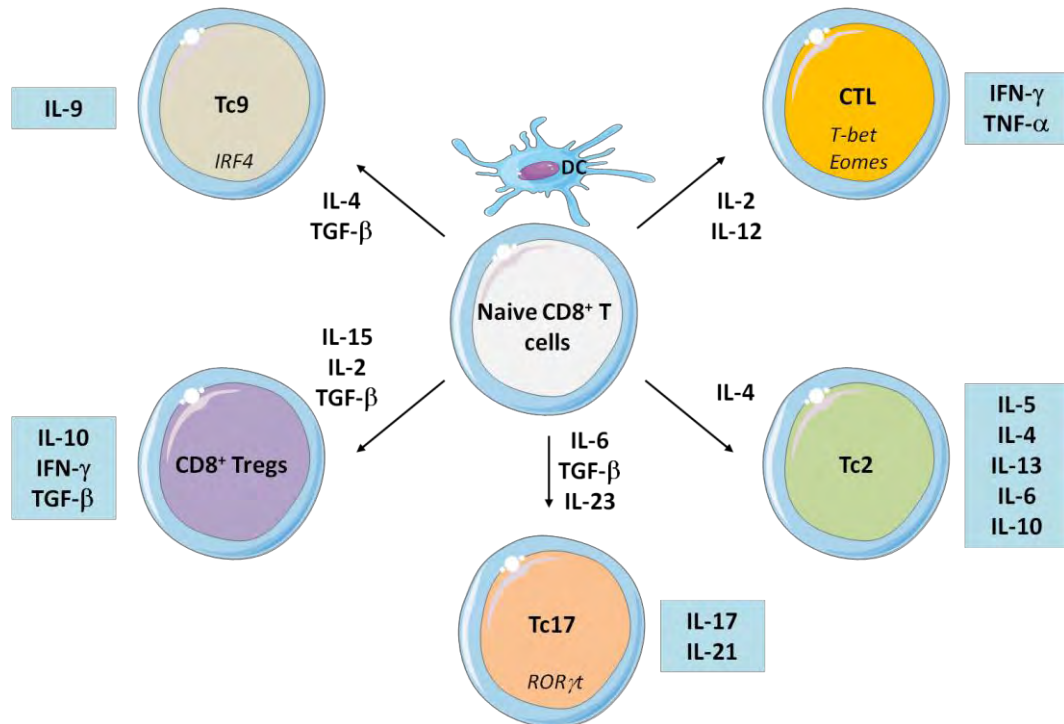


Figure 6 : La différenciation des LTs CD8⁺ naïfs en sous-populations effectrices.

1.3.2.4 Les mécanismes effecteurs du rejet de greffe

La phase effectrice de destruction du tissu transplanté implique une grande variété d'acteurs et de mécanismes cellulaires. Les LTs CD4⁺ Th précédemment décrits jouent un rôle crucial dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative conduisant au rejet de greffe, car ils activent différentes populations de cellules effectrices, notamment les CTLs, les NKs, les macrophages et les LBs.

1.3.2.4.1 La réponse cellulaire cytotoxique

Après activation, les CTLs migrent au niveau du greffon et lient par leur TCR les CMHs-I allogéniques portés par les CEs et les CPAs. Elles relarguent alors des granules contenant des molécules cytotoxiques telles que la perforine qui s'insère à la membrane et facilite l'import de granzyme B (Metkar et al., 2002). Cette chaîne d'évènements est connue sous le nom de la voie d'exocytose des granules et aboutit à l'apoptose de la cellule cible via l'activation de la voie des caspases. Les CTLs surexpriment également Fas Ligand (FasL) qui, après engagement de Fas, induit l'apoptose et la lyse de la cellule cible (Ju et al., 1994). Enfin, les CTLs sécrètent des médiateurs solubles tels que le TNF- α , le TNF- β et l'IFN γ , participant à l'activation des macrophages. En l'absence de Th CD4⁺, la cytotoxicité exercée par les CTLs et le rejet du transplant sont induits exclusivement par la voie TNF-

α /TNFR (Zimmerer et al., 2012). Malgré un rôle prouvé de l'activité cytotoxique par les CTLs dans le rejet aigu, des études montrent qu'elle n'est pas indispensable (Selvaggi et al., 1996) et que les molécules cytotoxiques peuvent aussi jouer un rôle immunorégulateur en induisant l'apoptose des cellules du receveur (Bose et al., 2003). Les LTs CD4⁺ peuvent également exercer une activité cytotoxique par les systèmes perforine/granzyme ou Fas/FasL (Brown, 2010).

Les cellules **NKs**, dites cellules « tueuses naturelles », sont des lymphocytes granulés qui partagent certaines caractéristiques fonctionnelles avec les CTLs et qui sécrètent des médiateurs proinflammatoires (IFN γ , TNF- α). Après activation par l'IL-2 produite par les Th1, elles peuvent lyser leurs cibles de façon non spécifique de l'antigène et ne requièrent ni signaux de costimulation ni signaux de différenciation. Plusieurs études récentes démontrent un rôle des NKs dans le rejet de greffe. Chez la souris, les NKs contribuent au rejet aigu de greffe de peau induit par les LTs CD4⁺ activés par la voie indirecte (Ito et al., 2008). Une autre étude montre que la vasculopathie chronique de l'allogreffe de cœur induite par des anticorps anti-donneur (DSA) est dépendante des NKs et non du complément (Hirohashi et al., 2012). Chez l'Homme, la proportion de NKs et de transcrits associés est augmentée dans les biopsies de patients transplantés rénaux présentant un rejet humoral, suggérant un rôle des NKs dans l'atteinte vasculaire du greffon (Hidalgo et al., 2010; Sellarés et al., 2013). Cependant, une proportion augmentée de NKs en périphérie est également décrite chez des patients opérationnellement tolérants (Sagoo et al., 2010). D'après une autre étude, les NKs analysés dans le sang périphérique de patients transplantés rénaux sont caractéristiques de l'efficacité de l'immunosuppression et pourraient informer sur le statut immunitaire du patient en terme de rejet ou de tolérance post-greffe (Neudoerfl et al., 2013).

1.3.2.4.2 L'hypersensibilité retardée (DTH)

La **DTH** est un mécanisme effecteur non spécifique induit par la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les Th, classiquement Th1, et caractérisé par un influx massif de cellules inflammatoires activées dont les monocytes et macrophages au niveau du greffon. Ce phénomène induit une amplification de la production de cytokines et chimiokines, la génération de médiateurs non spécifiques comme le monoxyde d'azote (NO), les ROS et les dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines E2, thromboxane, leukotriènes), perpétuant une réponse inflammatoire locale. Les macrophages activés maintiennent un environnement inflammatoire par sécrétion de médiateurs solubles et exercent leur activité phagocytaire et de cytotoxicité (Rowshani and Vereyken, 2012). Dans un contexte d'activation plutôt à profil

Th2, les éosinophiles recrutés relarguent des granules contenant des protéines toxiques pour les tissus (Major Basic Protein MBP, eosinophil cationic protein ECP, eosinophil peroxydase EPO). La DTH, en altérant la perméabilité, la tonicité vasculaire et l'intégrité des tissus, affecte le fonctionnement du transplant et joue un rôle dans les rejets aigu et chronique.

1.3.2.4.3 La réponse humorale et du complément

La réponse anticorps dirigée contre les antigènes du donneur est une composante majeure du rejet d'allogreffe (Colvin and Smith, 2005). Elle est induite par les LBs, dont la fonction principale est la production d'anticorps spécifiques. Toutefois, ces cellules jouent aussi un rôle de CPA via les molécules du CMH et de costimulation qu'elles expriment. Elles possèdent également des récepteurs au complément leur permettant de lier les cellules opsonisées. La contribution des LTs de type Th2 est impérative pour l'activation, la différenciation et la production d'anticorps par les LBs.

Les LBs expriment des Ig de surface (sIg) ou BCR (B cell receptor), d'isotype IgM ou IgG, spécifiques pour un antigène unique. Lors de la greffe, les antigènes du donneur sont drainés par la lymphe jusqu'aux OLS et sont alors accessibles aux LBs. Au sein des follicules, la rencontre des LBs avec leur antigène spécifique déclenche un premier signal d'activation. Les LBs captent et appréhendent l'antigène sur leur CMH-II puis migrent au niveau de l'interface follicule/zone T. L'interaction avec des LTs Th2 préalablement activés et de même spécificité antigénique, et la production de cytokines par les Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10), fournit un second signal d'activation aux LBs (Garside et al., 1998)(**Figure 7, 1**). Ces derniers migrent dans la région centrale du follicule où ils prolifèrent rapidement (**Figure 7, 2**) et, par un mécanisme de recombinaison de classe des Ig, orientent la commutation isotypique vers la production d'Ig de classe utile pour la réponse humorale IgG, IgA ou IgE, de même paratope que les sIg des LBs primordiaux. Les LBs activés peuvent alors se différencier en plasmocytes extrafolliculaires producteurs d'anticorps de courte durée de vie, en cellules B mémoires précoces de longue durée de vie, ou en centroblastes qui prolifèrent et forment une structure appelée centre germinatif (GC) (Goodnow et al., 2010). Grâce au phénomène d'hypermutations somatiques introduisant des mutations dans la partie variable des Ig, les nouveaux LBs générés (centrocytes) expriment des Ig avec une diversité et une affinité augmentées (**Figure 7, 3**). Les centrocytes recevant un signal de survie par les Th (de type Tfh) se différencient ensuite en cellules de longue durée de vie de type mémoire ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de haute affinité (**Figure 7, 4**) (Allen et al., 2007; Victora et al., 2010). Les plasmocytes dérivés des GC migrent vers la moelle osseuse et la rate et sont

responsables de la production et du maintien du taux d'anticorps circulant en périphérie. Les cellules mémoires permettront une réponse accélérée, plus efficace et plus affine, lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène (cas d'une deuxième greffe) en se différenciant rapidement en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de forte affinité.

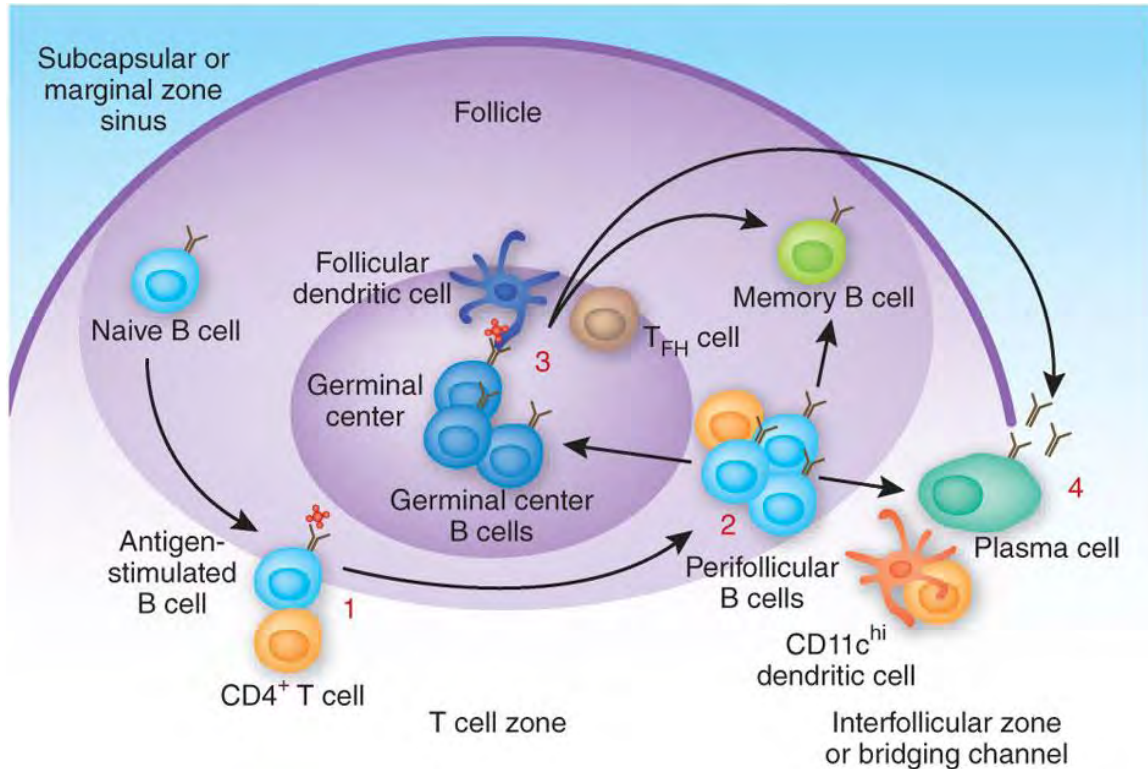


Figure 7 : L'activation et la différenciation des LBs dans les OLS.
D'après (Goodnow et al., 2010).

L'action des anticorps dépend principalement de deux mécanismes : l'activation de la cascade protéolytique du complément et le mécanisme de "cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps" (ADCC). La liaison des DSAs sur les CMHs-I et II des CEs du greffon active la voie classique du complément et aboutit à l'activation des CEs, qui expriment alors à leur surface des molécules d'adhérences et relarguent des facteurs procoagulants (tel que le facteur von Willebrand (vWF)). La formation du complexe d'attaque membranaire détruisant les cellules endothéliales expose le sous-endothélium auquel vont se fixer les plaquettes. Ceci aboutit à la thrombose des artères et à la nécrose hémorragique du greffon. Certains fragments solubles du complément, les anaphylatoxines C3a, C4a et C5a, ont une action directe sur la perméabilisation cellulaire, la chimiotaxie et le recrutement des leucocytes inflammatoires dans le greffon ; d'autres produits (C3b, C4b) se fixent aux cellules cibles et aux DSA, un processus appelé opsonisation, favorisant ainsi la destruction du greffon par les cellules

phagocytaires et la présentation antigénique puis l'activation T par les LBs portant les récepteurs au complément.

Le fragment Fc des DSAs peut également être reconnu par les NKs et les macrophages exprimant les récepteurs aux fragments Fc, ce qui engendre une lyse des cellules cibles via la voie granzyme/perforine par les NKs et la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que NO, ROS et TNF- α par les macrophages.

1.3.2.5 Les phases cliniques du rejet de greffe

D'un point de vue clinique, on distingue plusieurs phases de rejet qui sont fonction de la rapidité de sa manifestation, des lésions histologiques induites et des mécanismes immunologiques responsables de son déclenchement.

1.3.2.5.1 Le rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu apparaît dans les quelques minutes ou quelques heures suivant l'introduction du greffon dans l'organisme et concerne uniquement les organes vascularisés. Il est dû à la présence chez le receveur d'anticorps préformés naturels dirigés contre les molécules A et B des groupes sanguins, ou acquis dirigés contre les molécules du CMH (HLA) du donneur (Williams et al., 1968). Ces DSAs se sont formés après une première transplantation, une transfusion sanguine ou une immunisation foeto-maternelle lors d'une grossesse non menée à terme. Comme décrit précédemment, les DSAs, en se fixant aux CEs du greffon, activent la cascade du complément, ce qui induit la libération de médiateurs proinflammatoires et le recrutement de neutrophiles et monocytes libérant des enzymes lytiques. De plus, la sécrétion, entre autres, du vWF pro-coagulant par les CEs activées provoque l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. Cette série de réactions va alors engendrer une thrombose intravasculaire aboutissant à la formation de lésions et à la perte du greffon. La réalisation systématique de tests de « cross-match », vérifiant la présence de DSAs, et la recherche de compatibilité HLA entre donneur et receveur, ont permis de maîtriser ce type de rejet, devenu rarissime. Les patients hyperimmunisés, ayant des titres élevés de DSAs, peuvent bénéficier de traitements de désensibilisation (Salvadori and Bertoni, 2012) mais leur accès à la greffe reste à ce jour difficile.

1.3.2.5.2 Le rejet aigu

Le rejet aigu survient dans la première semaine ou les premiers mois suivant l'allogreffe. Le diagnostic est réalisé par biopsie de l'organe greffé. Les lésions observées sont classées selon la classification internationale de Banff, régulièrement revisitée (Solez and Racusen, 2013). Grâce aux traitements immunosuppresseurs, il survient dans moins de 15% des transplantations chez le patient non immunisé. On distingue les rejets aigus à médiation cellulaire, dépendant des LTs CD4⁺ de type Th1 et des CTLs, et à médiation humorale, dépendant des LBs, qui peuvent survenir seuls ou ensemble.

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 LTs et de macrophages auxquels peuvent s'associer, dans certains rejets de grade élevé, des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Ce type de rejet est très largement prévenu par la prise d'immunosuppresseurs et peut être traité par une augmentation des doses administrées.

Le **rejet aigu à médiation humorale**, quant à lui, associe, dans la plupart des cas, la présence de DSAs cytotoxiques et de 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. Les DSAs *de novo* sont le plus souvent dirigés contre des molécules du CMH-I ou moins fréquemment de classe II (30% des rejets à composante humorale), et de façon plus rare contre les antigènes érythrocytaires du système ABO, les antigènes mineurs ou spécifiques du tissu. L'activation de la cascade du complément par liaison des DSAs endommage l'endothélium, qui entre dans un état proinflammatoire et procoagulant, marqué par l'expression de chimioattractants (IL-1 β , IL-8, CCL5), de molécules d'adhésion (vascular cell adhesion molecule VCAM, ICAM, E-Selectin), du vWF, du facteur tissulaire (TF) et d'inhibiteurs du plasminogène. Les NKs, macrophages et polynucléaires recrutés induisent la lyse des CEs par ADCC (**Figure 8**). Ces mécanismes entraînent des lésions hémorragiques, des microthromboses, un infiltrat leucocytaire péri-vasculaire (non interstitiel) important, conduisant à terme à l'ischémie et à la nécrose du greffon.

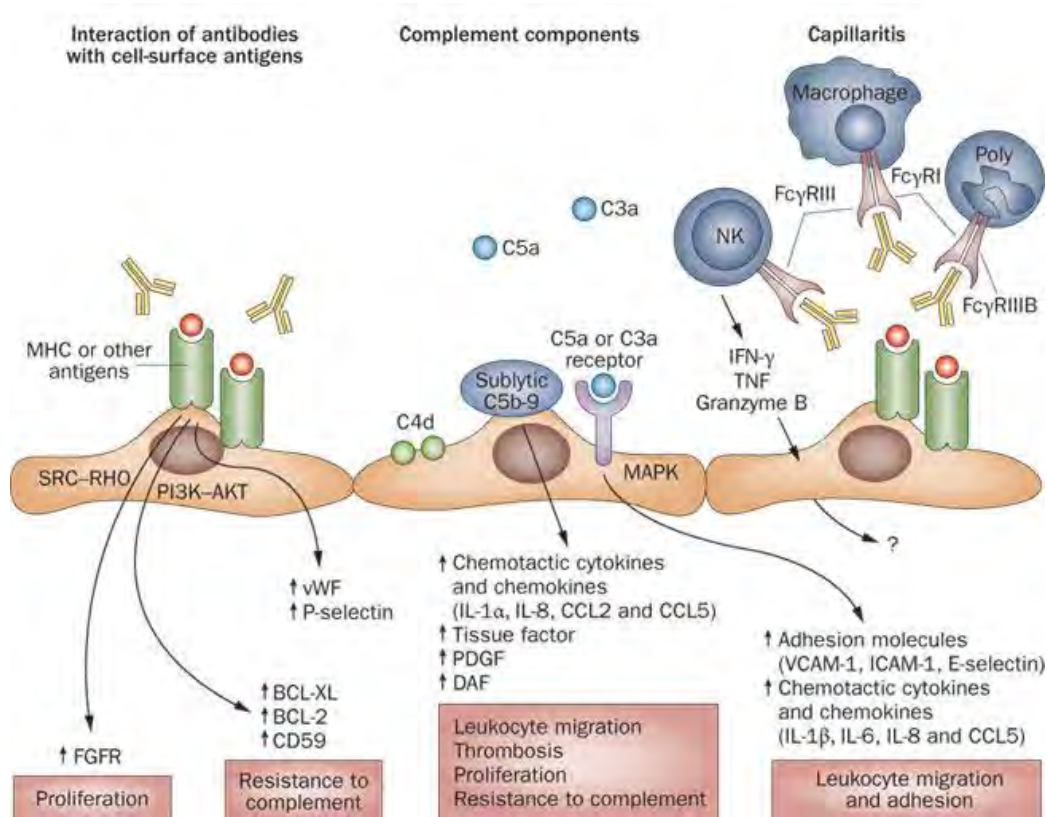


Figure 8 : Mécanismes du rejet aigu à médiation humorale.
D'après (Farkash and Colvin, 2012)

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 C4d, devenu le marqueur histologique majeur dans les capillaires péri-tubulaires, en association avec la présence de DSAs circulants (Solez et al., 2008). Cependant, certaines biopsies rénales présentant des signes de rejet humoral n'ont pas ou très peu de dépôts de C4d (Haririan et al., 2009; Takeda et al., 2012), montrant que l'absence de dépôt ne peut exclure l'implication des DSAs dans le rejet. D'autres outils de diagnostic ont été proposés par l'équipe d'Halloran : la modification de l'expression des gènes liés notamment à la dysfonction et l'activation des CEs (ENDATs: endothelial associated transcripts) et la présence de signes inflammatoires de la microcirculation tels que la glomérulite et la capillarite péri-tubulaire dans les biopsies rénales (Sis et al., 2009, 2012).

1.3.2.5.3 Le rejet chronique

Le rejet chronique se développe des mois voire des années après la greffe. Il se manifeste par un épaissement fibreux de l'intima des artères, lié à une accumulation de matrice extracellulaire et à la prolifération de cellules myofibroblastiques, et/ou une fibrose interstitielle. S'ensuivent une occlusion lente et progressive des vaisseaux, une ischémie puis une nécrose et fibrose du greffon. La compréhension des mécanismes impliqués dans la survenue du rejet chronique a progressé mais reste incomplète. Différents facteurs, à la fois d'origine immunologique et non-immunologique, contribuent au développement des dysfonctions chroniques du greffon (Pascual et al., 2012). Ainsi, l'âge du donneur, l'hypertension artérielle, les infections, l'ischémie reperfusion et la toxicité des immunosuppresseurs sont autant de facteurs non immuns associés à la survenue du rejet chronique (Pratschke et al., 2008). Le rejet chronique peut être à médiation cellulaire T, caractérisé par une fibrose de l'intima des artères associée à un infiltrat de la néo-intima par des LTs, essentiellement CD4⁺, et des macrophages activés (Solez et al., 2007). D'autre part, l'implication des DSAs dans le rejet chronique a été suggérée par plusieurs groupes mettant en évidence une corrélation négative entre leur apparition et la survie à long terme de l'organe greffé (Piazza et al., 2001; Sis et al., 2007). La fixation des DSAs sur les molécules HLA des CEs entraîne l'activation de la cascade du complément ou la transduction directe de signaux intracellulaires proinflammatoires et de prolifération (Li et al., 2009a), aboutissant au développement d'une néo-intima épaisse : l'artériosclérose du greffon caractéristique des greffons rejetés de façon chronique. Ce rejet chronique à médiation humorale est la cause majeure de perte de l'allogreffe. La compréhension fine de ses mécanismes et sa détection précoce permettront le développement de nouvelles approches thérapeutiques et/ou préventives en transplantation d'organes.

2 La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR

Comme décrit précédemment, les LTs du receveur, via leur TCR, reconnaissent les alloantigènes présentés par les molécules du CMH-I et CMH-II à la surface des CPAs du donneur (reconnaissance directe) ou du receveur (reconnaissance indirecte ou semi-directe), ce qui déclenche la réponse immunitaire adaptative spécifique. D'un point de vue génétique, structural et biologique, la compréhension de cette interaction reste très complexe. D'une part, les complexes CMHp des CPAs s'associent et adoptent des structures variées selon le type de CMH, la nature et la longueur du peptide présenté. D'autre part, les TCRs des LTs sont recombinés aléatoirement lors du développement thymique, afin de créer une diversité maximale du répertoire en périphérie. L'interaction moléculaire entre les deux parties intervient selon des « règles » générales de restriction et de liaison, qui sont toutefois modulées par la cross-réactivité inhérente aux TCRs et la flexibilité conformationnelle de l'interaction. La nature et les caractéristiques de l'interaction sélectionnent un répertoire T spécifique particulier et induisent un biais de la réponse immune, pouvant influencer la qualité de la réponse enclenchée. Les propriétés de cette interaction TCR/CMHp seront détaillées dans cette deuxième partie.

2.1 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

2.1.1 Architecture du complexe CMHp

La molécule du CMH est un hétérodimère formé d'une chaîne lourde α et d'une chaîne légère non polymorphique, la β 2-microglobuline (β 2m) pour la molécule du CMH-I et de chaînes polypeptidiques α et β pour la molécule du CMH-II (**Figure 9**). La chaîne α du CMH-I est constituée de trois domaines extracellulaires α_1 , α_2 et α_3 , d'une région transmembranaire et d'une région intracytoplasmique. Les domaines α_1 et α_2 , à la suite du repliement tridimensionnel, dessinent une cavité qui forme le site de fixation du peptide antigénique. Le sillon peptidique du CMH-II est formé quant à lui par l'assemblage des deux chaînes lourdes α_1 et β_1 . L'architecture globale est identique pour les deux molécules : huit feuillets β antiparallèles forment le plancher du sillon peptidique et les parois sont formées par deux longues hélices α arrangées symétriquement (Rudolph et al., 2006). Chez l'Homme,

les molécules du CMH sont encodées au sein du locus HLA, localisé sur le chromosome 6, qui est la région la plus polymorphique de tout le génome. Bien que chaque individu n'exprime pas plus de six allèles de chaque classe, on dénombre plus de 7000 allèles de CMH-I et 2000 allèles de CMH-II dans la population humaine (Robinson et al., 2013). Les résidus polymorphes sont situés sur le pourtour et à l'intérieur de la poche peptidique et contribuent à la diversité des peptides présentés aux LTs (**Figure 9**). Les molécules du CMH-I accommodent généralement des peptides longs de 8 à 11 acides aminés (AAs), dont les résidus N- et C-terminaux (N-term et C-term) sont ancrés dans les repliements profonds A et F du sillon du CMH, qui diffèrent d'un allèle à l'autre (Madden et al., 1993). Ce mode de fixation du peptide expose les chaînes latérales des AAs centraux, qui sont accessibles pour l'interaction directe avec le TCR. Des peptides plus longs peuvent s'arrimer soit par extension C-term en dehors du sillon (Collins et al., 1994), soit par formation d'un bombement hors de la poche qui augmente la surface de contact pour le TCR (Speir et al., 2001; Tynan et al., 2005a). Les molécules du CMH-I de rat RT1.A^a accommodent des peptides particulièrement longs (9 à 15 AAs) (Stevens et al., 1998a), comme démontré par Speir et ses collègues avec la cristallisation d'un complexe RT1.A^a/AgmH, où l'épitope MTF-E est formé par 13 résidus (Speir et al., 2001). Le sillon des molécules du CMH-II est quant à lui ouvert de chaque côté et accommode des peptides plus longs (12 à 25 AAs). Seuls 9 AAs de ces peptides sont logés dans le sillon, les autres dépassant des extrémités.

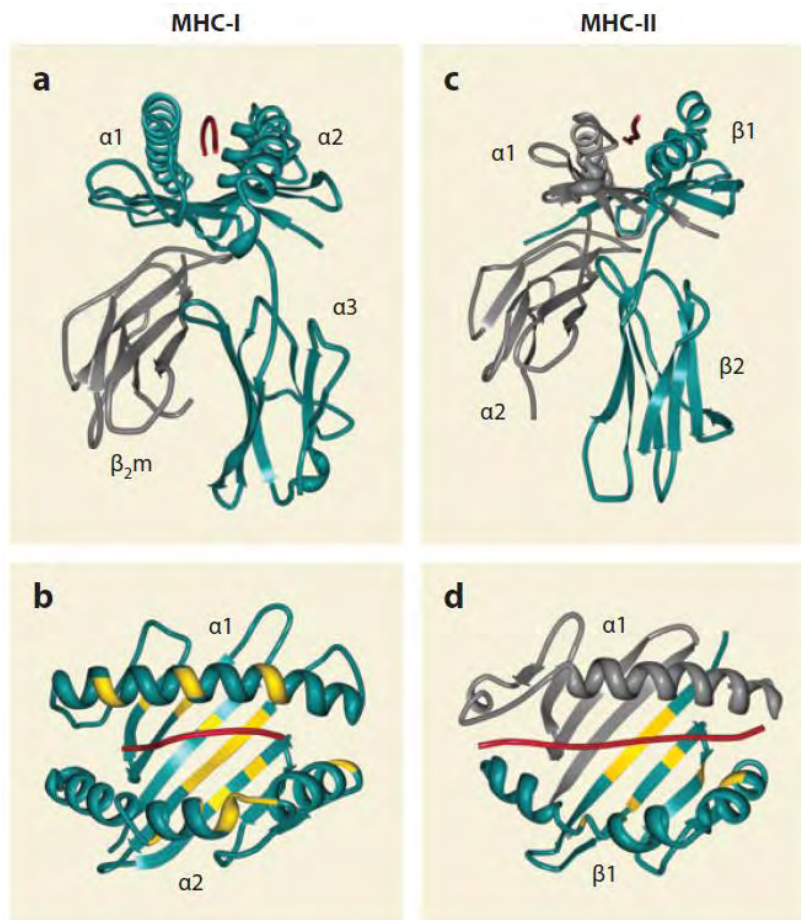


Figure 9 : Architecture tridimensionnelle des molécules du CMH avec leurs ligands peptidiques.

D'après (Blum et al., 2013). (a,b) Structure d'un complexe CMH-Ip : HLA-A2/peptide de l'influenza matrix protéine. (c,d) Structure d'un complexe CMH-IIp : HLA-DR1/peptide de l'influenza hémagglutinine. Les panels a et c représentent l'organisation des domaines des molécules du CMH-I et CMH-II. Les panels b et d offrent la vue du sillon dans la perspective du TCR. Pour le CMH-I, les hélices α_1 et α_2 referment les extrémités de la poche, fixant les résidus N-term et C-term du peptide. Pour le CMH-II, les hélices sont plus courtes et moins courbées permettant au peptide de déborder de la poche. Les résidus hautement polymorphiques sont colorés en jaune.

2.1.2 Apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH

L'apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH par les CPAs s'effectue selon différentes voies et nécessite la protéolyse de protéines en peptides dans le cytosol (**Figure 10**). De façon générale, les molécules du CMH-I lient des peptides générés par la dégradation de protéines cytosoliques endogènes, provenant de composants de la cellule elle-même ou de virus intracellulaires. Les protéines sont d'abord ubiquitinylées puis dégradées en peptides par le protéasome (Maupin-Furlow, 2012). Les peptides courts générés sont alors transloqués du cytosol vers le réticulum endoplasmique (RE) via le transporteur TAP (Transporter Associated with Antigen Processing) pour s'associer avec les molécules du CMH-I (Schölz and Tampé, 2009). TAP peut transloquer dans le RE des peptides plus longs que la taille

habituelle de 8 à 11 AAs pour le chargement sur un CMH-I (Koopmann et al., 1996). Ces peptides sont alors raccourcis par des aminopeptidases (ERAAP, ERAP1) contenues dans le RE. L'assemblage, la stabilisation et la liaison des CMHs-I avec les peptides de forte affinité dans le RE impliquent des protéines chaperonnes telles que la calnexine, la calréticuline et la tapasine (Sadasivan et al., 1996). Une fois le complexe CMH-I_p formé et stabilisé, il est transporté à la membrane plasmique via le Golgi à l'aide de vésicules.

Pour l'apprêtement sur les molécules du CMH-II, les peptides sont classiquement générés par la protéolyse lysosomale de protéines exogènes (virales, bactériennes, du donneur d'organe), internalisées via les voies d'endocytose et de phagocytose. Les protéines endocytées entrent dans des compartiments vésiculaires d'acidité et d'activité protéolytique croissantes, classiquement nommés endosomes précoces, endosomes tardifs et lysosomes (Huotari and Helenius, 2011). Les particules internalisées par phagocytose suivent la même voie, aboutissant à la formation de phagolysosomes. Les lysosomes et phagolysosomes ont un pH acide de 4 à 4.5 et contiennent des protéases appelées cathepsines (Watts, 2004) qui dégradent les protéines en peptides. Les sous-unités α et β des molécules du CMH-II s'assemblent dans le RE et s'associent avec la chaîne invariante CD74 (chaîne I). Ce complexe transite alors vers les endosomes matures acides au sein desquels la chaîne I est dégradée en un résidu peptidique CLIP (Class II-associated Invariant Chain Peptide), qui s'insère au niveau du site de liaison au peptide et empêche la liaison des peptides antigéniques (Riberdy et al., 1992). Finalement, le peptide CLIP se dissocie du CMH-II et est remplacé par les peptides antigéniques issus de la dégradation protéique. Enfin, les complexes CMH-II_p nouvellement formés sont exportés à la membrane.

En plus des voies classiques d'apprêtement, les deux molécules du CMH peuvent se complexer avec des peptides dérivés d'antigènes exogènes et endogènes. Ainsi, les CMHs-II peuvent présenter des peptides dérivés de protéines cytosoliques et nucléaires endogènes, qui rejoignent le réseau lysosomal par le phénomène de macroautophagie. De même, des peptides dérivés de protéines exogènes internalisées par endocytose et phagocytose peuvent être apprêtés par les molécules du CMH-I, selon un processus appelé présentation croisée ou « cross-présentation » (Joffre et al., 2012). Certains types de DCs sont spécialisés dans la cross-présentation et activent par ce biais les LTs CD8⁺ naïfs.

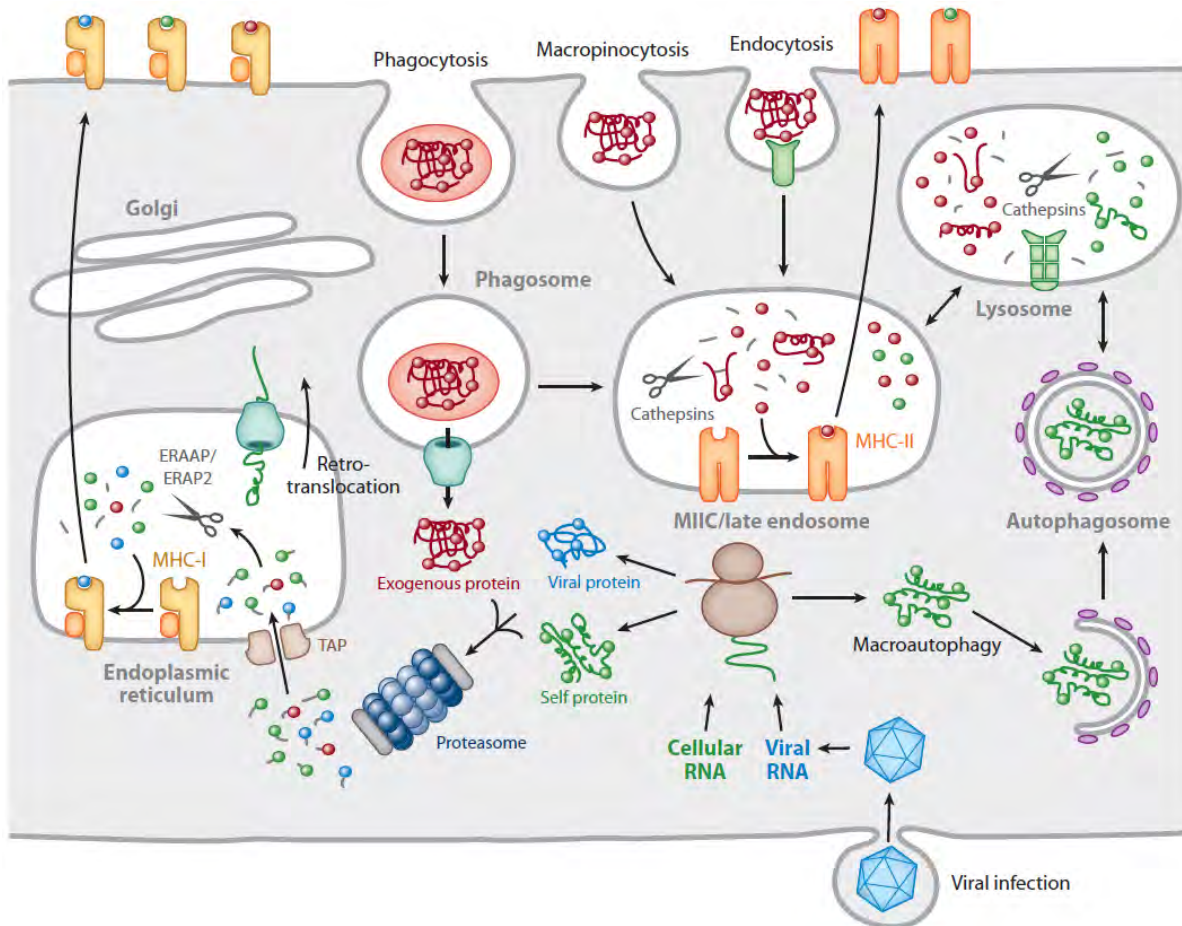


Figure 10 : Apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH : voies classiques et exceptions.
D'après (Blum et al., 2013).

2.2 Le récepteur à l'antigène des LTs $\alpha\beta$

2.2.1 Le complexe TCR

Le TCR, responsable de la spécificité conjointe pour un antigène étranger et pour la molécule du CMH, s'associe avec le complexe CD3 et les corécepteurs CD8 ou CD4 pour la transduction des signaux aux LTs.

2.2.1.1 Structure du TCR

Le TCR est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques glycosylées (α et β ou γ et δ) liées par un pont disulfure (Davis and Bjorkman, 1988). Ces chaînes sont composées de domaines de type Ig constants et variables, suivis d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'une courte queue intracytoplasmique. Les domaines variables de chaque chaîne du TCR sont situés à l'extrémité N-term et contiennent trois domaines hypervariables nommés CDRs (complementary determining region). L'association

de la partie variable des deux chaînes du TCR forme le site de reconnaissance du complexe CMHp. Le TCR $\alpha\beta$ permet la reconnaissance spécifique de l'antigène mais ne possède qu'un court domaine intracytoplasmique dépourvu de toute activité enzymatique intrinsèque. La transduction du signal après interaction est donc assurée par le complexe multimérique CD3.

2.2.1.2 Association du complexe TCR-CD3

Le CD3 est un complexe protéique composé de quatre chaînes polypeptidiques invariantes distinctes : une chaîne CD3 γ , une chaîne CD3 δ et deux chaînes CD3 ϵ , qui s'associent à la fois avec le TCR et avec un homodimère de chaîne CD3 ζ pour former le complexe TCR-CD3 (Kuhns and Badgandi, 2012). Ces chaînes font partie de la superfamille des Igs. Elles sont constituées d'un domaine cytoplasmique extracellulaire de type Ig, suivi d'un domaine transmembranaire chargé négativement permettant l'association avec le TCR chargé positivement, et enfin d'un long domaine intracellulaire carboxyterminal. Les extrémités intracellulaires contiennent des séquences renfermant des motifs activateurs intracellulaires de type ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Après phosphorylation, ces ITAMs servent de point d'ancrage pour des protéines importantes de la signalisation (ZAP70) et exercent un rôle clé dans la transduction du signal initié par la reconnaissance TCR/CMHp (Guy and Vignali, 2009).

2.2.1.3 Association avec les corécepteurs CD4 et CD8

Les molécules accessoires membranaires CD4 et CD8 exprimées par les LT $\alpha\beta$ matures jouent un rôle important dans la reconnaissance du complexe CMHp, sa stabilisation et la transduction du signal (Mariuzza, 2013). Elles augmentent d'un facteur 100 la sensibilité du TCR pour le complexe CMHp. Le corécepteur CD8 est composé de deux chaînes, α et β ou α et α , liées par un pont disulfure et contenant chacune un domaine de type Ig. Le CD8 interagit avec les domaines α_2 ou α_3 du CMH-I (Sun et al., 1995). Le CD4 est une molécule monomérique formée de quatre domaines extracellulaires de type Ig et lie les domaines α_2 ou β_2 des CMHs-II (König et al., 1995). La tyrosine kinase LCK s'associe aux domaines intracellulaires des deux corécepteurs et phosphoryle les ITAMs du complexe CD3, ce qui enclenche la signalisation des LTs conduisant à leur activation, prolifération et différenciation. Des expériences utilisant des tétramères de complexes CMHp ont montré que les interactions CD8/CMH-I ou CD4/CMH-II peuvent influencer ou non la fixation du TCR au tétramère (Crawford et al., 1998; Daniels and Jameson, 2000; Hamad et al., 1998). Ainsi,

l'utilisation d'anticorps anti-CD8 et anti-CD4 peut affecter le marquage par les tétramères (Wooldridge et al., 2003, 2006).

2.2.2 Constitution de la diversité du répertoire TCR

Afin de se prémunir au mieux face à l'immense diversité des agents pathogènes, l'organisme génère aléatoirement la spécificité des TCRs pour les peptides antigéniques. Ainsi, la taille et la diversité du répertoire des LTs naïfs sortant du thymus sont maximisées. Les chaînes α et β du TCR sont formées lors du développement intrathymique des cellules T selon un processus séquentiel précis, et très similaire à celui utilisé pour les réarrangements des chaînes lourdes et légères des Igs au cours de la lymphopoïèse B. Depuis la cellule pro-T jusqu'à la cellule T CD4⁺ ou CD8⁺ rejoignant la périphérie, les événements de recombinaison somatique permettent d'établir un répertoire T varié capable de reconnaître un grand nombre d'antigènes différents.

Le domaine variable (V) de la chaîne β est formé par l'assemblage de segments géniques dits variable (V), de diversité (D) et jonctionnel (J), alors que le domaine V de la chaîne α est codé par les éléments V et J uniquement (**Figure 11**). Chez l'Homme, le locus TCR β est situé sur le chromosome 14 et compte 42 segments V β , 2 D β et 12 J β tandis que le locus TCR α se trouve sur le chromosome 7 et compte 43 segments V α et 58 J α (Lefranc et al., 1999). Chez la souris, le locus TCR contient 35 segments géniques fonctionnels V β , 2 D β , 12 J β , 71 V α et 51 J α . Enfin chez le rat, on dénombre 20 segments V β , 2 D β , 12 J β et au moins 33 V α et 23 J α (Shirwan et al., 1995). Les segments géniques V(D)J se recombinent et sont épissés avec la région constante (C) pour former un TCR fonctionnel $\alpha\beta$, chaque LT exprimant uniquement un type de TCR. Cet assemblage au hasard des segments géniques puis des chaînes α et β constitue une première source de diversité du répertoire T, appelée **diversité combinatoire**. Au sein de chaque domaine V, trois régions hypervariables ou CDRs ont été identifiées. Les CDR1 et CDR2 sont codés somatiquement par les segments V, tandis que la jonction CDR3 est créée par la juxtaposition des segments V(D)J (Pannetier et al., 1993), associée à d'importantes modifications des extrémités codantes des segments réarrangés (**Figure 11**). La réaction de recombinaison est menée par un complexe enzymatique, incluant les protéines recombinases RAG (recombination activating gene). L'ADN est clivé au niveau de sites spécifiques flanquant les segments V, D et J : les séquences signal de recombinaison (SSR) (Tonegawa, 1993). La cassure et la phase de réparation de l'ADN sont des processus relativement imprécis et génèrent soit des extrémités

codantes complètes, soit des délétions à la fin de la partie codante, soit encore l'addition de nucléotides palindromiques dérivés du brin non codant. Les extrémités codantes peuvent également subir un processus exonucléasique qui entraîne une réduction importante des segments V(D)J. De plus, un nombre variable de nucléotides non germinaux (N) peut être ajouté aléatoirement par la polymérase TdT (terminal deoxynucleotidyl transférase) aux extrémités codantes (Cabaniols et al., 2001) (**Figure 11**). L'ensemble de ces événements génère une **diversité jonctionnelle** énorme au niveau des CDR3s, impliquant une vaste hétérogénéité de longueur et de séquence de ces domaines. Les réarrangements des gènes du TCR préservent ainsi l'information germinale encodée dans les régions V interagissant avec les molécules du CMH (Scott-Browne et al., 2009), tout en maximisant la diversité de la jonction CDR3 qui contacte les antigènes présentés. Enfin, il existe une **diversité interindividuelle** des TCRs due aux polymorphismes des gènes, avec de nombreuses variations alléliques pour les segments V α et V β (Robinson, 1989; Wright et al., 1991).

L'estimation mathématique théorique de la diversité potentielle des TCRs est d'environ 10^{12} à 10^{15} TCRs différents chez un même individu. Toutefois, les événements de sélection thymique diminuent la taille du répertoire périphérique naïf TCR $\alpha\beta$ chez un individu, à approximativement $2 \cdot 10^6$ TCRs chez la souris (Casrouge et al., 2000) et $2 \cdot 10^7$ TCRs chez l'Homme (Arstila et al., 1999).

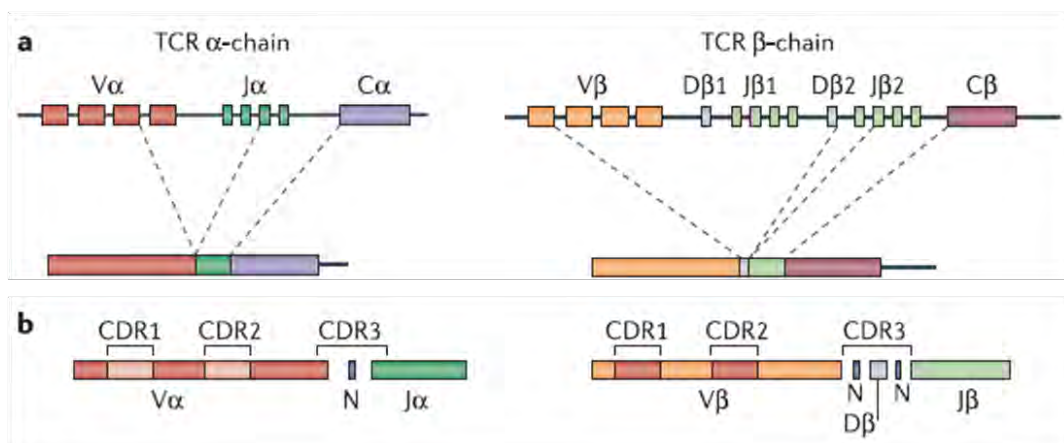


Figure 11 : Génération de la diversité du TCR par recombinaison somatique.

D'après (Turner et al., 2006). a) Exemple de réarrangement des loci α et β du TCR. b) Localisation des CDRs sur le domaine V du TCR.

Ce réarrangement des chaînes du TCR s'opère dans un ordre bien défini lorsque les cellules progénitrices arrivent dans le thymus. Tout d'abord, les précurseurs précoces doubles négatifs (DN, TCR $^-$, CD3 $^-$, CD4 $^-$, CD8 $^-$) pénètrent dans la région sous-capsulaire, réarrangent et expriment la chaîne β du TCR qui s'associe de manière covalente à une chaîne nommée

pré-T α et à la molécule CD3 pour former le pré-TCR (Saint-Ruf et al., 1994). Lorsqu'une chaîne β fonctionnelle est produite, le phénomène d'exclusion allélique permet la répression du réarrangement de l'autre allèle (Brady et al., 2010). Le pré-TCR transmet alors un signal aux thymocytes immatures induisant l'expression des corécepteurs CD8 et CD4 et le réarrangement de la chaîne α . Lorsqu'une chaîne α fonctionnelle est réarrangée et exprimée conjointement à la chaîne β , les cellules ont alors un TCR fonctionnel et spécifique, sur la base duquel vont s'effectuer les processus de sélections thymiques positive et négative, ainsi que le choix du lignage CD4 ou CD8 par le thymocyte en maturation (cf § 3.1 La tolérance centrale). Dans la majorité des cas, un seul TCR est exprimé par cellule. Cependant, le phénomène d'exclusion allélique n'est pas total pour la chaîne α et il arrive que deux chaînes α soient exprimées à la surface d'une cellule T donnée. Ainsi, 3 à 10% des LTs expriment deux TCR $\alpha\beta$ à leur surface (Corthay et al., 2001; Heath et al., 1995), constituant dès lors un facteur d'autoimmunité (Sarukhan et al., 1998).

2.3 Aspects structuraux de l'interaction TCR/CMHp

2.3.1 Structure du TCR $\alpha\beta$ en complexe avec son ligand

Grâce aux co-structures cristallographiques TCR/CMHp toujours plus nombreuses, notre compréhension des interactions spécifiques TCR-CMHp s'améliore et révèle un mode conservé d'interaction. D'une part, le complexe TCR/CMHp est constitué d'une seule molécule de TCR interagissant avec une seule molécule du CMH et un seul peptide. D'autre part, le TCR interagit avec le complexe CMHp via la juxtaposition de ses CDRs. Enfin, l'orientation de la molécule du TCR par rapport au complexe CMHp est partiellement conservée, avec des zones privilégiées d'interaction entre ces deux molécules (**Figure 12**). Généralement, le TCR est orienté en diagonale par rapport au sillon peptidique (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996). Le domaine V α du TCR est fréquemment positionné sur l'hélice α_2 ou β_1 et la partie N-term du peptide, alors que le domaine V β est plus souvent positionné sur l'hélice α_1 du CMH et la partie C-term du peptide. De façon simpliste, ce positionnement du TCR permet aux domaines CDR3 des chaînes α et β du TCR d'interagir principalement avec le peptide. Les domaines CDR1 et CDR2 interagissent quant à eux préférentiellement avec les hélices α formant les bords de la poche peptidique, exceptionnellement avec le peptide (Cole et al., 2009), et contrôleraient le biais de la

restriction au CMH (Christopher Garcia et al., 2009; Marrack et al., 2008)(**Figure 12**). En réalité, le rôle des boucles CDRs et leur contribution à l'énergie de l'interaction (Borg et al., 2005) varient selon les complexes CMHp.

Les études structurales des TCRs dans leur conformation libre ou liée au ligand CMHp montrent un large degré de plasticité des régions CDR, indiquant l'adaptation possible du TCR à des ligands structurellement divers (Housset and Malissen, 2003; Reiser et al., 2002). De plus, Tynan a montré qu'un peptide faisant saillie peut montrer une certaine flexibilité dans le sillon peptidique lors de l'interaction avec la face rigide du TCR, fournissant la plasticité principale de cette interaction (Tynan et al., 2007). Par ailleurs, Liu et al. ont comparé le mode d'arrimage de trois TCRs humains distincts sur un complexe CMH-Ip, présentant un peptide viral dit « super-bulged » ou dépassant du sillon (Liu et al., 2013b). Ils ont mis en évidence des stratégies d'arrimage imprévisibles et atypiques pour la reconnaissance de ce peptide spécifique de 13 AAs, démontrant la capacité du répertoire T humain à s'accomoder de déterminants longs.

En dépit des nombreuses études structurales réalisées, aucun point de contact fixe ne semble exister entre les zones conservées des hélices α du CMH et les résidus conservés du TCR. Plusieurs groupes ont tenté de définir la base structurale de la restriction par le CMH et le biais germinale du TCR (Christopher Garcia et al., 2009). Deux études concernant des TCRs murins utilisant une chaîne V β 8.2 conservée et liant une molécule du CMH unique ont montré l'existence de « codons d'interaction », qui sont des interactions moléculaires spécifiques conservées réalisées par le V β du TCR (Dai et al., 2008; Feng et al., 2007). Dans une autre étude, Tynan et collègues ont déterminé la structure d'un peptide long de 13 AAs présenté par la molécule HLA-B*3508 (Tynan et al., 2005b). Comme le peptide déborde largement du sillon, l'interaction du TCR avec le CMH est minime et ces contacts limités représenteraient ceux essentiels pour la reconnaissance des CMHs par le TCR. Trois résidus du CMH, formant une triade de restriction, sont en effet contactés dans toutes les structures déterminées à ce jour et conforteraient la théorie de coévolution des gènes variables du TCR et du CMH. A ce jour, il apparait clairement que les interactions TCR/CMHp ne sont pas conservées de façon rigide mais présentent une flexibilité considérable, dans la limite de règles générales d'orientation et de fixation.

Par ailleurs, les co-structures résolues à ce jour impliquent des TCRs de LTs effecteurs. Les modes de reconnaissance utilisés par les Tregs restent à élucider. Seul le complexe Qa1/Qdm, reconnu par le TCR des Tregs CD8 $\alpha\alpha^+$ et le ligand CD94/NKG2D a été

récemment cristallisé (Zeng et al., 2012). Il est structurellement homologue au complexe équivalent HLA-E humain et favorable à la présentation de groupes conservés de peptides pour la reconnaissance par des récepteurs invariants qui régulent les réponses immunes innées.

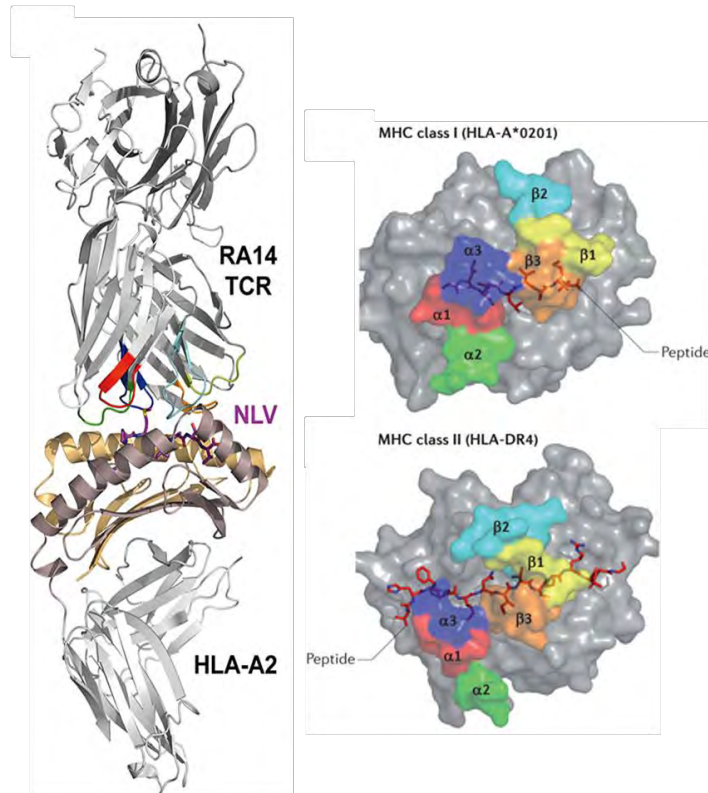


Figure 12 : Structure générale d'un complexe TCR/CMHp de classe I (à gauche) et empreinte du TCR sur la surface moléculaire de complexe CMHp de classe I et II (à droite).

D'après (Gras et al., 2011; Sewell, 2012). Dans le panel de droite, la molécule du CMH est représentée en gris et le peptide en bâtonnets rouges. L'arrimage en mode diagonal du TCR sur le complexe CMHp est conservé. Les couleurs indiquent l'empreinte des six boucles CDR du TCR sur le CMHp.

2.3.2 Spécificité de l'interaction TCR/CMHp allogénique

Durant le développement, les LTs subissent la sélection thymique et sont éduqués pour interagir spécifiquement avec les molécules du CMH du soi. Le répertoire T mature sélectionné est tolérant aux complexes CMH du soi/peptide du soi et capable d'organiser une réponse immunitaire conventionnelle contre des peptides étrangers dans le contexte du CMH du soi. Ceci définit le concept de restriction de la reconnaissance antigénique par le CMH. Cependant, cette règle est mise à mal lors des maladies auto-immunes (rupture de la tolérance au soi) et par le phénomène d'alloréactivité qui survient lors de transplantation d'organes. L'alloréactivité désigne la capacité des LTs du receveur à reconnaître des molécules du CMH allogéniques, le peptide présenté étant généralement un ligand cellulaire endogène

(D'Orsogna et al., 2013), qui n'ont pas été rencontrées lors du développement thymique, et se manifeste cliniquement par le rejet du transplant et la GvHD. L'alloréactivité est une conséquence directe de la cross-réactivité inhérente des TCRs, à savoir qu'un TCR unique peut reconnaître plusieurs peptides différents qui n'ont pas nécessairement une forte homologie (Reiser et al., 2003). Initialement, la théorie de sélection clonale postulait que le système immunitaire était capable de générer un TCR unique pour chaque peptide antigénique. Cependant, des estimations du répertoire peptidique ont montré qu'il existe beaucoup plus de peptides immunogéniques potentiels dans l'environnement que de LTs chez un individu à un instant donné (Mason, 1998; Sewell, 2012). Le concept de la cross-réactivité du TCR a donc été évoqué comme un moyen d'augmenter la taille du répertoire TCR. Cette hypothèse de Mason a été validée par plusieurs études utilisant des bibliothèques de peptides synthétiques, montrant qu'un TCR unique peut reconnaître plus d'un million de peptides individuels différents dans le contexte d'une molécule du CMH unique (Hiemstra et al., 1999; Wooldridge et al., 2012). De plus, d'après une étude très récente, cette exceptionnelle cross-réactivité des TCRs serait limitée à des peptides de même longueur, révélant une limite claire de la plasticité des TCRs (Ekeruche-Makinde et al., 2013).

Le phénomène de cross-réactivité, bien que permettant la protection de l'organisme contre la très vaste étendue d'agents infectieux, se révèle néfaste dans le cadre de la transplantation, où la réponse alloimmunitaire est très forte. La fréquence des LTs alloréactifs est estimée jusqu'à 10% du pool T, approximativement 100 à 1000 fois supérieure à la fréquence des LTs spécifiques de complexes classiques CMH du soi/peptide étranger (Lindahl and Wilson, 1977; Suchin et al., 2001). La raison de ce nombre élevé de cellules alloréactives a été longuement débattue. Historiquement, deux théories principales ont été proposées : la densité des déterminants antigéniques, centrée sur le CMH, et la fréquence des déterminants antigéniques, centrée sur le peptide. Le premier modèle propose que les cellules T alloréactives reconnaissent, indépendamment du peptide, des résidus polymorphes présents sur les hélices α des CMH allogéniques. La densité de l'antigène reconnu sur les CPAs est dès lors très importante et donne lieu à une interaction de très forte avidité, susceptible de compenser la faible affinité du TCR pour le CMH allogénique (Bevan, 1984). Le deuxième modèle propose que les LTs alloréactifs reconnaissent une multitude de complexes CMH_p, de façon spécifique du peptide, et exploitent les similarités plutôt que les différences structurales entre les CMHs du soi et étranger (mimétisme). Les LTs alloréactifs sont ainsi nombreux car chaque molécule du CMH allogénique présente une quantité très importante de déterminants « étrangers », qui sont des peptides endogènes nouveaux (entre 2000 et 10 000 peptides

estimés par cellule), différents du répertoire peptidique restreint au CMH du soi rencontré au cours de la sélection négative (Matzinger and Bevan, 1977). Ce second modèle est soutenu par les données structurales disponibles, montrant que les TCR alloréactifs contactent toujours à la fois le peptide et les hélices α du CMH, de façon similaire à la reconnaissance conventionnelle de peptides étrangers (Reiser et al., 2000)(voir paragraphe précédent). De plus, de nombreuses études ont clairement démontré l'existence de LTs alloréactifs fortement spécifiques de peptides (Felix et al., 2007; Mendiratta et al., 1999; Udaka et al., 1992). Depuis plus de 15 ans, les chercheurs tentent de comprendre et d'expliquer les mécanismes structuraux de l'allorecognition T. Comment les LTs, éduqués contre des complexes CMHp du soi, contactent-ils les CMHs allogéniques ? D'un point de vue structural, les interactions TCR/CMHp conventionnelles et allogéniques sont-elles identiques ou existe-t-il différents modes de liaison du TCR expliquant l'alloréactivité ?

2.3.3 Bases structurales de l'allorecognition

Les études structurales de TCRs alloréactifs ont été largement freinées par le nombre limité de systèmes où les complexes conventionnels (CMH du soi/peptide étranger) et allogéniques (CMH étranger/peptide du soi) reconnus ont été identifiés. En effet, les peptides endogènes présentés dérivent du protéome entier de l'hôte, rendant leur identification difficile. En outre, ces études concernent des TCRs de LTs effecteurs et non régulateurs. Récemment, deux groupes ont déterminé comment un TCR unique se lie à son complexe CMH-Ip conventionnel et à un complexe CMH-Ip allogénique. Les structures d'un TCR de souris, nommé TCR 2C, en complexe avec son ligand de sélection positif, H2-K^b-dEV8, et avec son ligand allogénique H2-L^d-QL9 et des variants peptidiques, ont été déterminées (Bowerman et al., 2009; Colf et al., 2007; Garcia et al., 1998). Le TCR 2C adopte deux modes d'arrimage différents lors de la liaison avec les complexes du soi et allogénique, avec très peu de contacts partagés entre les deux structures, démontrant un rôle limité du mimétisme moléculaire dans cette interaction. De façon plus générale, cette étude démontre qu'un TCR particulier n'utilise pas nécessairement la même stratégie d'arrimage pour crossréagir avec des ligands structurellement similaires.

Le groupe de McCluskey et Rossjohn a identifié un autre mécanisme d'alloréactivité grâce à l'étude du TCR LC13, qui reconnaît un CMH du soi HLA-B*08 :01 complexé avec un peptide viral FLR (dérivé de l'Epstein Barr Virus EBV) et cross-réagit avec l'allotype proche HLA-B*44 :05 présentant un peptide endogène dérivé de l'ABCD3 (ATP-binding cassette)(Burrows et al., 1994; Macdonald et al., 2009). Les structures des deux complexes

sont très similaires, tant dans le mode d'arrimage du TCR que dans la nature et le nombre des contacts entre le TCR et le complexe CMHp. L'alloréactivité s'explique ici par un phénomène de mimétisme moléculaire dépendant du peptide (**Figure 13**). De façon surprenante, le peptide viral et l'allopeptide présentent des conformations similaires uniquement après liaison par le TCR LC13, démontrant un changement structural induit par l'engagement du TCR (mécanisme dit de « induced-fit »). Ce mimétisme structural, plutôt inattendu au vu des différences entre les deux molécules HLA, est associé à la spécificité fine du TCR, qui ne cross-réagit pas avec l'allotype proche HLA-B*4403 (Macdonald et al., 2009).

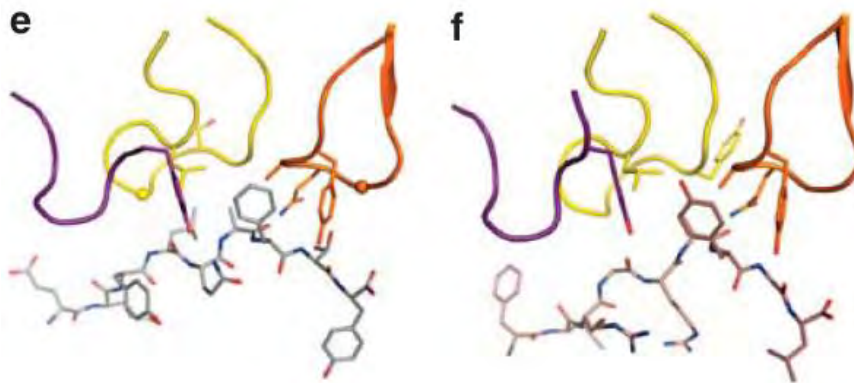


Figure 13 : Comparaison de l'interaction du TCR LC13 avec le peptide du complexe allogénique (en gris) et le peptide viral FLR (en marron).

D'après (Gras et al., 2011). Les boucles CDR1 α , CDR3 α et CDR3 β sont colorées en violet, jaune et orange respectivement et révèlent un mode de liaison similaire du TCR sur les deux complexes CMHp différents.

Le mimétisme moléculaire serait également responsable de l'alloréactivité du TCR JL9, spécifique du HLA-B*08:01 du soi, envers la molécule HLA-B*35 :01 allogénique (Archbold et al., 2006; Gras et al., 2012). La résolution d'un plus grand nombre de structures conventionnelles et alloréactives sera nécessaire pour établir les rôles relatifs du mimétisme et des modes d'arrimage différents dans le phénomène d'alloréactivité. De plus, il devient important d'élucider dans quelle mesure le mimétisme moléculaire pourrait être prévisible avant la transplantation, ceci afin d'évaluer les combinaisons donneur/receveur optimales.

En effet, la sélection de couples donneur/receveur repose sur la recherche de donneurs potentiels avec des variations génétiques minimales des molécules du CMH. Grâce à l'algorithme HLAMatchmaker, la comparaison des résidus polymorphiques des HLAs permet de prédire la potentielle immunogénicité de la greffe quant au rejet humoral, déclenché par les DSAs spécifiques (Duquesnoy, 2011). En revanche, l'impact des résidus polymorphiques sur l'alloréactivité des LTs est plus complexe. En effet, alors que la plupart des alloréponses décrites impliquent des allotypes différents de HLA, une différence d'un seul AA entre des

sous-types d'HLA peut entraîner un rejet de greffe (Fleischhauer et al., 1990). Ce phénomène pourrait être expliqué par le mimétisme moléculaire précédemment décrit. En effet, comme prédit par Lechler et Lombardi, la sélection positive thymique sélectionne les LTs de l'hôte interagissant avec les CMHs du soi, entraînant paradoxalement de fortes alloréponses T envers des allotypes proches de CMHs allogéniques par mimétisme moléculaire (Lechler et al., 1992; Lombardi et al., 1989). Sur cette base, augmenter la diversité entre les allotypes de HLA du donneur et du receveur réduirait donc les risques de cross-réactivité des TCRs. Heemskerk et collègues ont ainsi montré que l'augmentation du nombre de résidus polymorphiques entre les allotypes de HLA diminue l'alloréactivité *in vitro* et augmente les taux de survie des patients après greffe de moelle osseuse (Heemskerk et al., 2005, 2007).

2.4 Etude du répertoire T

Les réponses T spécifiques d'antigènes induites aussi bien par la transplantation, les infections ou l'autoimmunité sont caractérisées par des cellules exprimant des profils biaisés des TCRs, sélectionnés à partir d'un répertoire naïf et divers (cf § 2.2.2 Constitution de la diversité du répertoire TCR). Les biais générés sont de différentes natures et peuvent être influencés par plusieurs facteurs, dont la structure du complexe CMH β reconnu. A l'aide de différentes approches expérimentales, l'étude du répertoire T spécifique d'antigène permet d'analyser les cellules recrutées au cours de la réponse immune, l'impact de la diversité sur la protection de l'hôte et pourrait constituer un biomarqueur intéressant du statut de la greffe.

2.4.1 Les différents biais du répertoire

Comme décrit précédemment, les boucles CDR3 du TCR interagissent essentiellement avec le peptide présenté et concentrent la spécificité fine des LTs. Ainsi, l'étude des variations de longueur et de séquence en AAs du CDR3 permet une mesure de la diversité dans un répertoire T spécifique d'antigène et une analyse des LTs exprimant des profils biaisés du TCR. Les chaînes V α et V β du TCR sont toutes deux impliquées dans l'interaction et combinent biais et diversité du répertoire sélectionné (Day et al., 2011). L'étude des CDR3 β et CDR3 α est donc complémentaire.

Le biais du répertoire TCR peut être défini comme une déviance par rapport à un répertoire T naïf, impliquant l'usage préférentiel de combinaisons des segments géniques formant le domaine V du TCR en réponse à un antigène. Ainsi, la reconnaissance d'antigènes

après transplantation induit la sélection et l'expansion de LTs spécifiques, générant un répertoire dit « biaisé », « restreint », « limité », ou encore « immunodominant ».

Ces biais peuvent être classés en trois groupes principaux (Turner et al., 2006)(**Figure 14**) :

- Le biais de **type 1** du TCR est caractérisé par la sélection préférentielle d'une région V unique, généralement une région V β particulière (Price et al., 2004). Les régions CDR3 ou J ne sont pas ou très peu conservées.
- Le biais de **type 2** du TCR implique la sélection fréquente d'AAs conservés ou de motifs dans la séquence CDR3 des chaînes V α ou V β du TCR (Cose et al., 1995). Des variations dans la région CDR3 sont encore présentes dans ce biais. L'exemple de la figure 14 utilise un motif WG de 2 AAs.
- Le biais de **type 3** du TCR est moins commun et caractérisé par la sélection reproductible de séquences TCR clonales (Argaet et al., 1994). Le répertoire TCR est alors défini par une chaîne V α et/ou V β unique, avec une séquence CDR3 et une région J conservées.

Biais de type 1			Biais de type 2			Biais de type 3		
TRBV27	N-D β -N	J β	TRBV4	N-D β -N	J β	TRBV7-6	N-D β -N	J β
CSVS	GTGN	EKLF	CAS	SDWG	YAEQFFG	CAS	SLGQA	YEQYFG
CASS	LIE	YSNQPOQY	CAS	SLWG	NTGQLYFG	CAS	SLGQA	YEQYFG
CASS	LIGVVGW	POY	CAS	RDWG	AETLYFG	CAS	SLGQA	YEQYFG
CASS	SDL	QPDPQY	CAS	SYWG	SAETLYFG	CAS	SLGQA	YEQYFG

Figure 14 : Exemple de différents types de biais du TCR β au sein de répertoires T spécifiques d'antigènes.

Adapté de (Turner et al., 2006). Panel de gauche : TCR V β 27, spécifique d'un peptide dérivé de Gag chez des macaques infectés par le SIV. Panel du centre : TCR V β 4, spécifique d'un peptide dérivé de la glycoprotéine B chez des souris infectées par le HSV. Panel de droite : TCR V β 7-6, spécifique d'un peptide dérivé de EBNA3 chez l'Homme infecté par l'EBV. SIV=simian immunodeficiency virus, HSV=herpes simplex virus, EBV=Epstein-Barr virus.

Ces biais s'appliquent aux TCRs spécifiques d'un antigène donné chez un même individu. L'analyse du répertoire T spécifique chez différents individus apporte un niveau additionnel de complexité. Ainsi, les concepts de répertoire privé ou public ont été introduits pour différencier les phénomènes spécifiques à l'individu de ceux partagés par l'ensemble d'une population. Un **répertoire privé** décrit une situation où les TCRs répondant à un même complexe CMHp sont différents d'un individu à l'autre. En revanche, un **répertoire public**

correspond à l'utilisation commune par tous les individus d'un TCR unique et clonal (pour la chaîne α , β ou les 2) spécifique du complexe CMH β étudié.

2.4.2 Approches expérimentales de l'étude du répertoire T

Les groupes de TCRs sélectionnés lors d'une réponse immune peuvent être étudiés sous un angle quantitatif et/ou qualitatif. L'étude quantitative renseigne sur la proportion relative d'un groupe de TCRs par rapport à un autre. L'analyse qualitative est basée sur l'étude de la clonalité. Un clone est un ensemble de LTs identiques, issu de la sélection et de l'expansion d'un LT unique de forte affinité pour l'antigène, et caractérisé par un TCR unique. Trois niveaux de clonalité du répertoire T sont définis :

- la polyclonalité, illustrée par un grand nombre de LTs avec des TCRs différents et par l'absence de clones majoritaires
- l'oligoclonalité, caractérisée par la présence conjointe de plusieurs clones de TCRs
- la monoclonalité, liée à la sélection d'un clone majoritaire unique

La diversité du répertoire TCR spécifique d'épitope peut être mesurée à différents niveaux. La caractérisation des différentes familles du TCR à la surface des LTs a été initiée par le biais du développement des anticorps monoclonaux, pour la chaîne V β en particulier. Peu d'anticorps sont toutefois disponibles chez le rat, limitant l'analyse par cytométrie en flux. La caractérisation des transcrits du TCR permet une analyse plus fine de la diversité, par la détermination des séquences nucléotidiques et en AAs des régions CDR3s du TCR. Si la séquence de chaque TCR est l'information ultime, l'analyse de longueur de la boucle CDR3 est une première étape dans l'étude du biais d'un répertoire TCR. Les technologies Immunoscope ou Spectratyping, développées dans les années 90, révèlent la distribution des longueurs de la boucle CDR3 en fonction des gènes V(D)J qui la composent (Currier and Robinson, 2001). Cette méthode repose sur l'amplification de régions CDR3 β particulières grâce à l'utilisation combinée d'une amorce pour chaque gène V β et d'une amorce spécifique des régions C β du TCR (**Figure 16A**). Les transcrits obtenus sont amplifiés et marqués lors d'une deuxième PCR avec une amorce C β fluorescente. Chargés sur un gel d'électrophorèse, les fragments migrent en fonction de leur longueur pour former un « spectratype » (une succession de bandes espacées de 3 nucléotides), qui une fois digitalisé se présente sous la forme d'un spectre d'électrophorèse, avec différents types de profils. Une distribution gaussienne classique est caractéristique du répertoire TCR naïf d'individus sains, de rats ou de

souris naïves et témoigne d'une population polyclonale de LTs (**Figure 15A**). Les profils altérés présentent un ou plusieurs pics dominants, suggérant respectivement la présence d'une population oligoclonale ou clonale de LTs utilisant des TCRs avec une même longueur de CDR3 (**Figure 15B et C**). Toutefois, ces cellules n'ont pas nécessairement la même séquence de CDR3 et seul le séquençage permet de déterminer le degré de biais du répertoire (cf § précédent).

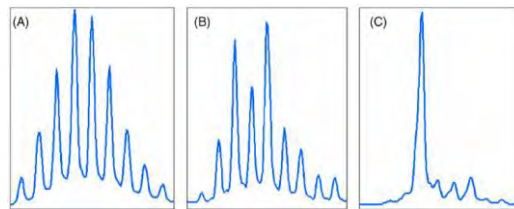


Figure 15 : Exemples de profil Immunoscope de longueur CDR3.
D'après (Miqueu et al., 2007).

Alors que les premières études de répertoire étaient généralement réalisées sur des populations lymphocytaires totales au cours de la réponse immune, le développement de la technologie de tétramères de complexes CMHp a permis l'étude du répertoire de LTs spécifiques d'antigènes (Lim et al., 2002). Avec cette approche, les LTs tétramère⁺Vb_x⁺ peuvent être triés, puis l'ARN extrait, rétrotranscrit et amplifié pour les segments Vβ. Les produits Vβ positifs sont ensuite clonés dans un vecteur de type TOPO et séquencés (**Figure 16B**). Cette technique est particulièrement appropriée pour les réponses T utilisant plus d'un segment Vβ. Une approche alternative est le tri unicellulaire par le tétramère, suivi par la synthèse d'ADNc et une PCR pour amplifier les régions Vβ d'intérêt. Les produits de PCR sont migrés sur un gel et les bandes positives sont séquencées (**Figure 16C**).

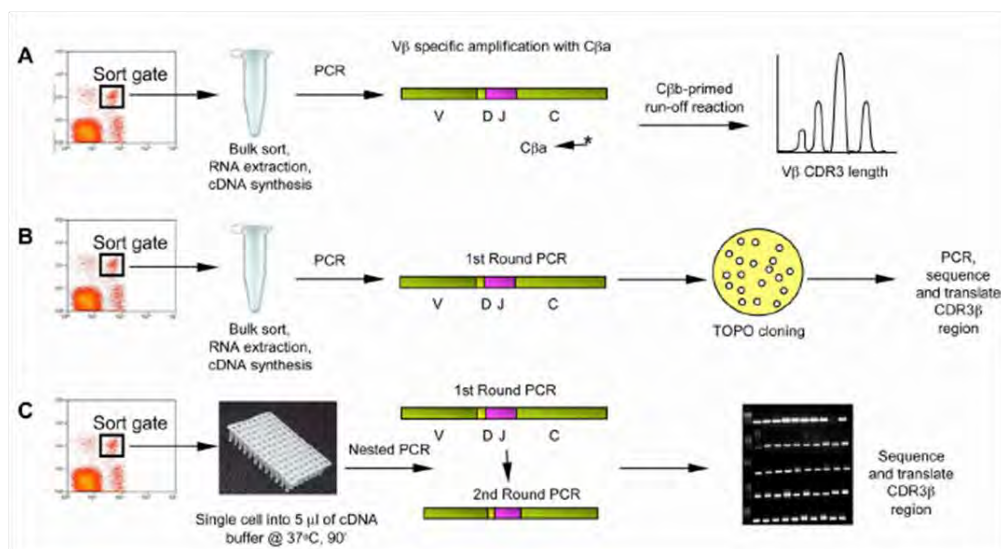


Figure 16 : Différentes approches expérimentales de l'analyse du répertoire TCR.
D'après (Kedzierska et al., 2008).

2.4.3 Facteurs influençant le biais du TCR

La diversité potentielle théorique du TCR se situe entre 10^{12} et 10^{15} combinaisons TCR α et β . Or, le nombre réel de TCRs exprimés est bien moindre après **sélection thymique**. Les répertoires T matures naïfs sont donc déjà limités en diversité à la sortie du thymus. En effet, la sélection thymique influence le biais du TCR, à la fois en limitant (sélection négative) et en façonnant (sélection positive préférentielle de régions V du TCR pour l'interaction avec le CMH) le répertoire T naïf.

Lors d'une réponse immune contre un antigène donné, certaines cellules du pool de LTs naïfs s'activent après interaction avec leur complexe CMHp, ce qui conduit à leur expansion clonale et à l'apparition d'un biais dans le répertoire T. Les précurseurs T naïfs doivent d'abord atteindre un certain **seuil d'avidité** du TCR pour être sélectionnés dans le répertoire immun spécifique. Lors de la phase précoce de la réponse immune, des TCRs de faible et forte affinité, avec des chaînes V plus ou moins adaptées au complexe, peuvent être sélectionnés. En revanche, l'exposition prolongée à l'antigène sélectionne des clonotypes particuliers, avec une structure et une avidité optimales, conduisant à une réponse effectrice mature dominée par les TCRs de plus forte affinité (Malherbe et al., 2004; Zehn et al., 2009). Par voie de conséquence, la diversité du répertoire T spécifique d'antigène devrait se restreindre progressivement, sauf si des mécanismes de compensation reposant sur les corécepteurs CD8 et CD4 se mettent en place. En effet, la liaison des corécepteurs pourrait servir à stabiliser les interactions TCR/CMHp moins optimales (Ely et al., 2006) et ainsi réduire le seuil d'activation T (Laugel et al., 2007). Le biais du répertoire T sélectionné par un antigène lors d'une réponse immune est donc fonction de l'avidité de l'interaction TCR/CMHp et du rôle joué par les corécepteurs associés.

D'un point de vue structural, les **caractéristiques conformationnelles** du peptide dans le sillon de la molécule du CMH influencent de façon déterminante la diversité des TCRs sélectionnés. Ainsi, un complexe CMHp présentant une surface plane et lisse (« featureless ») au TCR génère une diversité nulle ou limitée du répertoire T mature, à caractère public (Turner et al., 2005) (**Figure 17**). D'une part, la surface d'interaction disponible est insuffisante pour la plupart des TCRs, et d'autre part, la sélection négative a éliminé les TCRs naïfs pouvant potentiellement reconnaître ces complexes CMHp plats et sans relief, proches des complexes CMHp du soi. De la même manière, un peptide long (>12 AAs), qui provoque une courbure au centre de la poche peptidique avec un renflement en dehors du sillon (« bulged »), limite les contacts du TCR avec les hélices α du CMH et sélectionne un

répertoire limité (Miles et al., 2005). Tynan et ses collègues ont ainsi rapporté que le peptide LY13, dérivé de l'EBV et long de 13 AAs, en se liant au CMH-I HLA-B*3508 dans une conformation protubérante et rigide, induit un biais de type 3 du TCR α et un répertoire public (Tynan et al., 2005a). Enfin, les peptides conventionnels dits « featured » ont une longueur typique de 8 à 10 AAs et exposent plusieurs chaînes latérales aux TCRs spécifiques, qui tendent à être plus nombreux et divers (Meijers et al., 2005; Turner et al., 2005). Toutefois, des exemples contraires existent. Ainsi, un répertoire restreint et public peut également être sélectionné par un peptide « featured », où le TCR présente une forte complémentarité structurale avec le peptide entier, avec une focalisation sur trois points précis (Gras et al., 2009).

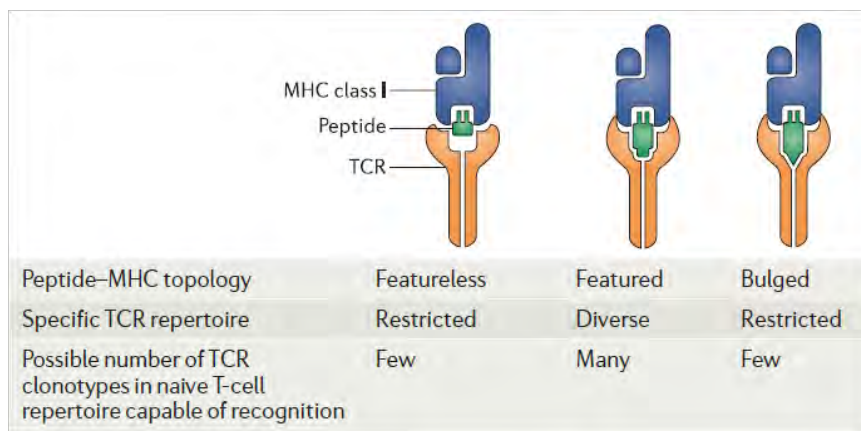


Figure 17 : La structure des complexes CMHp peut directement influencer la diversité du répertoire TCR.

D'après (Turner et al., 2006).

En résumé, la sélection thymique, l'éventail de TCRs disponibles initialement dans le pool naïf, la présence continue de l'antigène, la charge antigénique, et la nature du complexe CMHp reconnu, sont autant de facteurs qui influencent les caractéristiques du répertoire TCR sur le long terme.

2.4.4 Implications fonctionnelles de la diversité du TCR

A ce jour, relativement peu d'informations sont disponibles sur les conséquences fonctionnelles d'un biais du TCR durant les maladies infectieuses, la transplantation ou l'autoimmunité (Picarda et al., 2011). Plusieurs études réalisées dans le cas d'infections virales ont permis de montrer que la diversité du répertoire TCR influence la qualité de la réponse immune (Turner et al., 2009). Ainsi, chez le macaque infecté par le SIV, un répertoire public et restreint pour le TCRV β 6-5 spécifique du peptide TL8 échoue à contrôler l'infection en cas de mutation du peptide viral. En revanche, l'échappement viral est contrôlé par le

TCRV β 27 présentant un répertoire privé et plus divers, donc plus flexible pour s'adapter à des variations structurelles mineures (Price et al., 2004). Une diversité augmentée du TCR favorise donc le phénomène de cross-réactivité à des complexes CMHp similaires. Cependant, bien qu'un répertoire divers soit important pour la reconnaissance de variants d'épitopes viraux, il ne confère pas un avantage fonctionnel aux LTs CD8⁺ répondant à leur complexe CMHp spécifique (La Gruta et al., 2008). Concernant les Tregs, une étude récente a montré qu'une grande diversité du répertoire TCR assure une fonction suppressive optimale des Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et leur homéostasie dans un modèle de GvHD expérimentale chez la souris (Föhse et al., 2011). D'autre part, dans un modèle de transfert adoptif chez la souris nouveau-née déficiente en FoxP3, seul le co-transfert de Tregs FoxP3⁺ naturelles (nTregs) et de LTs conventionnels FoxP3⁻ se différenciant en Tregs *in vivo*, établit une tolérance muqueuse et empêche l'inflammation chronique et l'autoimmunité (Haribhai et al., 2011). Bien que les signatures transcriptionnelles de ces deux populations soient très proches, leur répertoire TCR est majoritairement distinct. Ainsi, les Tregs induites par conversion de LTs conventionnels sont complémentaires des nTregs pour l'induction de tolérance dans ce modèle, sur la base du cumul des répertoires TCR et donc de l'augmentation de la diversité au sein des réponses régulatrices.

Miqueu et ses collègues ont analysé le répertoire TCR des LTs du sang périphérique chez des patients transplantés rénaux stables et sous immunosuppression (Miqueu et al., 2010), révélant la présence de répertoires hétérogènes, allant de non biaisé à très restreint. En revanche, les répertoires de patients opérationnellement tolérants et de patients en probable rejet humoral chronique sont très différents, polyclonaux et très biaisés respectivement. Ainsi, la nature du répertoire TCR semble corrélérer avec l'issue de la greffe rénale. L'étude de la diversité du répertoire T pourrait être envisagée comme biomarqueur potentiel du statut clinique de la greffe (Naesens and Sarwal, 2010). De la même façon, un répertoire CD8 restreint ou clonal après une greffe de moëlle osseuse allogénique est associé avec une GvHD (Du et al., 2007).

3 La tolérance en transplantation

La tolérance immunologique se caractérise par l'absence de réactivité spécifique vis à vis d'antigènes particuliers, notamment les antigènes du « soi ». La rupture de cette tolérance aboutit au développement de l'auto-immunité. La tolérance en transplantation correspond à l'acceptation du greffon chez un hôte immunocompétent, sans signe de rejet chronique et en l'absence de traitement immunosuppresseur prolongé, tout en conservant une réponse normale vis-à-vis d'autres antigènes. Seuls quelques rares cas de tolérance spontanée à l'allogreffe rénale et hépatique ont été décrits chez des patients ayant arrêté leur traitement immunosuppresseur suite à une non compliance ou à l'apparition de cancer. L'obtention d'un état de tolérance devrait permettre, chez l'homme, de supprimer les traitements immunosuppresseurs connus pour entraîner de nombreux effets secondaires, et de prévenir la survenue du rejet chronique. Deux types de tolérance existent : la tolérance dite centrale et la tolérance dite périphérique. Les mécanismes de tolérance des LTs, acteurs majeurs du rejet d'allogreffe, seront décrits ci-après.

3.1 La tolérance centrale

Initialement décrite dans les années 1950 (BILLINGHAM and MEDAWAR, 1953), **la tolérance centrale** consiste en l'élimination des LTs autoréactifs, c'est-à-dire capables de reconnaître les antigènes du soi (**Figure 18**). Dans le cortex profond du thymus, les thymocytes précurseurs doubles positifs (DP, $\text{TCR}^+ \text{CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$), exprimant à leur surface le TCR issu du réarrangement aléatoire de ses gènes (cf § 2.2.2 Constitution de la diversité du répertoire TCR), vont interagir avec les cellules épithéliales corticales thymiques (cTECs) qui expriment des complexes CMHp du soi (Hogquist and Bevan, 1996). Seuls les thymocytes DP possédant un TCR capable de reconnaître un peptide présenté par un CMH du soi avec une avidité moyenne vont recevoir un signal de survie (Daniels et al., 2006), et perdre l'expression d'un des deux corécepteurs CD8 ou CD4 suivant la classe de CMH reconnue. Les cellules n'interagissant pas avec les complexes du soi ou avec une avidité trop faible meurent par négligence ou apoptose dans le cortex thymique (Starr et al., 2003). Après cette première étape de **sélection positive**, les thymocytes simples positifs $\text{TCR}^+ \text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ ou CD4^+ (représentant moins de 5% du pool de thymocytes DP) migrent vers la médulla du thymus, guidés par un gradient de chimiokines (Kwan and Killeen, 2004; Ueno et al., 2004). Pendant quatre à cinq jours, ils y scannent activement les CPAs du thymus (Le Borgne et al., 2009), qui sont des cellules épithéliales médullaires thymiques (mTECs) et des DCs

thymiques, présentant un CMH du soi complexé à un antigène spécifique de tissus (TSA)(Derbinski et al., 2001; Gallegos and Bevan, 2004). Selon le modèle de sélection sur l'avidité, la **sélection négative** se produit lorsque le TCR d'un thymocyte engage un complexe CMHp avec une trop forte avidité, conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Baldwin et al., 1999). Ce mécanisme élimine donc les cellules potentiellement autoréactives et génère un répertoire de LTs relativement tolérant au soi. L'expression des TSAs par les mTECs est contrôlée par le gène AIRE (AutoImmune REgulator) (Gavanescu et al., 2007; Perniola, 2012; Zuklys et al., 2000). Chez la souris, des mutations au niveau de ce gène AIRE génèrent une dysfonction du système de sélection négative et l'apparition de MAIs (Anderson et al., 2002; Kuroda et al., 2005). Chez l'Homme, la déficience du gène AIRE engendre le syndrome autoimmun monogénique APECED (Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy) caractérisé par la perte de la tolérance au soi dans de multiples organes (Aaltonen et al., 1994; Gallo et al., 2013). Cependant, l'expression des TSAs peut se faire de façon indépendante de AIRE, comme le montre l'étude de Derbinski qui a mis en évidence l'expression de gènes codant pour des TSA dans des cellules mTEC provenant de souris KO pour le gène AIRE (Derbinski et al., 2001). Les lymphocytes T ayant franchi ces étapes de sélection (environ 3%) quittent le thymus et migrent vers les OLS en périphérie (Goldrath and Bevan, 1999).

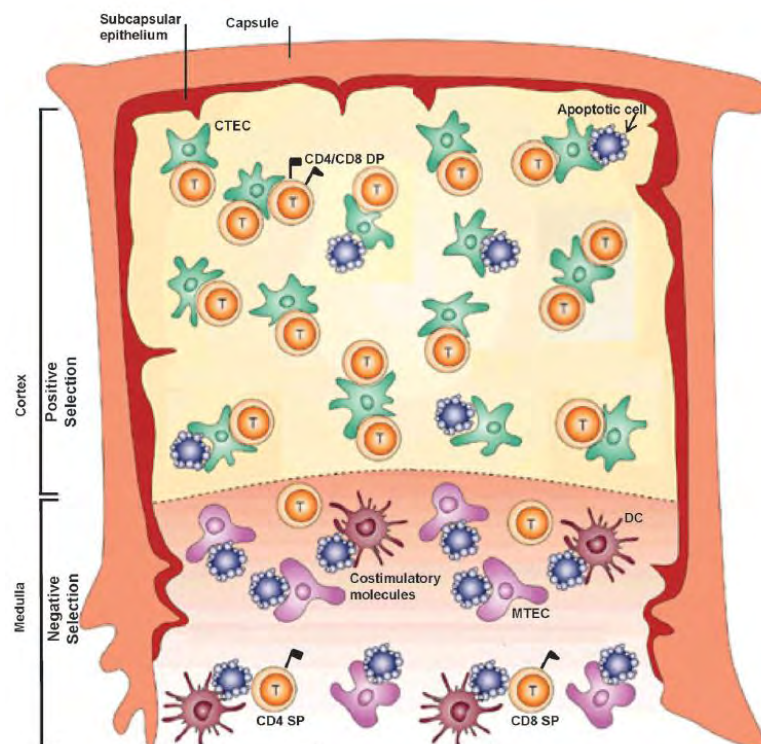


Figure 18 : Sélections positive et négative dans le thymus.
D'après (Griesemer et al., 2010).

L'autoréactivité des LTs échappant à la sélection négative est contrôlée par de nombreux mécanismes périphériques, parmi lesquels la délétion clonale, l'induction d'un état anergique, l'ignorance et l'inhibition fonctionnelle active par les Tregs.

La sélection positive dans le thymus permet aussi de générer des Tregs dites naturelles (nTregs)(Hsieh et al., 2012; Romagnoli and van Meerwijk, 2010). Les Tregs expriment un TCR d'avidité moyenne à forte pour les antigènes du soi, sous le niveau conduisant à la sélection négative et au dessus du niveau de sélection positive (Hsieh et al., 2012; Jordan et al., 2001; Romagnoli et al., 2002). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes impliqués dans la génération de ces cellules, basés sur l'autoréactivité du TCR, la signalisation cytokinique et l'interaction avec les CPAs thymiques. Initialement décrites comme provenant de cellules DP ($CD4^+CD8^+$) dans le cortex (Bensinger et al., 2001; Liston et al., 2008), il semble que les nTreg soient principalement issues de thymocytes immatures à l'état SP $CD4^+$ dans la médulla (Lee and Hsieh, 2009). Des observations *in vitro* proposent que les DCs intrathymiques $CD11c^+CD11b^-$, activées par la lymphopoiétine stromale thymique (TSLP) exprimée par les corpuscules de Hassal, permettent la différenciation des LTs $CD4^+CD8^-CD25^-$ en $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Liu, 2006; Watanabe et al., 2005). Les mTECs favorisent également l'expression de FoxP3 par les précurseurs des cellules $CD4^+FoxP3^+$ (Aschenbrenner et al., 2007; Hinterberger et al., 2010)(**Figure 19**). En plus du rôle majeur joué par la reconnaissance spécifique par le TCR (Picca et al., 2006), les signaux de costimulation ont un rôle essentiel dans le développement des nTregs. En effet, des études montrent qu'une déficience pour certaines molécules de costimulation telles que CD40, CD28 ou B7, diminue le nombre de Tregs $CD4^+CD25^+$ dans le thymus et en périphérie (Salomon et al., 2000; Tai et al., 2005). Certaines cytokines, telles que l'IL-2, IL-7 ou IL-15, semblent également impliquées voire nécessaires au développement de ces nTregs (Burchill et al., 2008; Vang et al., 2008). Les nTregs quittent le thymus plus tardivement que les LTs conventionnels (Romagnoli et al., 2012) et migrent dans les OLS et dans d'autres organes tels que le foie ou la peau. En périphérie, l'homéostasie et la survie des nTregs sont principalement assurées par la présence d'IL-2 (Fontenot et al., 2005). Le rôle des nTregs consiste notamment à inhiber les LTs effecteurs autoréactifs ayant échappé à la sélection thymique et potentiellement responsables de MAIs.

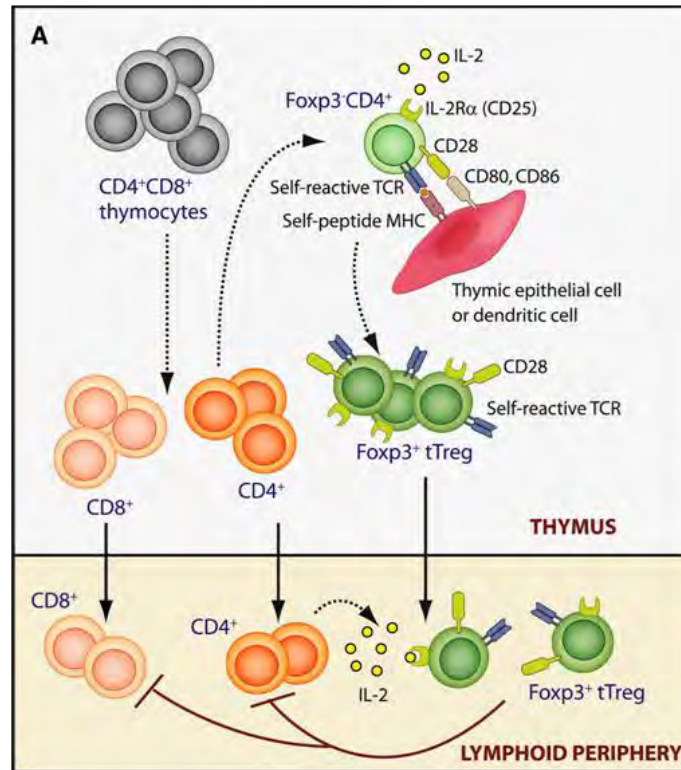


Figure 19 : Génération de nTregs dans le thymus (identifiés FoxP3⁺ tTregs).
D'après (Josefowicz and Rudensky, 2009).

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, après une greffe de moelle osseuse allogénique. 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 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 (Bühler et al., 2002; Kawai et al., 1995, 2008; Sachs et al., 2011). Malgré la toxicité des traitements d'induction (irradiation totale ou thymique, anticorps déplétants, drogues immunosuppressives...) et le nombre d'études limité, cette stratégie d'induction de tolérance est prometteuse et à l'étude pour une application clinique large (Page et al., 2012).

3.2 La tolérance périphérique

Malgré l'activité du facteur de transcription AIRE, tous les TSAs ne sont pas exprimés dans la médulla du thymus ou le sont en quantité insuffisante. L'organisme a donc développé des mécanismes de tolérance périphérique pour pallier à la présence de LTs autoréactifs matures circulant en périphérie. Ils peuvent être de nature passive (délétion clonale, ignorance ou anergie) (**Figure 20**) ou active (suppression par les Tregs), et agir de manière isolée ou en synergie. Ces mécanismes, empêchent la réponse autoimmune, limitent également les réponses immunitaires trop fortes contre des antigènes étrangers (allergie, asthme) et permettent une tolérance foeto-maternelle.

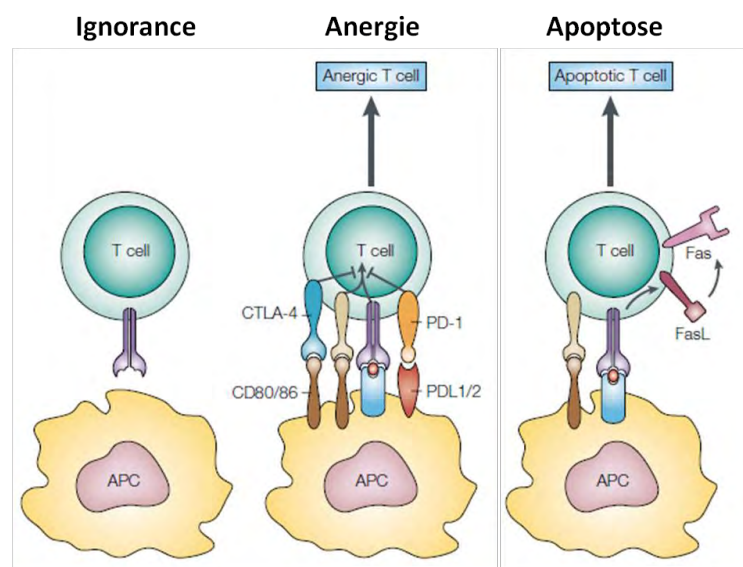


Figure 20 : Les mécanismes de tolérance passive.

3.2.1 La délétion clonale/l'apoptose

Plusieurs mécanismes d'apoptose sont impliqués dans la **délétion clonale** des LTs (Brenner et al., 2008):

- l'apoptose **passive** (activated-T cells autonomous death, ACAD) lors de la privation de facteurs de croissance (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21), induite par le facteur proapoptotique Bim et la baisse d'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Hildeman et al., 2002)
- l'apoptose **active** induite par des stimulations répétées du TCR et de fortes concentrations en antigène (activation induced cell death ou AICD), ce qui entraîne l'expression de FasL à la surface des LTs activés (Brunner et al., 1995). En se liant à Fas lui aussi exprimé par les LTs, FasL transduit un signal de mort et l'activation de caspases. En plus de sa

fonction de facteur de survie, l'IL-2 est également nécessaire à l'induction d'AICD lors de l'expansion des LTs (Lenardo, 1991) et favoriserait l'expression de FasL.

Néanmoins, d'autres mécanismes d'apoptose des LTs en périphérie, impliquant l'activation de NF-kB, existent et induisent une tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris déficiente pour Fas (Li et al., 1999a). L'ACAD contrôle l'homéostasie des LTs en réponse aux antigènes étrangers alors que l'AICD est plutôt impliquée dans le contrôle de la réponse aux antigènes du soi et permet d'éliminer les LTs autoréactifs. Ainsi, des mutations du gène Fas chez l'Homme entraînent une dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire et le développement de maladies lymphoprolifératives autoimmunes (Worth et al., 2006).

3.2.2 L'ignorance

L'**ignorance immunologique** consiste en l'absence de rencontre entre les CPAs et les LTs. L'importance de ce phénomène a été démontrée en utilisant des souris exprimant un TCR transgénique reconnaissant un peptide viral particulier (Ohashi et al., 1991). 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 LTs vis-à-vis du peptide *in vitro*. En revanche, l'injection du peptide viral en périphérie active les LTs qui détruisent alors les îlots. Cette expérience a permis de montrer que les LTs autoréactifs demeurent présents et fonctionnels mais ignorent la présence de l'antigène. La faible quantité d'antigène, la séquestration ou séparation physique d'antigènes par des barrières anatomiques (barrière hématoencéphalique, œil, testicules) sont des causes d'ignorance immunologique. Ce mécanisme est peu important en transplantation. Toutefois, le blocage de l'infiltration du greffon, de la migration des DCs ou de la sortie des LTs activés des OLS pourraient constituer une certaine forme d'ignorance.

3.2.3 L'anergie

L'**anergie** est caractérisée par l'incapacité fonctionnelle des LTs à proliférer et à produire de l'IL-2 après réactivation par leur antigène (Jenkins and Schwartz, 1987; Schwartz, 1990). Elle résulte de l'activation incomplète des LTs en l'absence de costimulation. Cet état peut être levé par apport exogène d'IL-2 (Beverly et al., 1992) ou sous des conditions proinflammatoires (infections) (Knoechel et al., 2006; Röcken et al., 1992). L'anergie des LTs se développe sous différentes conditions :

- un défaut de costimulation par les CPAs

- une interaction de faible affinité entre le TCR et le complexe CMHp (Sloan-Lancaster et al., 1996)
- une interaction inhibitrice via CTLA-4/B7. Ce ligand est exprimé tardivement par les LTs après activation, lie les molécules B7 avec une forte affinité, transduit un signal négatif et stoppe la progression dans le cycle cellulaire. Les souris déficientes pour CTLA-4 développent une autoimmunité spontanée (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995) et les LTs CD4⁺ CTLA-4^{-/-} sont réfractaires à l'induction d'anergie (Greenwald et al., 2001)
- une interaction inhibitrice via PD-1 (Programmed Death-1)/PDL-1 (Chikuma et al., 2009).

Certaines CPAs, comme les macrophages (Hoves et al., 2006) et les DCs tolérogènes (Rutella et al., 2006; Torres-Aguilar et al., 2010), immatures ou maturées sous des conditions spécifiques, ont la capacité de rendre les LTs anergiques par la sécrétion de cytokines suppressives et par une costimulation inadéquate. En transplantation, les LTs rendus anergiques *in vitro*, par contact avec des CPAs du donneur en présence d'anticorps anti-CD80/CD86, sont capables de transférer la tolérance à l'allogreffe de rein chez le primate non-humain (Bashuda et al., 2005).

3.2.4 La suppression/régulation

La tolérance périphérique peut être induite par des cellules dites régulatrices ou suppressives inhibant l'activation ou les fonctions effectrices des cellules avoisinantes. La régulation ou suppression est un mécanisme actif impliquant des contacts cellulaires ou la sécrétion de cytokines suppressives. Après la transplantation d'organes, il est essentiel de contrôler à la fois la réponse immunitaire innée, induite par les dommages tissulaires, et la réponse immunitaire adaptative, stimulée par l'allogénicité du greffon, pour permettre la survie et la fonction du transplant à long terme. Différentes populations leucocytaires peuvent promouvoir la tolérance immune lors de la transplantation et sont donc la cible de nombreuses stratégies thérapeutiques. Les cellules régulatrices incluent les Tregs, les LBs régulateurs (Bregs), les DCs tolérogènes, les macrophages, les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) ou encore les cellules mésenchymales stromales (MSCs) (Wood et al., 2012).

3.3 Les cellules régulatrices

A l'heure actuelle, les cellules dites régulatrices ont été et sont toujours largement étudiées du fait de leur implication en transplantation mais aussi dans d'autres pathologies telles que les MAIs, les allergies ou le cancer.

3.3.1 Les lymphocytes T régulateurs

3.3.1.1 Les Tregs CD4⁺

Le concept de la suppression de la réponse immune par les LTs a été largement développé dans les années 1970 (Gershon and Kondo, 1970, 1971; Gershon et al., 1972) puis abandonné en l'absence de caractérisation précise de ces cellules. La « résurrection » de ce concept a eu lieu en 1995 par Sakaguchi qui a décrit le rôle d'une sous-population de LTs CD4⁺CD25⁺ dans le contrôle des réactions autoimmunes de la souris (Sakaguchi et al., 1995; Shevach, 2011). Les Tregs les plus étudiées et donc les mieux caractérisées sont les nTregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, sélectionnées par des interactions de haute avidité dans le thymus. Les deux dernières décennies ont été le théâtre de la découverte de nombreux types différents de Tregs incluant les Tregs CD8⁺, les LTs doubles négatifs CD3⁺CD4⁻CD8⁻, les NKT, les LTs $\gamma\delta$, ces différentes populations restant cependant moins étudiées en comparaison aux Tregs CD4⁺. Il existe deux sous-types de Tregs : les nTregs, représentant 5 à 10% du répertoire des LTs CD4⁺ (Itoh et al., 1999), et les Tregs induites (iTregs). Alors que les nTregs se développent comme une lignée distincte dans le thymus, les iTregs dérivent de LTs conventionnels naïfs en périphérie, préférentiellement émigrés récemment du thymus (Paiva et al., 2013), et peuvent être générées *in vitro* (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009).

3.3.1.1.1 Les Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺

Depuis l'identification du marqueur CD25 par Sakaguchi, de nombreux autres marqueurs de surface ont été proposés pour mieux définir les Tregs tels que GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related protein)(Shimizu et al., 2002), CTLA-4 (Takahashi et al., 2000), CD62L (Szanya et al., 2002), CD103 ($\alpha\beta$ Integrin) et LAG-3 (Huang et al., 2004). L'expression de ces marqueurs n'est cependant pas spécifique et est modifiée après activation, rendant alors impossible la distinction entre les Tregs et les LTs conventionnels. L'utilisation de CD127 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-7) couplé au marqueur CD25 (CD127^{low}CD25^{high}) permet une meilleure discrimination des Tregs par rapport aux cellules activées (Liu et al., 2006). Une avancée majeure dans la biologie des Tregs a été la découverte de l'expression constitutive du facteur de transcription FoxP3 (forkhead box P3), nécessaire pour leur développement, leur identité et leur fonction (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). La mutation du gène FoxP3 entraîne un désordre lymphoprolifératif chez la souris (Brunkow et al., 2001) et un syndrome IPEX (Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X linked), associant déficit immunitaire et

MAIs chez l'Homme (Bacchetta et al., 2006). Le gène Foxp3 reste aujourd'hui un des marqueurs les plus fiables pour identifier les Tregs CD4⁺, même si chez l'Homme, son expression peut augmenter de façon transitoire dans les LTs activés sans pour autant leur conférer des fonctions régulatrices (Morgan et al., 2005). Les marqueurs Helios et Nrp-1 (neuropilin-1) ont été proposés pour distinguer les nTregs des Tregs induites en périphérie (Thornton et al., 2010; Yadav et al., 2012). Cependant, ils reflèteraient surtout différents états d'activation des deux types cellulaires et leur fiabilité est remise en question (Akimova et al., 2011). En revanche, la spécificité du TCR distingue les nTregs des iTregs (Lee et al., 2012). Les nTregs sont sélectionnées positivement dans le thymus pour des antigènes du soi, notamment les TSAs, et sont susceptibles de rencontrer une source constante de leur antigène spécifique en périphérie. Cette présence continue de l'antigène pourrait expliquer leur expression constitutive de molécules considérées comme des marqueurs d'activation chez les non-Tregs tels CD25, GITR et CTLA-4 et jouerait un rôle dans leur longévité et stabilité. Au contraire, les iTregs sont dérivées de LTs naïfs sélectionnés dans le thymus, ayant une faible affinité pour les antigènes du soi et une affinité plus forte pour les antigènes étrangers, qui induisent leur développement en périphérie. Une fois l'antigène étranger éliminé, par exemple lors du rejet d'allogreffe, les iTregs peuvent manquer d'une stimulation suffisante de leur TCR pour leur maintien continu ou leur stabilité.

Les mécanismes à l'origine de l'induction de Tregs en périphérie *in vivo* et *in vitro* sont nombreux (Schmitt and Williams, 2013). Ainsi, chez la souris, la conversion *in vitro* de LTs CD4⁺CD25⁻ naïfs des OLS et du sang périphérique en Tregs CD25⁺FoxP3⁺ requiert la présence de TGF-β1 et d'IL-2 (Chen et al., 2003; Davidson et al., 2007). D'autres études montrent le développement de iTregs *in vivo* dans des conditions tolérogènes ou durant une inflammation chronique, de type asthme (Weiss et al., 2012) ou colite (Haribhai et al., 2009). L'absence d'une costimulation optimale accompagnant la rencontre avec l'antigène favorise l'induction de iTregs, notamment dans les cas d'infusion d'antigènes par des mini-pompes osmotiques (Apostolou and von Boehmer, 2004) ou des injections intraveineuses (Thorstenson and Khoruts, 2001), ou par administration d'anticorps bloquants anti-CD4 (Cobbold et al., 2004). Dans des modèles murins d'allotransplantation, les iTregs sont générées par le traitement du receveur avec une DST en combinaison avec un anticorps anti-CD4 non déplétant (Kingsley et al., 2002) ou des anti-CD40L (Burrell and Bromberg, 2012). Alors qu'une forte costimulation de CD28 ou le blocage de CTLA-4 empêchent l'induction de FoxP3 *de novo*, la signalisation via PDL-1 supporte l'induction et le maintien des iTregs chez

la souris (Francisco et al., 2009). Enfin, de faibles doses de ligands de forte affinité favorisent l'expression de FoxP3 dans les LTs CD4⁺ conventionnels (Gottschalk et al., 2010; Kretschmer et al., 2005). Le microenvironnement et les conditions de la présentation antigénique influent donc largement sur l'induction de Tregs *in vivo*.

Plusieurs mécanismes moléculaires de suppression par les Tregs ont été identifiés et se classent en trois grandes catégories : la suppression induite par contact cellulaire, les perturbations métaboliques, et la sécrétion de cytokines inhibitrices (**Figure 21**).

La suppression par **contact cellulaire** s'effectue par l'intermédiaire des molécules CTLA-4 et LAG-3 exprimées par les Tregs, qui modulent les capacités immunostimulatrices des DCs (**Figure 21.1**). La liaison de CTLA-4 à B7 permet notamment de diminuer l'expression de CD80-86 par les CPAs (Wing et al., 2008) et de moduler le catabolisme du tryptophane par surexpression d'IDO dans les DCs (Mellor et al., 2004). IDO est une enzyme qui permet la dégradation du tryptophane et entraîne la production de métabolites pro-apoptotiques induisant la suppression des LTs effecteurs (Fallarino et al., 2003). Par ailleurs, l'interaction LAG3/CMH-II inhibe la maturation des DCs, empêchant ainsi l'activation des LTs (Liang et al., 2008). De plus, les Tregs induisent l'apoptose des cellules effectrices par cytolysse via un contact cellulaire et la sécrétion de molécules cytotoxiques telles que les granzymes B, de façon dépendante ou non de la perforine (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004). La voie PD-1/PD-L1 est également utilisée par les Tregs pour exercer leur fonction suppressive, en induisant notamment l'apoptose des LBs autoréactifs (Gotot et al., 2012).

La suppression par **perturbations métaboliques** consiste à modifier l'environnement biochimique ou cytokinique extracellulaire ou parfois intracellulaire, le rendant délétère pour les cellules cibles. Certaines études ont mis en évidence l'implication de l'ATP (adénosine triphosphate) et de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) dans la fonction suppressive des Tregs (**Figure 21.2**). L'AMPc est un puissant inhibiteur de la prolifération cellulaire et de la synthèse d'IL-2 par les LTs. L'étude de Bopp a ainsi mis en évidence le transport intercellulaire du facteur suppressif AMPc des Tregs vers les cellules effectrices à travers les jonctions GAP (Bopp et al., 2007) formées entre les deux types cellulaires. Par ailleurs, les ectoenzymes CD39 et CD73 des Tregs de souris sont capables de convertir l'ATP inflammatoire extracellulaire (relarguée lors de dommages cellulaires) en AMP puis en adénosine anti-inflammatoire, qui se lie au récepteur à l'adénosine A2A des LTs effecteurs et augmente l'AMPc intracellulaire inhibant leur fonction (Deaglio et al., 2007). Une étude chez l'Homme a notamment mis en évidence la diminution d'une population de Tregs

Foxp3⁺CD39⁺ chez des patients en phase de rechute de sclérose multiple, suggérant l'importance de ces cellules dans le contrôle des MAIs chez l'Homme (Borsellino et al., 2007). Enfin, les Tregs peuvent induire l'apoptose des LTs effecteurs par compétition pour la consommation d'IL-2, en les privant de leur facteur de croissance (Pandiyan et al., 2007; de la Rosa et al., 2004).

Par ailleurs, les **cytokines immunosuppressives** IL-10 (Asseman et al., 1999), TGF- β et IL-35 ont été impliquées dans la fonction suppressive des Tregs (**Figure 21.3**). Le rôle de l'IL-10 dans la régulation par les Tregs a été mis en évidence dans différents modèles murins d'autoimmunité, d'infection, de transplantation et d'inflammation (Sakaguchi, 2004). L'IL-10 est particulièrement importante pour la fonction des Tregs aux interfaces avec l'environnement (colon, poumon, peau)(Rubtsov et al., 2008) et contrôle les Th17 et une population unique de profil Th1+Th17 dans un modèle de colite intestinale (Huber et al., 2011). Chez la souris, le TGF- β sécrété par les Tregs inhibe la prolifération des LTs effecteurs activés et induit la génération *de novo* de LTs CD4⁺FoxP3⁺ à partir de précurseurs naïfs, phénomène qualifié de tolérance infectieuse (Andersson et al., 2008). De façon similaire, les Tregs sécrètent constitutivement la cytokine hétérodimérique Ebi3-IL-12 α , appelée IL-35, qui inhibe la prolifération des LTs effecteurs (Collison et al., 2007). En son absence, les Tregs sont inefficaces à endiguer la prolifération homéostatique de LTs transférés dans un animal immunodéficient et à protéger du développement de la colite. De plus, le traitement de LTs naïfs murins et humains avec l'IL-35 induit une population de Tregs qui exercent leur suppression via l'IL-35, indépendamment de l'IL-10 et du TGF- β , et sont capables de tolérance infectieuse *in vitro* et *in vivo* (Collison et al., 2010). Enfin, la production d'IL-35 par des Tregs ICOS⁺ inhibe la production d'IL-17 et l'allergie des voies aériennes déjà établie chez la souris (Whitehead et al., 2012).

Plus généralement, les Tregs CD4⁺CD25⁺ sont impliquées dans l'induction et/ou le maintien de la tolérance en transplantation, en agissant sur de multiples effecteurs du rejet. Dans un modèle murin transgénique de greffe de peau, les Tregs inhibent l'activation des LTs CD8⁺ naïfs effecteurs dans les ganglions drainant la greffe puis, plus tardivement, empêchent la génération de LTs CD8⁺ mémoires spécifiques du donneur dans le greffon (Carvalho-Gaspar et al., 2008). De plus, les Tregs peuvent inhiber la fonction lytique des CTLs (Mempel et al., 2006), la réaction DTH, l'activation des CEs et le recrutement des leucocytes durant l'inflammation (Maganto-García et al., 2011). Les Tregs localisées dans les centres germinatifs chez la souris et l'Homme peuvent réguler l'immunité humorale, en inhibant la

maturation de l'affinité des anticorps et la différenciation en plasmocytes (Chung et al., 2011). Enfin, les Tregs suppriment un large panel de réponses immunitaires à travers la suppression « bystander » non spécifique (Karim et al., 2005), indépendante de l'antigène, et maintiennent un état d'immunosuppression stable à travers la tolérance infectieuse (Andersson et al., 2008; Qin et al., 1993). Par ce biais, les Tregs expandent leur capacité suppressive et favorisent le développement de iTregs de spécificité antigénique distincte.

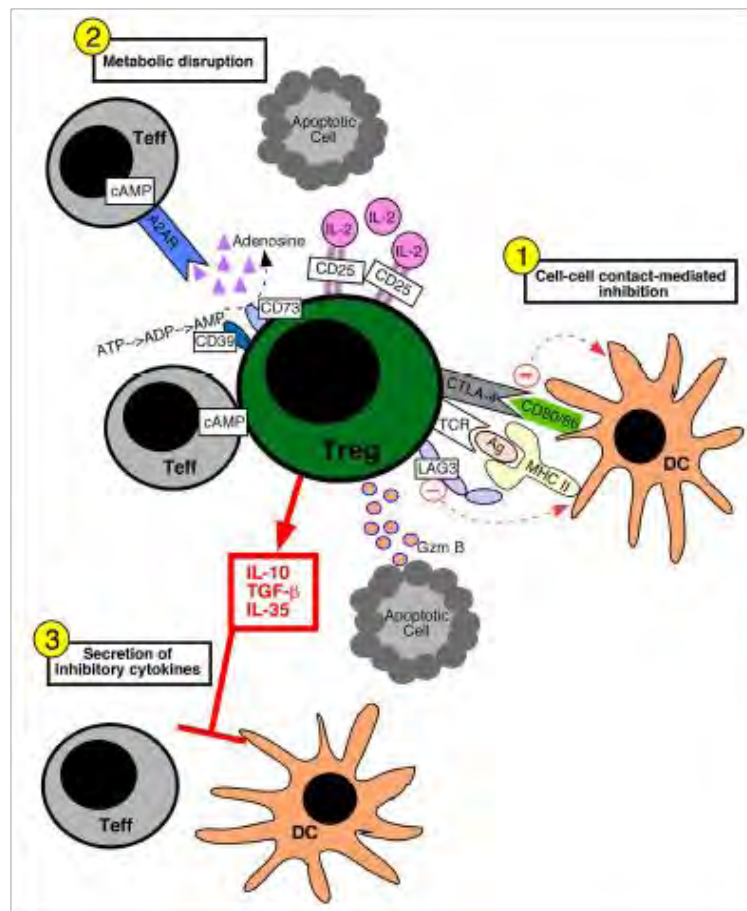


Figure 21 : Mécanismes de suppression par les Tregs $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$.
D'après (Schmitt and Williams, 2013).

De la même manière que pour le maintien de la tolérance envers les antigènes non pathogènes qui permet d'éviter les réponses auto-immunes, la balance entre les Tregs et les LTs effecteurs en transplantation va influencer le devenir du greffon vers le rejet ou la tolérance. Chez un receveur d'allogreffe, la présence de nTregs n'est pas suffisante pour inhiber l'action des LTs alloréactifs et éviter le rejet. L'induction de tolérance requiert donc l'expansion des nTregs et/ou l'induction de iTregs avant la transplantation. Un sous-type ou les deux sous-types de Tregs sont également nécessaires au maintien de la tolérance. L'importance des Tregs dans ces phénomènes a été mise en évidence dans de nombreux modèles animaux (Feng et al., 2008; Francis et al., 2011; Golshayan et al., 2007; Graca et al.,

2002a, 2002b; Tsang et al., 2009). Chez l'homme, le rôle des Tregs en transplantation n'est pas encore clairement établi, bien que l'étude des patients dits "opérationnellement tolérants" permette à présent de mieux le caractériser. Ces patients possèdent une fonction stable du greffon, bien qu'ils ne soient plus sous immunosuppression suite à un arrêt de traitement. Certaines études suggèrent que la présence de Tregs serait associée à la tolérance et pourrait éventuellement servir de biomarqueur pour prédire le risque de rejet et identifier les patients tolérants. Ainsi, plusieurs études ont détecté une augmentation de la proportion de Tregs $CD4^+FoxP3^+$ par rapport aux LTs $CD4^+$ totaux, et une augmentation de leur nombre absolu, dans le sang périphérique de patients tolérant leur greffe de foie, par rapport aux patients stables sous immunosuppression, à des volontaires sains ou à des patients en phase de rejet (Li et al., 2004; Martínez-Llordella et al., 2007; Pons et al., 2008). De plus, les patients transplantés rénaux opérationnellement tolérants possèdent un profil d'expression de gènes associés aux Tregs tels que Foxp3, le TGF- β et son récepteur (Moraes-Vieira et al., 2012). Enfin, d'après une étude de notre laboratoire, les patients en rejet chronique possèdent moins de Tregs $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ que les patients tolérants ou les volontaires sains, suggérant que le maintien du nombre de Tregs en périphérie est important pour la tolérance (Braudeau et al., 2007).

Toutefois, certains patients ne présentent pas d'augmentation de Tregs dans le sang périphérique mais une accumulation principalement dans l'organe greffé. Shan et al ont récemment compilé 20 études cliniques corrélant la présence de Tregs humaines avec l'issue de greffes de foie, de cœur, de poumon et de rein (Shan et al., 2011). Des niveaux élevés de Tregs dans le greffon, détectés par l'augmentation relative de cellules $FoxP3^+$ ou de l'ARNm, sont généralement positivement corrélés avec une meilleure fonction de la greffe, alors que le nombre de Tregs circulant, plus aisément analysable, ne corrèle pas systématiquement avec le résultat de la transplantation. De même, l'étude de Bestard a montré que les patients transplantés rénaux, ne répondant quasiment pas contre leur donneur après transplantation, présentent un nombre plus élevé de Tregs $CD4^+FoxP3^+$ au sein de l'allogreffe en comparaison aux patients toujours alloréactifs (Bestard et al., 2007). Enfin, des niveaux élevés d'ARNm $FoxP3^+$ ont été détectés dans les biopsies d'allogreffes de patients opérationnellement tolérants ayant reçu une greffe combinée de moelle osseuse et de rein (Kawai et al., 2008). Le recrutement des Tregs au sein du greffon joue donc un rôle important dans le contrôle du rejet (Taflin et al., 2010) et l'induction de tolérance mais son étude nécessite une biopsie de l'organe greffé.

3.3.1.1.2 Les Tregs CD4⁺HLA-DR⁺

Chez l'Homme, Jonuleit et collègues ont montré l'expression de la molécule du CMH-II, HLA-DR, par les nTregs CD4⁺CD25⁺ et sa surexpression après activation (Jonuleit et al., 2001). La molécule HLA-DR identifie une population de nTregs CD4⁺CD25^{high} mature fonctionnellement très active (Baecher-Allan et al., 2006). La population de Tregs HLA-DR⁺ représente environ 30% du pool de Tregs CD4⁺CD25^{high}CD62L^{high}. Fonctionnellement, en condition de stimulation polyclonale anti-CD3/anti-CD28, les Tregs HLA-DR⁺ surexpriment fortement FoxP3 et inhibent précocement et par contact la prolifération des LTs CD4⁺ et la sécrétion d'IFN γ , d'IL-4 et d'IL-10, alors que les Tregs DR⁻ exercent une suppression plus tardive corrélant avec l'induction de FoxP3, via le contact ou la sécrétion d'IL-10, et n'inhibent pas la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 (Baecher-Allan et al., 2006). L'activité régulatrice des Tregs HLA-DR⁺ est modulée par les LTs CD4⁺ répondeurs fortement activés qui induisent l'apoptose des Tregs via la sécrétion de granzyme B (Ashley and Baecher-Allan, 2009). D'après une autre étude, le blocage de la molécule du CMH-II sur les nTregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, activées préalablement par des mo-DCs allogéniques, abroge leur capacité à inhiber la prolifération de LTs CD4⁺ effecteurs stimulés polyclonalement, suggérant un rôle potentiel de la molécule du CMH-II dans le contact avec les LTs effecteurs et la fonction des Tregs (Peiser et al., 2007).

Les Tregs CD4⁺CD127^{low/-}CD25⁺FoxP3⁺HLA-DR⁺ sont impliquées dans l'accouchement prématuré lors d'une grossesse et dans le rejet aigu de greffe de rein (Kisielewicz et al., 2010). Dans ces deux situations, le niveau d'expression de HLA-DR (Mean Fluorescence Intensity) parmi les Tregs FoxP3⁺HLA-DR⁺ diminue fortement, suggérant une élimination des Tregs HLA-DR^{high+} de la circulation, conduisant alors à une baisse de l'activité suppressive globale du pool de Tregs CD4⁺CD127^{low/-}CD25⁺FoxP3⁺, en comparaison aux grossesses normales et aux transplantés stables. Une autre étude du même groupe a analysé les différences dans la composition du pool total de Tregs CD4⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺ (selon les marqueurs HLA-DR et CD45RA) entre des patients greffés rénaux stables et des patients en rejet. Ils ont ainsi démontré la disparition de la population de Tregs HLA-DR^{high+}CD45RA⁻ chez les patients en rejet aigu, causant une diminution de l'activité suppressive du pool total de Tregs, et pouvant constituer un outil prédictif du rejet de greffe (Schaier et al., 2012). En effet, la détermination de la MFI HLA-DR des Tregs HLA-DR⁺ du sang permet une discrimination sensible, spécifique et non-invasive entre les patients rejetant ou non leur greffe rénale (Schaier et al., 2013). Ce même groupe a également montré que le

traitement des patients en rejet aigu avec la méthylprednisolone induit une augmentation temporaire du pourcentage des Tregs HLA-DR^{high}CD45RA⁻ (Seissler et al., 2012).

Chez le rat et dans notre modèle de transplantation cardiaque associée à un traitement AdCD40Ig, environ 30% des Tregs CD8⁺CD40Ig expriment la molécule du CMH-II RT1.B, qui identifie une sous-population phénotypiquement distincte et capable de transférer la tolérance (résultats non publiés).

3.3.1.1.3 Les cellules Tr1

Les cellules **Tr1** sont une population de Tregs induites en périphérie qui se développent en présence d'IL-10 et régulent les réponses effectrices à travers la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β (Battaglia et al., 2006a) ou via la cytotoxicité dépendante de granzyme B et perforine (Magnani et al., 2011). L'induction *in vivo* de cellules Tr1 par une combinaison d'IL-10 et de rapamycine chez la souris permet d'établir une tolérance spécifique à long terme à une allogreffe d'îlots pancréatiques (Battaglia et al., 2006b). Des études cliniques de thérapie cellulaire utilisant les Tr1 pour la prévention de la GvHD sont actuellement en cours en Italie, avec des premiers résultats encourageants (Battaglia and Roncarolo, 2011a; Roncarolo and Battaglia, 2007).

3.3.1.2 Les Tregs CD8⁺

Les Tregs CD8⁺ jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie immune et sont impliquées dans le contrôle d'un large panel de réponses immunes telles que l'immunité intestinale, l'autoimmunité, le privilège immunitaire de l'œil, la tolérance orale, la prévention de la GvHD et du rejet de greffe (Pomié et al., 2008). Grâce aux études phénotypiques et fonctionnelles récentes, plusieurs populations de Tregs CD8⁺ se distinguent chez la souris, le rat et l'Homme.

3.3.1.2.1 Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low}

Le **CD45** (ou LCA pour Leucocyte common antigen) est une tyrosine phosphatase transmembranaire, essentielle pour la signalisation par les récepteurs TCR et BCR après reconnaissance antigénique (Hermiston et al., 2003). Le CD45 régule notamment les kinases Src nécessaires à la transduction des signaux. Plusieurs isoformes du CD45 peuvent être générées par l'épissage alternatif de trois exons, conduisant à des changements dans le domaine extracellulaire de la molécule : les isoformes ABC, AB, BC, B et O, reconnues par

des anticorps dirigés contre les domaines CD45RA (clone OX33), CD45RB, CD45RC (clone OX22) et CD45RO (Figure 22).

L'expression des différentes isoformes du CD45 par un LT évolue lors de son activation (Birkeland et al., 1989) et permet de dissocier les LTs naïfs des LTs mémoires. En effet, de façon générale, les LTs naïfs expriment les isoformes les plus longues et sont généralement positifs pour CD45RA alors que les LTs activés et mémoires expriment l'isoforme la plus courte, CD45RO, facilitant l'activation T.

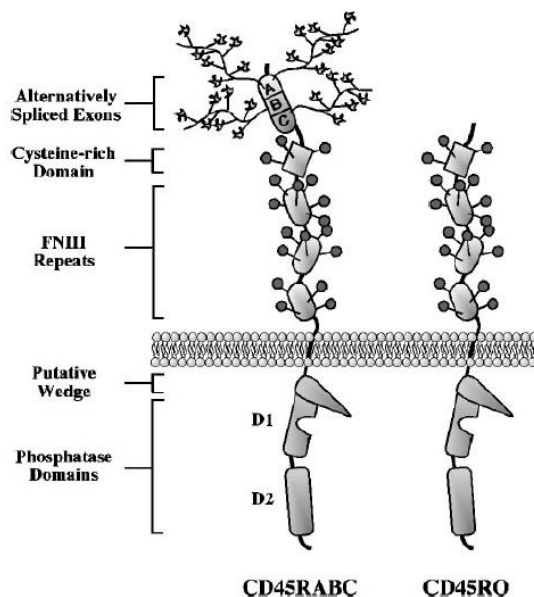


Figure 22 : Représentation schématique des isoformes CD45RABC et CD45RO.
D'après (Hermiston et al., 2003).

Chez le rat, le niveau d'expression de l'isoforme CD45RC divise les LTs CD4⁺ et CD8⁺ en deux populations distinctes, aux caractéristiques différentes. De même, chez l'Homme, son niveau d'expression distingue deux populations parmi les LTs CD4⁺ et trois populations parmi les LTs CD8⁺. Chez le rat, les LTs CD45RC^{high} produisent préférentiellement des cytokines de type Th1 (IFN γ , IL-2) alors que la production de cytokines anti-inflammatoires de type Th2 (IL-4, IL-13, IL-10) est restreinte aux LTs CD45RC^{low} (Subra et al., 2001; Xystrakis et al., 2004a). Au sein des LTs CD4⁺ et des LTs CD8⁺, la proportion relative des populations CD45RC^{low} ou CD45RC^{high} varie entre les souches de rats et est génétiquement contrôlée par les mêmes régions chromosomiques que celles influençant la susceptibilité aux MAIs (Fournié et al., 2001; Subra et al., 2001). Les LTs CD45RC^{low} sont prépondérants chez les rats Brown Norway, susceptibles aux MAIs de type Th2 alors que LTs CD45RC^{high} sont majoritaires chez les rats LEWIS (LEW), susceptibles aux MAIs à réponse Th1.

Les **LTs CD4⁺CD45RC^{low}** sont impliqués dans les maladies inflammatoires. Chez l'Homme, l'équipe de Saoudi a montré que les patients atteints de vasculite associée à ANCA en rémission présentent une augmentation de la proportion des LTs CD4⁺CD45RC^{low} comparés aux patients atteints de lupus érythémateux systémique ou aux individus sains (Ordonez et al., 2009). Chez le rat, les LTs CD4⁺CD45RC^{low} préviennent du diabète autoimmun (Fowell and Mason, 1993). De plus, dans un modèle d'arthrite, le traitement avec un anticorps superagoniste anti-CD28 induit une diminution du ratio CD4⁺CD45RC^{high}/CD4⁺CD45RC^{low} dans le sang et protège de la maladie (Rodríguez-Palmero et al., 2006). En transplantation, les LTs CD4⁺CD45RC^{low} ont été associés à la tolérance. La tolérance spécifique à l'allogreffe cardiaque chez le rat LEWIS.1A induite par la DST corrèle avec la diminution de la population CD4⁺CD45RC^{high} dans le greffon (Josien et al., 1995). De plus, Xystrakis et al. ont montré que les LTs CD4⁺CD45RC^{high} peuvent induire une GvHD aiguë et chronique contrairement aux LTs CD4⁺CD45RC^{low} (Xystrakis et al., 2004b). Toutefois, ces dernières ne sont pas efficaces pour prévenir de la GvHD.

Les réelles propriétés régulatrices des LTs CD45RC^{low} ont été décrites dans le compartiment CD8⁺ chez le rat par Xystrakis et collègues en 2004 (Xystrakis et al., 2004c). Ils ont décrit une population de **nTregs CD8⁺CD45RC^{low}** chez le rat LEW, présentant une plus forte expression d'ARNm FoxP3 et CTLA-4 que les LTs CD8⁺CD45RC^{high}, et produisant de l'IL-4, IL-10 et IL-13 après stimulation *in vitro*. D'après une autre étude de Han et collègues, 2.6% seulement des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} d'animaux LEW naïfs expriment la protéine FoxP3 (Han et al., 2007). Chez l'Homme, l'analyse de l'expression du marqueur CD45 chez des individus sains permet d'identifier trois sous-populations : CD8⁺CD45RC^{low}, CD8⁺CD45RC^{int} et CD8⁺CD45RC^{high}, dont les proportions sont très variables selon les individus (Ordonez et al., 2009, 2013). Les sous-types CD45RC^{high} et ^{int} contiennent une majorité de cellules naïves CD45RA⁺RO⁻CCR7⁺ alors que les CD45RC^{low} contiennent majoritairement des cellules mémoires effectrices CD45RA⁻RO⁺CCR7⁻ ou centrales CD45RA⁻RO⁺CCR7⁺. Après stimulation allogénique *in vitro*, les LTs CD8⁺CD45RC^{low} produisent les plus fortes quantités d'IL-17, IL-4, IL-5 et IL-10 alors que les LTs CD8⁺CD45RC^{int} ont une production intermédiaire des mêmes cytokines et d'IFN γ (Ordonez et al., 2013).

Fonctionnellement, les mécanismes de suppression des nTregs CD8⁺CD45RC^{low} *in vitro* sont peu décrits. Ils inhibent la sécrétion d'IFN γ et la prolifération des LTs CD8⁺CD45RC^{high} naïfs syngéniques en coculture avec des splénocytes semi-allogéniques

déplétés en LTs (Xystrakis et al., 2004c). Des expériences de blocage des cytokines IL-4, IL-10 et TGF- β avec des anticorps neutralisants et de coculture en transwell suggèrent un mécanisme de suppression dépendant d'un contact cellulaire et non par la sécrétion de facteurs solubles. De plus, l'existence d'un mécanisme de cytotoxicité a été écartée. *In vivo*, le transfert de nTregs CD8⁺CD45RC^{low} inhibe la GvHD induite par le transfert de LTs CD4⁺ (Xystrakis et al., 2004c). De même, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} sont associées à la rémission des rats atteints d'uvéite auto-immune expérimentale, par comparaison aux rats atteints de la forme récurrente, et peuvent prévenir de la maladie (Han et al., 2007).

Notre équipe a par ailleurs décrit une population de **Tregs CD8⁺CD45RC^{low}** (appelées Tregs CD8⁺CD40Ig), induites *in vivo* par la transplantation et le blocage de l'interaction CD40/CD40L avec un AdCD40Ig. Les Tregs CD8⁺CD40Ig présentent une augmentation de l'expression des transcrits GITR, TGF- β , IL-2, CD25 par rapport aux nTregs CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonnet et al., 2007a). Parmi les deux populations, environ 40% expriment CD62L, 20% expriment CD161 et CD28 et moins de 10% expriment CD25, OX40, CD103, CD122. De plus, 30% des Tregs CD8⁺CD40Ig expriment la molécule du CMH-II RT1B (appelé CMH-II pour plus de clarté par la suite). Enfin, environ 36% des Tregs CD8⁺CD40Ig sécrètent de l'IFN γ après stimulation. L'étude du répertoire TCR des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} de la rate par Immunoscope révèle un répertoire naïf polyclonal et non biaisé alors que les Tregs CD8⁺CD40Ig présentent un répertoire altéré pour la chaîne V β 11 du TCR, avec un pic à la même longueur de CDR3 (9 AAs) pour les quatre animaux étudiés. La quantification relative des transcrits V β 11 dans la rate montre une accumulation onze fois plus importante chez les Tregs CD8⁺CD40Ig que chez les nTregs CD8⁺CD45RC^{low}. Par ailleurs, l'analyse Immunoscope des Tregs infiltrant le greffon démontre un biais du répertoire et une surexpression des transcrits pour les chaînes V β 11 et V β 18 du TCR (Picarda et al, en révision). Une analyse plus fine du répertoire par séquençage de la région CDR3 a mis en évidence un répertoire de type privé pour les chaînes V β 11 et V β 18 du TCR (Picarda et al, en révision).

Fonctionnellement, les Tregs CD8⁺CD40Ig induisent *in vitro* l'expression d'IDO par les CEs du donneur via leur sécrétion d'IFN γ (Guillonnet et al., 2007a). Elles inhibent plus efficacement *in vitro* la prolifération de LTs CD4⁺ effecteurs, stimulés par des pDCs allogéniques, que les nTregs CD8⁺CD45RC^{low}. Des expériences de culture en système de transwell montrent l'existence de mécanismes de suppression à la fois à distance impliquant IDO, et dépendants d'un contact cellulaire impliquant l'IFN γ et FGL2 (Li et al., 2010)(Bézie,

Picarda et al., en révision). L'IL-34 sécrétée par les Tregs CD8⁺CD40Ig est également impliquée dans leur fonction suppressive (Bézie, Picarda et al., en préparation). De plus, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} semblent capables de cytotoxicité lors d'une stimulation allogénique par les pDCs (Picarda et al., résultats non publiés). *In vivo*, la génération de Tregs CD8⁺CD40Ig par la combinaison du traitement CD40Ig et de la transplantation induit une survie à long-terme de l'allogreffe cardiaque (Guillonnet et al., 2007a). De plus, les Tregs CD8⁺CD40Ig sont capables de transférer itérativement et jusqu'à quatre fois la tolérance par transfert adoptif chez des receveurs secondaires naïfs irradiés. Plus précisément, le transfert des Tregs CD8⁺CD40IgCMH-II⁺ induit une survie à long terme, suggérant un rôle crucial de cette sous-population dans l'activité des Tregs (résultats non publiés). Le transfert des Tregs CD8⁺CD40Ig augmente l'expression d'IFN γ et d'IDO dans le greffon des receveurs, et le blocage de chacune de ces molécules abroge la prolongation de survie du greffon après transfert adoptif (Guillonnet et al., 2007a). La greffe d'un coeur tierce-partie de type BN, d'haplotype du CMH différent, à un receveur primaire déjà greffé ou à un receveur secondaire transféré adoptivement avec les Tregs CD8⁺CD40Ig, est rejetée, indiquant l'existence d'une tolérance spécifique du donneur dans notre modèle. De plus, le traitement combiné AdCD40Ig et anticorps anti-CMH-I induit un rejet de greffe (Guillonnet et al., 2007a). La génération de Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du donneur requiert donc une interaction du TCR avec un complexe CMH-I. Par ailleurs, les Tregs CD8⁺CD40Ig peuvent être stimulées *in vitro* par la voie directe ou indirecte d'alloreconnaissance des alloantigènes respectivement sur les pDCs allogéniques ou syngéniques chargées avec un lysat de coeur du donneur (Li et al., 2010). Nous avons analysé la spécificité antigénique fine des Tregs CD8⁺CD40Ig, en testant *in vitro* une librairie d'allopeptides dérivés des molécules du CMH du donneur (Picarda et al., 2011)(Picarda et al., en révision).

Les données accumulées sur d'autres populations de Tregs CD8⁺, récemment décrites chez le rat, la souris et l'Homme dans des modèles d'auto-immunité, de cancer, d'infection et de transplantation, participent à la compréhension des mécanismes d'action, de l'importance de la spécificité antigénique, et du potentiel des Tregs CD8⁺, en particulier les Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, en transplantation d'organes solides (Guillonnet et al., 2010).

3.3.1.2.2 Les Tregs CD8⁺CD28⁻

Chez l'Homme, les Tregs CD8⁺CD28⁻ peuvent être générés *in vitro* via la stimulation de cellules mononuclées du sang périphérique par des peptides synthétiques ou des protéines solubles (Jiang et al., 1998b), via plusieurs cycles de stimulation par des CPAs allogéniques

(Liu et al., 1998), possiblement combinées aux cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 (Yu et al., 2011) ou via la stimulation par des CPAs xénogéniques (Ciubotariu et al., 1998). Chez l'Homme, ces Tregs expriment Foxp3, GITR, CTLA-4, CD62L (Scotto et al., 2004), elles sont restreintes aux molécules du CMH-I (Liu et al., 1998), sont spécifiques d'antigènes et expriment un TCR V β biaisé (Ciubotariu et al., 1998; Jiang et al., 1998b). Toutefois, une étude récente a remis en question l'expression de FoxP3 par les Tregs CD8⁺CD28⁻ de patients transplantés rénaux (Korecka-Polak et al., 2011). A l'aide d'un modèle murin transgénique pour le TCR, Renner et collègues ont montré que la reconnaissance spécifique de l'antigène par le TCR des Tregs CD8⁺CD28⁻ améliore la fonction suppressive de ces cellules (Renner et al., 2010). De plus, chez la souris, les nTregs CD8⁺CD28⁻ agissent potentiellement à travers la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β pour prévenir du développement de la colite (Ménager-Marcq et al., 2006).

Les Tregs CD8⁺CD28⁻ inhibent la surexpression de CD80-86 (Liu et al., 1998) et CD40 (Jiang et al., 1998b) par les CPAs, de CD40L par les Th (Ciubotariu et al., 1998) et induisent la surexpression des récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 (Immunoglobulin-Like Transcript 3 & 4) sur les DCs, les monocytes et les CEs (Chang et al., 2002; Manavalan et al., 2004). Les CPAs deviennent alors tolérogènes et inhibent l'activation des LTs CD4⁺ effecteurs spécifiques d'antigène et peuvent convertir les LTs CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ anergiques en Tregs (Manavalan et al., 2003).

Les Tregs CD8⁺CD28⁻ sont associées à la tolérance en transplantation. Chez la souris, l'infusion continue d'un peptide mâle HY à l'aide de mini pompes osmotiques chez une souris femelle induit un délai significatif du rejet de greffe de peau mâle à travers la génération de Tregs CD8⁺CD28⁻ (Sireci et al., 2009). Chez le rat, le traitement d'animaux naïfs avec la DST induit des Tregs CD8⁺CD28⁻ qui inhibent le rejet aigu après transfert adoptif chez un receveur de greffe de foie allogénique (Liu et al., 2007). De même, Wang et al. ont montré que la vaccination avec des cellules T active fortement les Tregs CD8⁺CD28⁻ dont le transfert adoptif inhibe le rejet de xéno greffe de cornée chez le rat (Wang et al., 2008). Chez l'Homme, les Tregs CD8⁺CD28⁻ sont présentes dans la circulation de patients greffés cardiaques (Colovai et al., 2003; Manavalan et al., 2004). Par ailleurs, les patients transplantés rénaux en phase aiguë de rejet possèdent moins de Tregs CD8⁺CD28⁻FoxP3⁺ que les patients ne rejetant pas leur greffe (Karczewski et al., 2010). Enfin, d'après une étude de notre laboratoire, les LTs CD8⁺CD28⁻ sont caractérisés par une forte expression de granzyme A et de perforine et ont un profil plutôt cytotoxique que suppressiveur chez des patients greffés rénaux en rejet chronique (Baeten et al., 2006).

3.3.1.2.3 Les Tregs CD8 $\alpha\alpha^+$

Les Tregs CD8 $\alpha\alpha^+$ sont probablement la population de nTregs CD8 $^+$ la mieux caractérisée (Lu and Cantor, 2008). Ces cellules expriment un TCR hétérodimérique $\alpha\beta$ et une molécule de CD8 homodimérique $\alpha\alpha$. Elles interagissent avec la molécule du CMH de classe Ib non classique Qa-1, qui est l'équivalent de HLA-E chez l'Homme et de RTBM-1 chez le rat. Qa-1 présente deux peptides dominants : un peptide Qdm dérivé de la séquence signal des CMH de classe Ia (Aldrich et al., 1992), et un peptide Hsp60_{p216} dérivé de la protéine Hsp60 (associée aux infections et à l'inflammation)(Davies et al., 2003). De plus, des peptides additionnels se liant à Qa-1 ont été décrits, incluant un peptide dérivé de la préproinsuline, des peptides dérivés de bactéries et des peptides dérivés de séquences V β du TCR (Jiang et al., 1995, 1998a; Tang et al., 2006b). Qa-1 est principalement exprimé sur les LTs activés, les LBs et les DCs, et lie deux récepteurs avec des fonctions opposées. L'engagement du TCR par le complexe Qa-1/peptide conduit à l'activation et l'expansion de LTs CD8 $^+$ spécifiques d'antigènes, alors que l'engagement du récepteur CD94/NKG2A exprimé par les LTs CD8 $^+$, les NKs et NKTs par le ligand Qa-1/Qdm inhibe l'activité de ces cellules. Les LTs CD8 $\alpha\alpha^+$ n'expriment pas FoxP3, ils surexpriment les récepteurs inhibiteurs des NKs et LAG3 (Denning et al., 2007), sécrètent des cytokines de type Th1 hormis l'IL-2 (Tang et al., 2006b), sécrètent plus de FGL2 et de TGF- β que les LTs CD8 $\alpha\beta^+$ (Denning et al., 2007) et expriment majoritairement le TCR V β 6 (Tang et al., 2007). Le groupe de Kumar a récemment analysé le profil global d'expression de gènes de ces Tregs CD8 $\alpha\alpha^+$ (Fanchiang et al., 2012). Elles possèdent une signature liée à l'immunité innée, surexpriment CD200, des récepteurs des NKs (Ly49, DAP12) et des molécules de la superfamille du TNF.

Chez la souris, les Tregs CD8 $\alpha\alpha^+$ contrôlent l'EAE en induisant l'apoptose des LTs CD4 $^+$ pathogéniques après la reconnaissance du complexe Qa-1/[peptide dérivé du TCR] à leur surface (Smith and Kumar, 2008; Tang et al., 2006b, 2007). Elles sont également impliquées dans le contrôle de la kératite stromale et du diabète autoimmun (Panoutsakopoulou et al., 2004). La cytotoxicité exercée par ces Tregs est dépendante de l'IFN γ et de la perforine (Beeston et al., 2010; Lu et al., 2008). Dans un modèle murin d'arthrite autoimmune, le groupe de Cantor a récemment décrit l'inhibition du développement de la maladie par les Tregs CD8 $\alpha\alpha^+$ spécifiques du complexe Qa-1/Hsp60_{p216}, mais pas du complexe Qa-1/Qdm (Leavenworth et al., 2013). Dans cette étude, les Tregs éliminent efficacement les Tfh et Th17 pathogéniques, responsables des réponses inflammatoires et humorales observées, par une voie dépendante de la perforine. L'immunisation *in vivo* avec

des DCs chargées avec Hsp60_{p216} induit l'expansion de Tregs CD8⁺ spécifiques qui empêchent efficacement le développement de l'arthrite. Enfin, le transfert *in vivo* de Tregs CD8⁺, sélectionnées avec un tétramère de complexe Qa-1/Hsp60_{p216} et expansées *in vitro* avec de l'IL-15 complexé, inhibe efficacement la progression de la maladie.

Chez l'Homme, les Tregs CD8⁺ spécifiques du complexe HLA-E (homologue humain de Qa-1)/Hsp60sp sont impliquées dans le développement et le contrôle du diabète de type 1 (Jiang et al., 2010) et le contrôle de la sclérose en plaque (Correale and Villa, 2008). Aucune étude à ce jour ne rapporte leur rôle potentiel en transplantation.

3.3.1.2.4 Les Tregs CD8⁺CD122⁺

Les LTs CD8⁺CD122⁺ sont une population de nTregs nécessaire au maintien de l'homéostasie immune chez la souris (Rifa'i et al., 2004). Récemment, il a été montré que la population naturelle de LTs CD8⁺CD122⁺ peut être soit régulatrice soit mémoire, suivant l'expression de PD-1 et sa spécificité antigénique. Ainsi, les Tregs sont CD8⁺CD122⁺PD-1⁺ et inhibent le rejet d'allogreffe de peau *in vivo* alors que les LTs CD8⁺CD122⁺PD-1⁻ spécifiques d'antigènes sont des LTs mémoires (Dai et al., 2010).

Les Tregs CD8⁺CD122⁺ sécrètent de l'IL-10 (Endharti et al., 2005), qui inhibe la prolifération et la sécrétion d'IFN γ par les LTs CD8⁺ et CD4⁺ (Rifa'i et al., 2004). La suppression par les Tregs implique la reconnaissance préalable directe des LTs activés via les interactions TCR/CMH-Ip conventionnelles (Rifa'i et al., 2008), CD80-86/CD28 (Shi et al., 2008) et PD-1/PD-L1 (Dai et al., 2010). Par ailleurs, Okuno et collègues ont étudié le répertoire TCR des Tregs CD8⁺CD122⁺CD49d^{high}IL-10⁺, en le comparant au répertoire des LTs naïfs conventionnels CD8⁺CD122⁻ (Okuno et al., 2013). Par cytométrie en flux et Immunoscope, ils ont ainsi mis en évidence l'utilisation préférentielle de la chaîne V β 13 du TCR, suggérant une expansion clonale des Tregs matures en périphérie. De plus, le séquençage du CDR3 du TCR V β 13 a permis d'identifier un clonotype particulier de 13 AAs, partagé entre deux animaux.

Le transfert de Tregs CD8⁺CD122⁺ *in vivo* prévient le développement de la colite induite par les LTs CD4⁺CD45RB^{high}, de façon dépendante de l'IL-10 (Endharti et al., 2011), et réduit les symptômes de l'EAE (Lee et al., 2008). De plus, dans un modèle murin de la maladie autoimmune de Graves, la déplétion *in vivo* des Tregs CD8⁺CD122⁺ augmente l'incidence de l'hyperthyroïdisme (Saitoh et al., 2007). Chez l'Homme, les LTs CD8⁺CXCR3⁺ seraient l'équivalent des Tregs CD8⁺CD122⁺ murines (Shi et al., 2009). De

façon similaire, ils inhibent *in vitro* la prolifération et la sécrétion d'IFN γ des LTs CD8⁺CXCR3⁻ via la sécrétion d'IL-10.

3.3.1.2.5 Les Tregs CD8⁺CD103^{high}

Le marqueur CD103 définit un sous-type de LTs CD8⁺ humains induits par des alloantigènes et qui possèdent les caractéristiques fonctionnelles de Tregs (Uss et al., 2006). Les Tregs CD8⁺CD103^{high} humaines peuvent être générées *in vitro* par stimulation avec des mDCs allogéniques en présence de TGF- β (Koch et al., 2008) et de rapamycine, cette dernière favorisant leur expansion (Uss et al., 2007). Elles produisent du TGF- β et de grandes quantités d'IL-10 (Uss et al., 2006) et exercent leur fonction suppressive via un mécanisme dépendant d'un contact cellulaire (Koch et al., 2008; Uss et al., 2006).

Chez le rat, Lu et collègues ont montré que l'expression du CD103 par les LTs CD8⁺ est augmentée *in vivo* chez des rats tolérants spontanément une allogreffe hépatique (Lu et al., 2009). Comme chez l'Homme, les LTs CD8⁺CD103⁺ peuvent être générés *in vitro* après stimulation avec des alloantigènes de foie ou du TGF- β et exercent une fonction suppressive dépendante d'un contact cellulaire.

Chez la souris, une population de Tregs CD8⁺CD103^{high}CD44⁻, produisant du TGF- β et inhibant la prolifération des LTs CD4⁺ *in vitro*, régule l'inflammation dans un modèle d'iléite chronique *in vivo* (Ho et al., 2008). Egalement, une nouvelle population de Tregs induites CD8⁺FoxP3⁻CD103⁺ vient d'être décrite chez la souris (Liu et al., 2013a). Enfin, une population de Tregs CD8⁺FoxP3⁺, exprimant fortement CD103, est induite durant la GvHD et limite sa sévérité lors d'une greffe de moelle osseuse chez la souris (Beres et al., 2012).

3.3.1.3 Le rôle de la spécificité antigénique dans la suppression par les Tregs

La nécessité d'une interaction TCR spécifique pour l'activation et la fonction des Tregs fait débat dans la communauté scientifique. Des expériences *in vitro* ont montré que les Tregs requièrent l'activation par leur TCR pour l'exercice de leur fonction (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998), bien que ce prérequis soit contesté par l'étude du groupe de Vignali (Szymczak-Workman et al., 2009). De plus, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent que les Tregs activées par leur antigène spécifique peuvent inhiber la prolifération de Th conventionnels de même spécificité ou de spécificité antigénique différente, suppression qualifiée de « bystander » indépendante de l'antigène (Corthay, 2009). Toutefois, un frein majeur à la compréhension du rôle de la spécificité antigénique des Tregs, c'est-à-dire le rôle de leur TCR, est la difficulté à identifier les cibles antigéniques et à isoler et

expandre les Tregs spécifiques d'antigènes de la périphérie. Une alternative est de modifier *in vitro* par transfert de gènes la spécificité des Tregs, en les dotant d'un nouveau TCR. Les modèles générés permettent alors d'étudier les conditions d'activation nécessaires et les mécanismes de suppression spécifique de l'antigène des Tregs.

Chez la souris, Tsang et collègues ont démontré le potentiel thérapeutique des Tregs modifiées génétiquement pour leur TCR (Tsang et al., 2008). Ainsi, les nTregs CD4⁺CD25⁺ dotées d'une allospécificité directe, mais aussi indirecte par transduction d'un TCR spécifique d'un complexe CMH du soi/peptide allogénique, induisent plus efficacement la survie à long terme d'une allogreffe cardiaque incompatible que les Tregs reconnaissant les CMHs-II allogéniques par voie directe uniquement (Tsang et al., 2008). Chez l'Homme, des études récentes ont montré que les Tregs humaines peuvent être génétiquement modifiées *in vitro* par transduction avec des constructions lentivirales codant pour un TCR de spécificité antigénique connue (Brusko et al., 2010; Plesa et al., 2012; Tsang et al., 2008; Wan et al., 2013). Ainsi, les groupes de Bluestone et Riley ont transduit des nTregs humaines CD4⁺CD25⁺ avec respectivement un TCR de forte avidité pour le complexe HLA-A*0201/melanoma antigen tyrosinase et de faible affinité pour HLA-A2/NY-ESO-1 (cancer testis antigen), conférant ainsi une spécificité antigénique précise à une population de nTregs polyclonales (Brusko et al., 2010; Plesa et al., 2012). Ces Tregs s'expandent *in vitro* au contact de CPAs artificielles et, après stimulation spécifique via leur TCR, inhibent la prolifération soit de LTs CD4⁺ conventionnels de même spécificité antigénique ou de spécificité différente (Brusko et al., 2010), soit de LTs CD8⁺ de spécificité différente à condition que les deux antigènes soient présentés par la même CPA (Plesa et al., 2012). Au contraire, les Tregs génétiquement modifiées de l'étude de Wan, activées de façon spécifique de l'antigène, conservent leur capacité de suppression lorsque les LTs effecteurs sont stimulés par un antigène différent présenté sur une CPA distincte (Wan et al., 2013). De plus, la présence de DCs, en tant que CPAs ou cellules « bystander » autologues, est indispensable à l'activité suppressive des Tregs stimulées spécifiquement. Ces approches constituent des outils puissants pour la compréhension de la biologie des Tregs humaines avec pour but l'optimisation des stratégies de transfert adoptif de Tregs en transplantation et dans le traitement des MAIs.

De nombreuses populations de Tregs CD4⁺ ou CD8⁺ spécifiques d'alloantigènes, générées *ex-vivo*, ont été décrites chez la souris et l'Homme (**Tableau 1**). Plusieurs études chez le rongeur, dans des modèles d'allogreffe de peau et de cœur, ont montré que

les Tregs spécifiques d'alloantigènes induisent une survie indéfinie de l'allogreffe (Golshayan et al., 2007; Joffre et al., 2008; Tsang et al., 2009) et sont plus efficaces que les Tregs polyclonales. Le groupe de Van Meerwijk a rapporté que le transfert de Tregs spécifiques du donneur chez la souris prévient du rejet d'allogreffe de moelle osseuse, puis de peau et de cœur du même donneur (Joffre et al., 2008) et que cette tolérance à long terme implique les Tregs FoxP3⁺ de l'hôte, alors que les Tregs injectées disparaissent (Pasquet et al., 2013). Dans un modèle murin de xénotransplantation humanisé, Sagoo et collègues ont montré que le transfert de nTregs humaines CD4⁺ d'allospécificité directe, sélectionnées sur la base de la coexpression des marqueurs d'activation CD69 et CD71 et expansées *in vitro* contre des mDCs allogéniques plus de l'IL-2, prévient plus efficacement le rejet de greffe de peau humaine que les Tregs polyclonales (Sagoo et al., 2011). Par ailleurs, des nTregs humaines CD4⁺ allospécifiques, stimulées par des CPAs allogéniques ou syngéniques chargées avec un lysat allogénique en présence de rapamycine, d'IL-2 et d'IL-15, inhibent les réponses allospécifiques cent fois plus efficacement que les Tregs non expansées ou polyclonales (Veerapathran et al., 2011). Les études cliniques de tolérance opérationnelle d'allogreffes de foie ou de rein publiées à ce jour suggèrent que les nTregs spécifiques du donneur sont impliquées dans la régulation des alloréponses précoces post-transplantation et dans l'induction de tolérance (Sagoo and Lombardi, 2012). En particulier, une étude a montré une expansion de Tregs dites naïves CD4⁺CD25⁺⁺CD45RA⁺ donneur-spécifiques dans le sang de patients opérationnellement tolérants, avec des propriétés suppressives augmentées (Nafady-Hego et al., 2010).

En plus de leur fort potentiel suppresseur, l'utilisation de Tregs spécifiques d'antigènes en thérapie cellulaire adoptive présente d'autres avantages. L'exercice de leurs fonctions immunomodulatrices se concentre aux sites de la source d'alloantigènes ou d'activation, évitant ainsi une immunosuppression large indésirable induite par des Tregs polyclonales, distribuées de façon plus systémique (Dijke et al., 2008; Golshayan et al., 2009; Tang et al., 2006a). De plus, un nombre moins important de Tregs spécifiques d'antigènes est nécessaire pour inhiber l'expansion de LTs effecteurs alloréactifs *in vivo* (Tang et al., 2004; Tarbell et al., 2004). La question de la spécificité directe ou indirecte des Tregs est également importante pour l'utilisation en thérapeutique. L'allorecognition des antigènes du donneur par les Tregs via les deux voies simultanées ou la voie indirecte seule semble être le plus favorable à l'induction de tolérance à l'allogreffe (Sánchez-Fueyo et al., 2007; Tsang et al., 2008, 2009).

Concernant les Tregs CD8⁺, une population de Tregs humaines CD8^{high} spécifique d'alloantigènes, générée *ex vivo* à partir de précurseurs naïfs par stimulation avec des LBS activés via CD40, contrôle la GvHD de façon allospécifique dans un modèle de greffe de moëlle osseuse chez la souris humanisée (Zheng et al., 2013). Par ailleurs, des Tregs CD8⁺FoxP3⁺ spécifique du donneur, induites par stimulation *ex vivo* de LTs naïfs avec des DCs allogéniques en présence d'IL-2, TGF-β1 et acide rétinoïque (RA), sont capables d'induire des Tregs CD4⁺FoxP3⁺ dans les ganglions drainant la greffe et d'inhiber un rejet de greffe de peau chez la souris (Lerret et al., 2012). De plus, une population de Tregs CD8⁺FoxP3⁺ est induite *in vivo* après une allogreffe de moelle osseuse chez la souris et inhibe la prolifération de LTs répondeurs de façon spécifique des alloantigène et plus efficacement que les Tregs CD4⁺ (Robb et al., 2012).

Enfin, plusieurs études suggèrent que la présence continue d'alloantigènes du donneur est nécessaire au maintien de la tolérance à l'allogreffe (Chen et al., 1996; Hamano et al., 1996; Scully et al., 1994). Ainsi, le maintien de la présentation des alloantigènes, via la voie semi-directe ou indirecte, permettrait l'activation spécifique de l'antigène, l'expansion ou la survie de Tregs spécifiques du donneur induites *in vivo* ou transférées adoptivement (Sánchez-Fueyo et al., 2006; Walker et al., 2003), potentiellement capables de stimuler d'autres processus de regulation spécifiques d'alloantigènes.

Espèce	Phénotype	Génération	AlloSpécificité	Allopeptide	Fonction	Référence
Souris	Tregs CD8 ⁺ FoxP3 ⁺	Stimulation de LTs naïfs CD8 ⁺ par des DCs allogéniques + IL-2 + TGF-β1 + RA	Directe	inconnu	Inhibent le rejet de greffe de peau	<i>Lerret et al., 2012</i>
Souris	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ par des DCs allogéniques immatures + IL-2	Directe	inconnu	Induisent la survie à long terme de l'allogreffe cardiaque, en association avec un traitement rapamycine	<i>Raimondi et al., 2010</i>
Souris	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ par des DCs syngéniques chargées avec le peptide + IL-2	Indirecte	H2-A ^b du soi/peptide allogénique dérivé de H2-K ^d	Survie à long terme de l'allogreffe cardiaque en combinaison avec rapamycine et anti-CD8	<i>Tsang et al., 2009</i>
Souris	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR, CTLA-4, CD62L, CCR7, CD103	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ par des DCs syngéniques immatures chargées avec le peptide + IL-2 + IL-7	indirecte	H-2-A ^k du soi/peptide allogénique dérivé de H2-K ^d	Retardent le rejet de greffe de peau	<i>Golshayan et al., 2007</i>
Souris	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ par des CPAs allogéniques ou CPAs semi-allogéniques (donneur-receveur) + IL-2 pendant 14 jours	Directe Double	inconnu	Prévention du rejet aigu et chronique d'allogreffe de peau et de coeur, en combinaison avec un chimérisme hématopoïétique, par les Tregs de spécificité double	<i>Joffre et al., 2008</i>
Souris	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺	Transduction rétrovirale de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ par un TCR de spécificité indirecte et stimulation avec des DCs syngéniques ou allogéniques	Directe Double	H2-A ^b du soi/peptide allogénique dérivé de H2-K ^d	Survie à long terme de l'allogreffe cardiaque en combinaison avec rapamycine et anti-CD8 induite plus efficacement par les Tregs de double spécificité	<i>Tsang et al., 2008</i>
Souris	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺ , GITR ⁺ , FoxP3 ⁺	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ par des splénocytes allogéniques + IL-2	Directe	inconnu	Prolongent la survie de greffe de peau	<i>Nishimura et al., 2004</i>
Souris	Tregs CD4 ⁺ CD45RC ^{low}	Stimulation de LTs CD4 ⁺ CD45RC ^{low} par des CPAs allogéniques ou semi allogéniques (donneur-receveur)	Directe Double	inconnu	Inhibition des réponses effectrices dépendante de la voie de présentation indirecte des alloantigènes	<i>Hara et al., 2001</i>
Homme	Tregs CD8 ^{high}	Stimulation de LTs CD8 ⁺ CD25 ⁻ naïfs par des LBs allogéniques activés	Directe	inconnu	Inhibition de la GvHD de façon allospécifique et induction de tolérance à long terme dans un modèle de souris humanisée	<i>Zheng et al., 2013</i>
Homme	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ FoxP3 ⁺ Bcl2 ⁺ CD62L ⁺ CCR7 ⁺	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ par des DCs HLA-matchées + IL-2 + IL-15 + rapamycine Expansion = 155 à 405	Directe	AgmH : DBY, UTY, ou DFFRY-2	Possible application clinique pour la prévention de la GvHD après une greffe de moelle osseuse	<i>Veerapathran et al., 2013</i>
Homme	Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{lo} CTLA-4 ⁺ , GITR ⁺ , TGFβLAP ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD73 ⁻ , CD38 ^{+/+} , CD39 ⁺ , CD62L ⁺ CD45RA	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ^{high} par des DCs allogéniques + IL-2 Sélection des Tregs allospécifiques enrichies par la coexpression de CD69 et CD71 Expansion = 5000	Directe	inconnu	Prévention du rejet de greffe de peau humaine chez la souris humanisée par les Tregs antigène-spécifique plus efficace que les Tregs polyclonales	<i>Sagoo et al., 2011</i>
Homme	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ FoxP3 ⁺ Bcl-2 ⁺ CD62L ⁺ CCR7 ⁺ IL-10 et TGFβ	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ par des DCs allogéniques ou syngéniques chargées avec un lysat allogénique + IL-2 + IL-15 + rapamycine Expansion = 793	Directe Indirecte	inconnu	Tregs allospécifiques 100 fois plus efficace que Tregs polyclonales pour inhiber les réponses alloimmunes in vitro	<i>Veerapathran et al., 2011</i>
Homme	Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺	Stimulation de nTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ par des DCs syngéniques chargées avec l'allopeptide + IL-2 Expansion = 1600	Indirecte	HLA-DRB1*0101/peptide allogénique dérivé de HLA-A2 (103-120)	Suppression des Tregs alloantigène-spécifiques plus forte que les Tregs polyclonales	<i>Jiang et al., 2006</i>

Tableau 1 : Liste non exhaustive des Tregs spécifiques d'alloantigènes en transplantation.

3.3.1.4 Le répertoire des Tregs

La capacité à discriminer le soi du non-soi est une caractéristique importante des Th conventionnels. Afin de prévenir de l'autoimmunité, les LTs avec des TCR fortement réactifs au soi sont éliminés du répertoire et sont sélectionnés pour la reconnaissance du non-soi. Les nTregs en charge de maintenir la tolérance au soi seraient quant à elles préférentiellement autoréactives (Hsieh et al., 2004; Romagnoli et al., 2002; Takahashi et al., 1998). Des Tregs autoréactives ont été notamment observées dans différents modèles de MAIs. Les Tregs spécifiques de la chaîne β de l'insuline ou d'un autoantigène des îlots pancréatiques protègent du diabète de type 1. Par ailleurs, la présence de Tregs spécifiques de la MBP et PLP est associée à la prévention de l'EAE. Toutefois, de nombreuses études décrivent des Tregs spécifiques d'antigènes étrangers dérivés de bactéries, de champignons, de parasites, d'allergènes ou d'alloantigènes (Corthay, 2009).

Plusieurs études, basées sur des souris génétiquement modifiées avec un répertoire TCR limité, ont tenté de mesurer la diversité et la spécificité du répertoire TCR exprimé par les Tregs CD4⁺. Les répertoires des Tregs et des LTs conventionnels ont un niveau de diversité similaire mais le degré de chevauchement entre les TCRs des deux populations, bien que variable selon les études, reste assez faible (Hsieh et al., 2004, 2006; Pacholczyk et al., 2006; Wong et al., 2007a). Ce recoupement correspondrait aux Tregs et LTs effecteurs spécifiques d'antigènes du soi. D'après une étude récente de Relland et collègues chez une souris transgénique pour la chaîne V β du TCR, le répertoire des Tregs spécifique d'un antigène étranger est plus restreint et clonalement distinct du répertoire des LTs conventionnels de même spécificité (Relland et al., 2012). Contrairement à l'autoréactivité supposée des nTregs, les iTregs, dérivées du pool de LTs conventionnels, sont spécifiques d'antigènes étrangers. En ce sens, le répertoire des iTregs est majoritairement distinct du répertoire des nTregs (Haribhai et al., 2011). La combinaison des deux répertoires contribue alors à augmenter la diversité des TCRs du pool global de Tregs et permet un meilleur contrôle des MAIs (cf. § 2.4.4 Implications fonctionnelles de la diversité du répertoire TCR).

Même en l'absence d'inflammation ou de maladie, différents lieux de drainage des tissus lymphatiques contiennent des Tregs avec des répertoires distincts. Ces Tregs présentent un biais dans l'usage de leur TCR, avec une spécificité enrichie pour les antigènes locaux restreints aux tissus, impliquant donc que la spécificité du TCR gouverne la localisation des Tregs (Lathrop et al., 2008). Dans les MAIs, les Tregs répondeuses sont également enrichies sur la base de leur réactivité pour le tissu (Liu et al., 2009; Nguyen et al., 2010). Par ailleurs,

un recouvrement minime entre les répertoires TCR des Tregs et des LTs conventionnels au niveau des différents sites suggère un recrutement des Tregs plutôt que leur induction. En effet, la formation de iTregs au niveau du système nerveux central de souris atteinte d'EAE (Liu et al., 2009) ou dans le pancréas de souris diabétique (Wong et al., 2007b) apparaît limitée. Bien que le biais des Tregs pour le soi soit contesté (Pacholczyk et al., 2007), ces cellules forment un groupe bien distinct des LTs CD4⁺ effecteurs.

En ce qui concerne le répertoire des Tregs CD8⁺, peu d'études sont disponibles. Comme décrit précédemment, les Tregs CD8 α ⁺ spécifiques d'un peptide dérivé du TCR V β 8.2, apprêté par Qa-1, et les Tregs CD8⁺CD122⁺, présentent respectivement un biais vers l'utilisation de la chaîne V β 6 et V β 13 du TCR, et sont impliquées dans la protection contre l'EAE chez la souris (Okuno et al., 2013; Tang et al., 2007). En outre, les Tregs CD8⁺CD28⁻ de souris « Wild Type » ou AIRE-déficientes (AIRE⁰) présentent des répertoires TCR très divers et similaires, avec toutefois un pic altéré à la même longueur de CDR3 α 12 chez les Tregs AIRE⁰ (Pomié et al., 2011)

3.3.2 Les cellules dendritiques tolérogènes

Même si les DCs sont connues pour être immunogènes, elles ont aussi la capacité remarquable d'être tolérogènes. Elles jouent un rôle primordial dans les mécanismes de tolérance centrale et périphérique. En effet, dans le thymus, les LTs autoréactifs meurent par apoptose lors de la délétion clonale induite par des DCs thymiques. De plus, la déplétion des DCs chez la souris entraîne une diminution du nombre de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, corrélée à une augmentation de LTs producteurs d'IL-17 et d'IFN- γ , et une augmentation du risque de MAI (Darrasse-Jèze et al., 2009), soulignant leur rôle dans la tolérance périphérique.

Le terme de DCs tolérogènes englobe des DCs exprimant une ou plusieurs molécules immunosuppressives (IL-10, IDO, TGF- β , Hème Oxygénase 1 HO-1), ayant une expression réduite des molécules immunostimulatrices (CMH, CD80, CD86) et/ou ayant la capacité de générer des Tregs ou l'incapacité à induire une réponse T. Les propriétés tolérogéniques des DCs 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 and Pulendran, 2011). De nombreux protocoles ont été développés pour générer des DCs tolérogènes par traitement pharmacologique, dans le but de les utiliser comme outil thérapeutique pour l'induction d'une tolérance spécifique

d'antigènes dans le traitement de MAIs ou en transplantation (Maldonado and von Andrian, 2010).

Initialement, les **cDCs** (ou DCs myéloïdes) immatures exprimant faiblement les molécules du CMH-II et de costimulation ont été identifiées comme le type de DC dominant ayant la capacité à induire une tolérance T (Lu et al., 1995). En effet, une injection unique de DCs immatures du donneur sept jours avant la transplantation allonge la survie de l'allogreffe de cœur chez la souris (Fu et al., 1996) ou la prolonge indéfiniment (Lutz et al., 2000). D'autre part, l'injection de DCs autologues immatures combinée à une immunosuppression sous-optimale induit la production d'IFN γ par les LTs DN CD4⁻CD8⁻ dans la rate via EB13 et une survie à long terme de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Hill et al., 2011). Une autre étude de notre laboratoire a rapporté que la molécule HO-1 est capable de bloquer la maturation des DCs, conduisant à l'inhibition des réponses immunitaires pro-inflammatoires et allogéniques, en préservant néanmoins leur production d'IL-10 (Chauveau et al., 2005). Toutefois, les DCs semi-matures (Lutz, 2012) ou matures possèdent dans certains cas un potentiel tolérogène important. Ainsi, des DCs matures mais incapables de produire des cytokines proinflammatoires, induisent une tolérance périphérique *in vivo* et protègent contre l'EAE (Jiang et al., 2007).

Un nombre important d'études ces dernières années démontre un rôle des **pDCs** dans la régulation de l'induction ou du maintien de la tolérance aux allogreffes d'organes solides ou de moelle osseuse, leurs fonctions tolérogènes restant toutefois moins bien définies que pour les cDCs (Rogers et al., 2013). Les pDCs ont une fonctionnalité double d'immunogénicité et de tolérogénicité suivant la liaison des récepteurs et le statut de maturation. Dans un modèle murin de tolérance à l'allogreffe cardiaque associant DST et anti-CD40L, les pDCs induisent la génération de Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ spécifiques d'alloantigènes dans les ganglions drainant la greffe (Ochando et al., 2006). A l'inverse, leur déplétion empêche le développement de Tregs et l'induction de tolérance. Chez l'Homme, des pDCs allogéniques stimulées via le TLR-9 seul, les TLR-9 et -7 ou via le CD40, induisent respectivement la génération de Tregs CD4⁺CD25⁺ (Moseman et al., 2004), de Tregs CD8⁺LAG-3⁺FoxP3⁺CTLA-4⁺ (Boor et al., 2011) et de Tregs CD8⁺ productrices d'IL-10 (Gilliet and Liu, 2002), capables d'inhiber *in vitro* les réponses T allogéniques. Une augmentation *in vivo* du ratio pDC/cDC, de l'expression de PDL-1 par les pDCs et de la population de Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ est constatée chez des patients greffés hépatiques opérationnellement

tolérants par rapport aux patients sous immunosuppression de maintenance (Tokita et al., 2008). Les pDCs contribuent donc à la régulation immunitaire chez les patients transplantés.

Fonctionnellement, la surexpression d'ICOS-L (Ito et al., 2007) et d'IDO (Chen et al., 2008) par les pDCs en maturation conduit à la génération de Tregs $CD4^+CD25^+$. D'autre part, les pDCs matures sont capables de stimuler la prolifération et d'abroger l'anergie des Tregs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, par contact cellulaire et de façon partiellement dépendante de CD86, contrairement aux cDCs matures et pDCs et cDCs immatures (Ouabed et al., 2008). Par ailleurs, d'après l'étude de Mellor et ses collègues, un sous-type de pDCs potentielles spléniques chez la souris exprime fortement IDO après blocage de l'interaction B7/CD28 par administration *in vivo* de CTLA4-Ig, ce qui bloque la prolifération T induite par des alloantigènes (Mellor et al., 2003). Par ailleurs, une étude récente a rapporté l'implication d'IDO dans le maintien de pDCs tolérogènes phénotypiquement stables après exposition au TGF- β , et ce de façon indépendante de son activité enzymatique (Pallotta et al., 2011).

Dans notre modèle d'allogreffe cardiaque combinée à un traitement CD40Ig, les pDCs allogéniques stimulent préférentiellement les capacités régulatrices des Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$ en comparaison aux cDCs (Li et al., 2010). En effet, *in vitro*, les Tregs requièrent un contact avec les pDCs pour inhiber la prolifération des LTs $CD4^+$ effecteurs stimulés allogéniquement, suppression qui, lorsqu'elle est indépendante d'un contact, implique la production d'IDO par les pDCs. *In vivo*, la colocalisation des pDCs avec les Tregs et la nécessité d'IDO dans l'induction et le maintien de la survie témoignent de la tolérogénicité des pDCs de rat dans notre modèle (Guillonnet et al., 2007a; Li et al., 2010).

Comme décrit précédemment, les Tregs sont capables de conférer aux DCs des propriétés tolérogènes, notamment grâce à l'expression de la molécule CTLA-4. En effet, elles peuvent modifier l'expression de molécules de maturation sur les DCs ou induire l'expression de molécules tolérogènes (IDO, ILT3, ILT4) et ainsi modifier leur fonction. D'autre part, il a été montré que les DCs 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 tolérogènes qui pouvaient supprimer l'apparition de maladies autoimmunes (Manicassamy and Pulendran, 2011). Enfin, l'engagement de plusieurs récepteurs sur les DCs comme le Fc γ RIIB (Desai et al., 2007), les récepteurs ILT-3 et ILT-4 et un récepteur à activité tyrosine kinase, MerTK (Mer Tyrosine Kinase)(Wallet et al., 2008), peuvent les rendre tolérogènes.

L'importance des DCs 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 DST, l'utilisation de LF15-0195 (un analogue de la déoxyspergualine), de CD40Ig, ou d'anticorps anti-CMH-II du donneur, semblent dépendants de l'activité des DCs (Chiffolleau et al., 2002; Degauque et al., 2006; Josien et al., 1998; Li et al., 2010).

3.3.3 Les autres cellules régulatrices

L'intérêt pour le rôle des **Bregs** en transplantation est né des données cliniques plutôt qu'expérimentales. En effet, en dépit de l'absence de DSAs, des niveaux augmentés du nombre de LBs et de l'expression de gènes associés, tels CD20 et CD79B, ont été retrouvés chez des patients greffés rénaux opérationnellement tolérants (Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010; Sagoo et al., 2010). A la différence des Tregs, la caractérisation phénotypique des Bregs reste imprécise. Chez la souris, les Bregs expriment fortement CD1d, CD21, CD24 et IgM et modérément CD19 (Mauri and Blair, 2010). Chez l'Homme, une population de Bregs humaines, CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}, a été décrite et partage certaines propriétés avec son équivalent murin, dont un phénotype immature. Une caractéristique majeure des Bregs est leur capacité à sécréter la cytokine régulatrice IL-10 (Bouaziz et al., 2012). L'engagement du BCR, la coopération avec les LTs, la signalisation via CD40L et IFN β dérivé de DCs tolérogènes (Qian et al., 2012), la stimulation des TLRs (Fillatreau et al., 2008; Yanaba et al., 2009) et du CD40 (Blair et al., 2010) conduisent à l'activation des Bregs et à la production d'IL-10. L'activité régulatrice des Bregs sécréteurs d'IL-10 a été démontrée en premier lieu dans les maladies autoimmunes (Yang et al., 2013). Les mécanismes d'action des Bregs sont multiples et impliquent l'inhibition de la prolifération des LTs CD4⁺ et de la différenciation Th1, l'inhibition de l'activation des monocytes et de la fonction des CPAs, l'anergie des LTs, l'induction de Tregs (Chen et al., 2009; Tu et al., 2008) et l'expansion de NKTs (Wei et al., 2005). En transplantation, le rôle des Bregs a été mis en évidence dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque induit par un anticorps anti-CD45RB chez la souris (Huang et al., 2008). D'après une récente étude, la liaison de TIM-1 sur les LBs induit l'expansion et les fonctions régulatrices des Bregs TIM-1⁺, alors capables de transférer la tolérance à l'allogreffe d'îlots, et pourrait constituer une stratégie thérapeutique pour augmenter leur nombre *in vivo* (Ding et al., 2011). Par ailleurs, une étude de notre laboratoire a montré que les LBs IgM⁺, mais non IgG⁺, forment des agrégats au sein du greffon cardiaque des rats tolérants, indiquant la présence de LBs avec une activité régulatrice (Le Texier et al., 2011).

De plus, ces Bregs issus d'animaux tolérants sont capables de transférer la tolérance à l'allogreffe cardiaque. Enfin, le traitement *in vivo* avec un adénovirus associé codant pour FGL2 prévient du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat, par la génération de LBs régulateurs capables de transférer la tolérance de manière infectieuse (Bézie, Picarda et al, en révision).

En transplantation, l'activation des macrophages se produit en réponse aux dommages tissulaires associés à l'ischémie-reperfusion et contribue à la destruction précoce du greffon (Mannon, 2012). Cependant, il existe une population de **macrophages activés de façon alternative** par des cytokines de type Th2 comme l'IL-4 et l'IL-3, qui inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés de façon classique, et contribuent à la réparation tissulaire (Broichhausen et al., 2012). Ces fonctions opposées ne sont pas le résultat d'une différenciation mais d'une plasticité remarquable qui leur permet d'adapter leur phénotype et leur fonction selon l'environnement (Fleming and Mosser, 2011). Les macrophages régulateurs peuvent être induits par interaction avec des Tregs (Tiemessen et al., 2007) et ont la capacité d'induire à leur tour des Tregs via la sécrétion d'IL-10 (Liu et al., 2011). En transplantation, contrairement aux DCs, la réduction du pool de macrophages chez une souris recevant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques favorise l'expansion des LTs du donneur et aggrave la GvHD, alors que leur expansion avec du CSF-1 provoque l'effet inverse (Hashimoto et al., 2011). Les macrophages régulateurs humains isolés du sang périphérique sont caractérisés par leur morphologie, des marqueurs spécifiques bien que non stables et leur capacité à inhiber la prolifération T *in vitro* (Wood et al., 2012). Dans une étude clinique pilote, l'administration de macrophages régulateurs dérivés du donneur à des patients transplantés rénaux a permis la survie du greffon sans signe de rejet un an après la greffe sous immunosuppression réduite (Hutchinson et al., 2011a).

Enfin, les **MDSCs** sont une population hétérogène de cellules progénitrices hématopoïétiques immatures présentant de nombreuses fonctions immunes suppressives, notamment l'induction de tolérance aux alloantigènes dans des modèles d'allogreffe de cœur et d'ilots chez la souris, et de rein chez le rat (Dilek et al., 2012; Van Rompaey and Le Moine, 2011). Les **MSCs**, quant à elles, sont une sous-population de cellules multipotentes de la moelle osseuse qui soutiennent l'hématopoïèse et possèdent des propriétés de réparation et immunomodulatrices importantes, notamment en transplantation (Casiraghi et al., 2013).

3.3.4 Applications cliniques en transplantation

Au regard des expériences menées chez l'animal, l'utilisation du potentiel tolérogène des cellules régulatrices semble être une stratégie prometteuse pour induire la tolérance en transplantation d'organes chez l'Homme. Bien que plusieurs stratégies d'immunothérapie incluant les anticorps anti-CD3, anti-CD52 (alemtuzumab), le traitement ATG et la rapamycine soient favorables au développement et à la fonction des Tregs *in vivo*, l'administration de Tregs générées ou expansées *in vitro* semble plus prometteur en transplantation clinique (McMurchy et al., 2011).

Le potentiel thérapeutique du transfert adoptif de Tregs en transplantation humaine a notamment été démontré par les études récentes du groupe de K. Wood. Grâce à des modèles de souris humanisées, ils ont ainsi décrit que les Tregs expansées *in vitro* de façon polyclonale (anti-CD3/CD28 + IL-2) sont capables d'inhiber le rejet de greffe de peau allogénique humaine (Issa et al., 2010) et empêchent le développement de l'artériosclérose d'artères humaines greffées (Nadig et al., 2010), action qui peut être potentialisée par un traitement sous-optimal avec de la rapamycine (Hester et al., 2012). Par ailleurs, une méthode de sélection et d'expansion de Tregs humaines allospécifiques *ex vivo*, a été développée par Sagoo et ses collègues (Sagoo et al., 2011). Après stimulation directe par les cDCs du donneur, les Tregs allospécifiques sont enrichies et sélectionnées sur la base de la coexpression des marqueurs CD69 et CD71, et expansées *in vitro* avec de l'IL-2. De façon intéressante, ces cellules inhibent plus efficacement le rejet d'allogreffe de peau humaine *in vivo*, suggérant le potentiel des Tregs spécifiques d'alloantigènes dans une approche de thérapie ciblée. L'ensemble de ces résultats met en évidence le potentiel thérapeutique des Tregs humaines en transplantation. L'infusion de Tregs humaines a déjà été testée dans des cas de greffes de moelle osseuse, avec des résultats encourageants (Schlieer et al., 2012) (**Tableau 2**). De manière intéressante, une étude très récente rapporte pour la première fois la détection de Tregs CD4⁺ humaines spécifiques d'AgmH, qui sont clonées et expansées *in vitro* en présence d'IL-2, IL-15 et rapamycine en nombre suffisant pour une application clinique, et exercent une suppression antigène spécifique (Veerapathran et al., 2013). Basé sur ces résultats, un essai clinique de phase I pour la prévention de la GvHD aiguë après greffe de moelle osseuse entre individus identiques pour les HLAs est prévu. En l'absence de consensus actuel sur un protocole optimal de thérapie cellulaire, plusieurs paramètres importants sont susceptibles de varier : la technique d'isolation et d'expansion, l'immunosuppression associée

(rapamycine, ATG préférentiellement), le timing d'administration, le nombre de Tregs à injecter et le nombre d'injections.

Notre laboratoire participe actuellement à une étude clinique internationale de phase I/II, *The ONE Study, 7th Frame Program, European Commission* (www.onestudy.org), constituant une approche unifiée d'évaluation de l'immunothérapie cellulaire en transplantation. Basée sur les résultats encourageants obtenus chez l'animal, l'objectif de cette étude multicentrique est d'étudier l'efficacité et l'absence de toxicité du transfert de cellules régulatrices humaines (DCs tolérogènes, nTregs CD4⁺FoxP3⁺ expansées, Tr1, macrophages régulateurs) comme outil de thérapie cellulaire en transplantation d'organes solides. Les cellules seront injectées à des patients insuffisants rénaux recevant une première transplantation à partir de donneur vivant, sous traitement immunosuppresseur minimisé. Les patients du groupe contrôle sont transplantés en 2013 et les patients infusés le seront en 2014. Les résultats sont très attendus et permettront de savoir si cette stratégie est efficace et envisageable en routine. D'autre part, des essais cliniques sont actuellement en planification pour évaluer la sécurité et l'efficacité du transfert de Tregs expansées polyclonales ou spécifiques des alloantigènes du donneur, en combinaison avec la déplétion des LTs alloréactifs et une immunosuppression de court terme chez des patients transplantés hépatiques (Safinia et al., 2013).

Group	Number of patients	Condition	Therapy	Outcome
Trzonkowski (Trzonkowski et al., 2009)	2	HLA-matched BMT or HSCT	Expanded CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ donor Treg as treatment for GvHD	Patient 1: Reduction of immunosuppression Patient 2: Transient clinical improvement
Martelli (Di Ianni et al., 2011)	28	HLA-haploidentical HSCT	Freshly isolated CD4 ⁺ CD25 ⁺ donor Treg	Low incidence of acute and chronic GvHD with improved immune reconstitution
Blazar (Brunstein et al., 2011)	23	Double unit unrelated UCB	Expanded CD4 ⁺ CD25 ⁺ third-party UCB Treg as prophylaxis against GvHD	Reduced incidence of grade II-IV GvHD
Trzonkowski (Trzonkowski et al., 2011)	4	BMT/HSCT	Expanded CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ donor Treg as treatment for GvHD	Alleviation of one case of chronic GvHD, no effect on acute GvHD
Edinger (Edinger and Hoffmann, 2011)	9	HSCT	Freshly isolated Treg	Ongoing: appears safe and feasible
Roncarolo (Battaglia and Roncarolo, 2011)	16	HLA-haploidentical HSCT	Allostimulated donor Tr1 cells	Ongoing: appears safe and feasible
Geissler/Fandrich (Hutchinson et al., 2011)	2	Living-donor kidney transplants	Mregs	Both patients tapered to low-dose tacrolimus monotherapy
The One Study (Wood et al., 2012)	Recruiting	Living-donor kidney transplants	Treg, Mreg, Tr1 cells, tolerogenic DCs	Ongoing feasibility study
Bluestone/Herold (Gitelman et al., 2012)	Recruiting (14 patients)	Treatment of type 1 diabetes	Autologous expanded CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ Treg	Ongoing feasibility study

Tableau 2 : Etudes cliniques publiées et en cours utilisant la thérapie cellulaire en transplantation. D'après (Issa and Wood, 2012). BMT : bone marrow transplantation, HSCT : hematopoietic stem cell transplantation, UCB : umbilical cord blood, Mregs : macrophages régulateurs.

Les stratégies évoquées ne permettent pas actuellement de s'affranchir des immunosuppresseurs. Néanmoins, ils permettent d'envisager une diminution des doses utilisées ou l'utilisation de traitements moins toxiques. L'induction de tolérance dans une population très hétérogène de patients transplantés requiert à ce jour une meilleure compréhension des variabilités de réponse entre les patients, une meilleure connaissance des mécanismes immunologiques de la tolérance et du rejet en transplantation et une approche personnalisée, avec l'utilisation équilibrée des techniques d'induction de tolérance centrale et périphérique.

PROJET DE RECHERCHE

Comme décrit en introduction, le blocage des voies de costimulation est une stratégie efficace pour prévenir du rejet d'allogreffe chez l'animal et prometteuse pour l'induction de tolérance. Notre équipe a développé un modèle d'allogreffe cardiaque utilisant deux souches de rats congéniques de fond génétique Lewis, incompatibles pour l'ensemble du CMH (classe I, classe II, classe I non classique). Le donneur est un rat LEW.1W d'haplotype RT1^u et le receveur un rat LEW.1A d'haplotype RT1^a. En l'absence de traitement, les animaux rejettent leur greffon sous 7 jours. Dans ce modèle, notre groupe a combiné l'injection d'un adénovirus codant pour la molécule CD40Ig à la transplantation dans le but d'induire une tolérance à l'allogreffe. Guillot a ainsi montré que le blocage de l'interaction CD40/CD40L par injection de l'AdCD40Ig directement dans l'apex du cœur greffé, le jour de la transplantation, induit une prolongation de survie indéfinie de l'allogreffe cardiaque chez 83% des receveurs, mais ne prévient toutefois pas du rejet chronique (**Figure 23**) (Guillot et al., 2002).

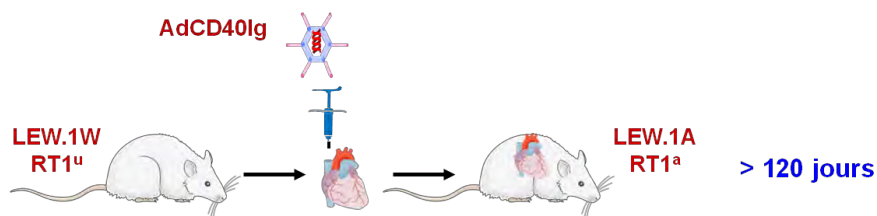


Figure 23 : Transplantation cardiaque d'un donneur LEW.1W à un receveur LEW.1A avec injection intramyocardique de l'AdCD40Ig au moment de la greffe.

Afin d'étudier le caractère allospécifique de l'immunosuppression induite, la présence d'alloanticorps dirigés contre les antigènes du donneur et d'anticorps dirigés contre les antigènes étrangers du KLH (keyhole limpet hemocyanin), injectés dans la patte de l'animal avec un adjuvant complet de Freund 120 jours après la greffe, a été analysée. Une inhibition des réponses humorales alloimmunes mais une réponse humorale normale contre les antigènes étrangers ont été observées, indiquant une **immunosuppression spécifique du donneur** induite par le traitement CD40Ig. De plus, les rats présentant une survie du greffon de plus de 120 jours (dits rats long terme) ont été retransplantés une seconde fois, soit avec un cœur de même type que lors de la première greffe (LEW.1W), soit avec un greffon tierce partie (BN, haplotype RT1ⁿ). L'acceptation du greffon de même haplotype et le rejet d'un greffon tierce partie démontre que le traitement AdCD40Ig induit une inhibition des réponses immunitaires dirigées contre le donneur.

Par la suite, des expériences de transfert adoptif de splénocytes ou de sous-populations cellulaires déplétées ou enrichies ont été réalisées. Guillonnet a montré que le transfert de 2.5 millions de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (ou CD8⁺CD40Ig), provenant de rats long terme traités avec CD40Ig, est nécessaire et suffisant pour induire une prolongation de survie

indéfinie de l'allogreffe chez des receveurs secondaires naïfs irradiés, et ce de façon itérative (Guillonnet et al., 2007a). A l'inverse, le transfert de la population de nTregs CD8⁺CD45RC^{low} issue de rats naïfs ou de la population de LTs CD8⁺CD45RC^{high} issue de rats traités avec CD40Ig n'inhibe pas le rejet aigu d'allogreffe. Par ailleurs, un greffon de type tierce partie est rapidement rejeté chez des receveurs secondaires naïfs irradiés, transférés avec des Tregs CD8⁺CD40Ig, démontrant l'induction d'une « **tolérance** » **spécifique du donneur** dans notre modèle. Guillonnet a également montré un biais dans le répertoire TCR des Tregs CD8⁺CD40Ig de la rate, avec l'utilisation préférentielle de la chaîne Vβ11 du TCR possédant un CDR3 de 9 AAs, suggérant une **expansion oligoclonale** des Tregs allospécifiques. Enfin, le traitement combiné des animaux avec l'AdCD40Ig et un anticorps bloquant anti-CMH-I à compter du jour de la greffe empêche l'induction d'une survie à long terme du greffon, démontrant la nécessité d'une **interaction TCR/CMH-Ip** pour l'induction de tolérance.

Afin de mieux caractériser les Tregs CD8⁺CD40Ig, leur cinétique d'apparition, leur localisation, les interactions cellulaires et les mécanismes de suppression de ces cellules ont été étudiés. Les travaux de Li réalisés au sein de l'équipe ont mis en évidence l'accumulation des Tregs dans le greffon la première semaine suivant la greffe puis la colonisation de la rate durant le premier mois (Li et al., 2010), cette dernière étant nécessaire pour le maintien à long terme de la tolérance. L'analyse de différents sous-types de DCs *in vivo* a montré que ce sont des **pDCs** qui s'accumulent dans le greffon et la rate et colocalisent *in vivo* avec les Tregs CD8⁺CD40Ig, suggérant des interactions privilégiées entre ces deux types cellulaires. Des tests de coculture ont alors été réalisés *in vitro* pour tester la capacité suppressive des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} en présence de différents types de DCs. Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} inhibent la prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ syngéniques préférentiellement lorsqu'elles sont en contact avec les pDCs, et de manière plus efficace lors de la stimulation par des pDCs du type du donneur versus des pDCs tierce partie, en accord avec l'allospécificité des Tregs CD8⁺CD40Ig déjà démontrée par Guillonnet (Li et al., 2010). De plus, les Tregs CD8⁺CD40Ig sont capables d'inhiber les réponses alloimmunes **directes**, stimulées par des pDCs du donneur, et **indirectes**, stimulées par des pDCs syngéniques du receveur chargées avec un lysat de cellules du donneur. Guillonnet a décrit que les Tregs CD8⁺CD40Ig produisent de l'IFNγ, qui induit à son tour l'expression d'IDO par les CE du greffon (Guillonnet et al., 2007a). Afin d'identifier d'autres médiateurs impliqués dans la suppression exercée par les Tregs, les transcriptomes des Tregs CD8⁺CD40Ig versus nTregs

CD8⁺CD45RC^{low} ont été comparés par des **puces pangénomiques**. Trois cent quarante neuf gènes présentent une expression différentielle (pour un fold change > 2) et codent pour des protéines impliquées dans diverses fonctions, liées ou non au système immunitaire, ou de fonction inconnue (Angin, Le Mauff, non publié). Plusieurs molécules potentiellement régulatrices sont surexprimées par les Tregs CD8⁺CD40Ig, parmi lesquelles FGL2 et IL-34 dont le rôle a été étudié *in vitro*. Ainsi, les Tregs CD8⁺CD40Ig utilisent *in vitro* des mécanismes de suppression dépendant d'un contact, impliquant IFN γ et FGL2, mais aussi indépendant impliquant IDO (Li et al., 2010) (Bézie, Picarda et al., en révision). La cytokine IL-34 sécrétée par les Tregs CD8⁺CD40Ig est également impliquée dans leur fonction suppressive *in vitro* (Bézie, Picarda et al., en préparation). Par ailleurs, les gènes codant pour les molécules du **CMH-II**, notamment les chaînes α et β du RT1.B, sont surexprimés par les Tregs CD8⁺CD40Ig. Environ 30% des Tregs CD8⁺CD40Ig expriment la molécule du CMH-II à leur surface et constituent une sous-population de Tregs dont j'ai étudié le phénotype et la fonction *ex vivo* (Picarda et al., résultats non publiés). Toutefois, le temps consacré à ce projet ayant été minoritaire, je ne développerai pas les résultats obtenus dans une section à part entière mais les aborderai brièvement dans la partie discussion/perspectives.

L'ensemble de ces résultats accumulés au cours de 10 ans de recherche suggère un **rôle important du TCR** dans le développement et la fonction des Tregs CD8⁺ allospécifiques, générées par la transplantation et un blocage de la costimulation. La caractérisation et la compréhension du rôle de l'interaction TCR/CMHp spécifique des Tregs permettrait une meilleure définition de leurs mécanismes moléculaires, une étude approfondie de la population allospécifique générée, et pourrait fournir une aide précieuse au développement de thérapies spécifiques d'antigènes pour inhiber ou réguler les réponses alloimmunes en transplantation. De plus, ce modèle offre l'opportunité d'étudier l'influence de l'interaction TCR/CMHp sur la sélection et la diversité du répertoire, ces facteurs influant eux-mêmes la qualité de la réponse immune après transplantation. En ce sens, mon travail de thèse s'est attaché à caractériser l'**interaction TCR/CMHp** des Tregs CD8⁺CD40Ig et son rôle potentiel dans l'induction, l'expansion et la fonction de ces cellules. Ainsi, j'ai étudié *in vitro* l'allospécificité antigénique du TCR des Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du donneur et le répertoire TCR sélectionné dans la rate et le greffon lors de la transplantation. Par la suite, j'ai analysé le phénotype et la fonction suppressive des Tregs spécifiques d'alloantigènes *in vitro*, mais également leur proportion *in vivo*. Enfin, j'ai exploré le potentiel de l'administration *in vivo* d'allopeptides dans la génération de Tregs CD8⁺ et l'induction de tolérance à l'allogreffe cardiaque.

RESULTATS

Article I

Un peptide dérivé d'une molécule du CMH du donneur, reconnu par des Tregs CD8⁺ biaisées pour le TCR, inhibe le rejet d'allogreffe

Elodie Picarda, Severine Bézie, Aurélie Delhumeau, Klara Echasserieu, Emmanuel Merieau, Karine Renaudin, Sophie Brouard, Karine Bernardeau, Vanessa Venturi, Ignacio Anegon and Carole Guillonueau

Article en révision pour resoumission dans *–Journal of Clinical Investigation–*

Titre original : Donor MHC-derived peptide recognized by TCR biased-CD8⁺ Tregs suppress organ rejection

**Donor MHC-derived peptide recognized by TCR biased-CD8⁺ Tregs
suppress organ rejection**

Elodie Picarda*, Severine Bézie*, Aurélie Delhumeau*, Klara Echasserieau[□], Emmanuel Merieau*, Karine
Renaudin⁺, Sophie Brouard*, Karine Bernardeau[□], Vanessa Venturi[#], Ignacio Anegon* and Carole
Guillonneau*

*INSERM UMR1064 – Center for Research in Transplantation and Immunology-ITUN, Centre Hospitalier
Universitaire Nantes, Faculté de Médecine, Université de Nantes, 30 Bd Jean Monnet, 44093, NANTES
Cedex 01, France;

[#]Computational Biology Group, Centre for Vascular Research, University of New South Wales, Kensington,
Australia;

[□]Plateforme de protéines recombinantes P2R IFR26, CRCNA-UMR892 INSERM, NANTES, France;

⁺Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU - Hôtel DIEU – NANTES, France.

Address correspondence: Dr. Carole Guillonneau, INSERM UMR1064 – Center for Research in
Transplantation and Immunology-ITUN, 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes Cedex 01, France. Phone:
(+33) 2 40087410, Fax: (+33) 2 40087411. E-mail address: carole.guillonneau@univ-nantes.fr

Keywords: transplantation, tolerance, CD8⁺CD45RC^{low} Treg, TCR, MHCp

Running title: MHCII⁺ allopeptides induce tolerance

ABSTRACT (200 words)

In a rat heart allograft model, treatment with CD40Ig leads to indefinite allograft survival mediated by CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells (CD8⁺CD40Ig Tregs), through interaction with plasmacytoid dendritic cells (pDCs). The exact role of TCR/MHC/peptide interaction in Treg activity remains a topic of debate. In the present study, we identified a donor MHC class II-derived peptide (called Du51) recognized by TCR-biased CD8⁺CD40Ig Tregs and activating CD8⁺CD40Ig Tregs, both in their phenotype and suppressive function. We generated a tetramer RT1.A^a/Du51 to track Du51-specific T cells and demonstrated their localization and frequency. We also showed that CD8⁺CD40Ig Tregs express a biased Vbeta 11 (Vβ11) repertoire and are differentially recruited in the spleen vs. the graft. In addition, in the graft, a biased restricted Vβ18 repertoire was identified with shared clonotypes. Finally, we demonstrated that treatment of recipients with this donor MHC class II-derived peptide resulted in significant prolongation of allograft survival. Altogether, these results demonstrated that CD40Ig treatment induced T-cell repertoire alterations that resulted in differential composition of the CDR3β gene segments in the graft or in the periphery and recognition of a same donor antigen with a strong therapeutic potential, highlighting the importance of the TCR/peptide/MHC interaction for Treg generation and function.

INTRODUCTION

Allogeneic human to human transplant remains the best treatment to replace organs that have failed following disease. The incompatibility between the molecules of the major histocompatibility complex (MHC) of the recipient and donor cells is the main barrier to long-term success of organ transplantation. The induction of tolerance to the allograft has become a major objective and certain tolerance strategies are beginning to be applied clinically (1). Different populations of Tregs have been described as being capable of inducing tolerance to allogeneic organs. Most of these Tregs are CD4⁺ Tregs, while CD8⁺ Tregs are less well defined (2).

We have described that costimulation blockade of CD40-CD40L interaction, one of the most efficient strategies to prolong organ allograft survival (3), induces CD8⁺CD45RC^{low} Tregs cells (called CD8⁺CD40Ig Tregs) with potent suppressive capacity (2, 4-6). We showed that donor-specific CD8⁺CD40Ig Tregs but not natural CD8⁺CD45RC^{low} Tregs transferred tolerance to naive transplant recipients. In addition, these cells acted in an unusual way as allograft survival was dependent on their secretion of interferon- γ (IFN γ) to enhance indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression by dendritic cells (DC) and graft endothelial cells (EC) (5). We also recently showed that the suppressive activity of the CD8⁺CD40Ig Tregs was mainly performed in the presence of plasmacytoid DCs (pDCs) and that fibrinogen-like protein 2 (FGL2) was involved in the suppression (6).

The requirement for a TCR interaction in the shaping of the regulatory T cell population is an active and ongoing debate (2, 7). Some studies suggest that TCR specificity and diversity is critical for in vivo function and potency of CD8⁺ Tregs (2, 7-13). Different models for CD4⁺ Tregs have shown that antigen-specific Tregs are more potent suppressor than unrestricted Treg cells (2, 14). It is also known for CD4⁺ Tregs that TCR diversity is critical for thymic selection and differentiation and its impact on Treg generation and function has been recently described (15). High-throughput sequencing has shown that Tregs with higher diversity expand more efficiently, are more adaptable and more efficient than restricted Tregs (13, 16). Using Immunoscope®, we demonstrated that CD8⁺CD40Ig Tregs accumulated a biased repertoire toward the V β 11 element (5), suggesting the possibility of a clonal expansion. To date, little is known on the recognition features of this Treg population, or of CD8⁺ Treg populations in general.

In the present study, we investigated whether CD8⁺CD40Ig Tregs' TCR fine specificity influences Treg function and allograft survival. Here, we have demonstrated for the first time in transplantation that induced CD8⁺CD40Ig Tregs recognized a dominant peptide derived from a polymorphic region of donor MHC class II molecules. This peptide expanded CD8⁺ Tregs in the presence of pDCs, at least *ex vivo*, and induced tolerance in naive transplanted recipients without additional treatment. In addition, this peptide was recognized by Tregs expressing Vβ11 and 18-specific TCRs that comprise a private and diverse repertoire in the spleen, but a more restricted repertoire in the graft, that ensures efficient suppression of alloreactive immune responses.

RESULTS

CD8⁺CD40Ig Tregs activation in vitro.

In order to identify TCR recognition of allogeneic MHC/peptide complexes by CD8⁺CD40Ig Tregs and subsequent activation of their function, we had to select a specific marker of activation allowing analysis by flow cytometry following exposure to antigenic stimulation. Therefore, we screened molecules expressed at different time points by CD8⁺CD40Ig Tregs upon stimulation with polyclonal anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Expression of molecules on freshly isolated CD8⁺CD40Ig Tregs has been previously assessed by Q RT-PCR (5) and demonstrated that among these molecules, CD25 and IFN γ were markers distinguishing CD8⁺CD40Ig Tregs from other cell populations. We analyzed by flow cytometry at day 0, 1, 2, 3 and 6 their expression of CD71, CD25 and IFN γ (**Figure 1**).

We confirmed, at day 0, that CD8⁺CD40Ig Tregs expressed low levels of CD71 (0.83 \pm 0.1%), CD25 (12.74 \pm 6.1%), and IFN γ (5.57 \pm 3.3%). After polyclonal stimulation, CD71, CD25 and IFN γ expression increased significantly from the first day and remained stable over time with respectively 82 \pm 4.5%, 98.1 \pm 1.9% and 91.7 \pm 7% of positive cells at day 6.

In conclusion, we identified three markers of interest to CD8⁺CD40Ig Tregs with low basal expression and significant up-regulation upon stimulation. Since CD25 was the most and the earliest up-regulated marker and since it was a marker previously described by us and others (5, 12), we selected this marker to assess CD8⁺CD40Ig Treg activation for the remaining aspects of this study.

CD8⁺CD40Ig Tregs cells recognized two donor MHC class II-derived peptides.

In the rat MHC-mismatched heart allograft model, donors (RT1.A^u) and recipients (RT1.A^a) are mismatched for all MHC molecules. We therefore aligned donor and recipient MHC amino acids sequences and designed 82 overlapping 16-mer peptides matching the polymorphic domains of donor MHC I and II molecules (**Suppl. Figure 1 and (17-19)**). Peptides were first grouped into pools of 6 to 8 peptides (30 μ g/ml of each peptide) and tested in an *in vitro* assay where immature or mature syngeneic recipient pDCs and sorted-CD8⁺CD40Ig Tregs from CD40Ig-treated long-term allograft bearing recipients were cocultured for 3 or 6 days. With immature pDCs, we observed no significant activation of CD8⁺CD40Ig Tregs at day 3 or day 6

5

with any of the allogeneic pool of peptides (**data not shown**). At day 3, we found a slight upregulation of CD25 expression at the cell surface of a small population of CD8⁺CD40Ig Tregs after stimulation with mature pDCs and pools of allogeneic peptides (**Suppl. Figure 2**). At day 6, we observed a significant upregulation of CD25 expression following allogeneic stimulation (**Suppl. Figure 2**). These results suggested that some allogeneic peptides were efficiently recognized by CD8⁺CD40Ig Tregs and that this recognition led to increased CD25 expression. It also demonstrated that pDCs must be matured in our assay.

We next tested the stimulatory capacity of the 82 individual allopeptides in the presence of naive matured syngeneic pDCs and CD8⁺CD40Ig Tregs purified from long-term survivors in a 6 days culture (**Figure 2A**). We observed that two peptides induced a highly significant upregulation of CD25 expression at the cell surface of CD8⁺CD40Ig Tregs: peptide #31 (called Bu31, 1.67±0.09 fold vs. no peptide, p<0.0001), whose sequence overlaps with peptide #32 sequence (p<0.05), and peptide #51 (called Du51, 2.07±0.18 fold vs. control peptides, p<0.001). Du51 induced a stronger upregulation of CD25 expression compared to Bu31, suggesting that Du51 is the dominant peptide recognized by CD8⁺CD40Ig Tregs, while Bu31 is subdominant. These results demonstrated that antigen-specific CD8⁺CD40Ig Tregs mainly recognized 2 peptides, Bu31 (YLRYS^uSDVGEYRAVTE) and Du51 (NREEYARFDS^uDVGEYR), derived respectively from the β1 chain of donor MHC class II RT1.B^u and RT1.D^u molecules.

CD8⁺CD40Ig Tregs recognized an unusually long allogeneic 15-mer peptide.

To determine the sequence of the natural dominant donor peptide recognized by antigen-specific CD8⁺CD40Ig Tregs, we used a library of degenerated peptides, ranging from 9-mer peptides with 1 amino acids (aa) lagging to 15-mer peptides with two or more aa lagging derived from the dominant 16-mer Du51 (labeled #51-1 to #51-18) (**Figure 2B**). This library's design was based on previous results and published reports (20-23) and tested in the same in vitro assay described above. Interestingly, random peptides libraries have established that rat MHC class I RT1-A^a molecules showed a strong preference for 9 to 15 mer peptides bearing an arginine (R) at the C terminus (23).

None of the derivative 9-mer peptides #51-1 to #51-8 was able to induce activation of CD8⁺CD40Ig Tregs equivalent to the one observed with the 16-mer Du51. However, we were able to induce a much stronger and

significant CD25 upregulation with a 15-mer derivative peptide (51-18) (2.04 ± 0.3 fold vs. no peptide) missing the N-term asparagine (N). Contrary to other derivatives, CD25 upregulation induced by peptide #51-18 was not significantly different from that induced by Du51 (**Figure 2B**).

Altogether, these results showed that a dominant MHC class II-derived 15-mer natural peptide (REEYARFDSVGEYR) was presented by MHC class I to the CD8⁺CD40Ig Tregs and that such presentation induced activation of the specific cells.

Du51-activated CD8⁺CD40Ig Treg cells displayed a modified phenotype and efficiently suppressed antigen-specific activated T cells.

The phenotype of Du51-activated CD8⁺CD40Ig Tregs was analyzed 6 days after stimulation (**Figure 3A and B**). We previously demonstrated that CD8⁺CD40Ig Tregs acted through secretion of high levels of IFN γ , that in turn induced IDO expression by DCs and graft ECs and this action was necessary for tolerance induction in vivo (5). According to these results, we observed that stimulation of CD8⁺ Tregs by the peptide in the presence of pDCs led to significant increased expression of IFN γ , most likely by activated CD8⁺CD40Ig Tregs (**Figure 3A**). In the same culture supernatants, we observed decreased IL-12 production, likely of pDC origin, but no modification of IL-10 and TGF β expression that could be produced by both CD8⁺CD40Ig Tregs and pDCs. We also observed an upregulation of CD71, CD28 and MHC class II, but no modification of Foxp3 expression after 6 days of peptide stimulation (**Figure 3B**).

We previously demonstrated that CD8⁺CD40Ig Tregs, in the presence of allogeneic pDCs or syngeneic pDC and a lysate of donor cells, could suppress the proliferation of syngeneic effector CD4⁺CD25⁻ T cells, showing that CD8⁺CD40Ig Tregs acted through the direct and indirect pathway of allorecognition, and that they are more efficient suppressor cells than naïve CD8⁺CD45RC^{low} Tregs (6). Here, we investigated whether peptide Du51-stimulated CD8⁺CD40Ig Tregs could efficiently suppress effector T cell proliferation compared to CD8⁺CD40Ig Tregs stimulated with a non-activating control peptide. We performed a MLR assay stimulating CD8⁺CD40Ig Tregs for 6 days in the presence of syngeneic pDCs and allogeneic peptides. Stimulated CD8⁺CD40Ig Tregs were then sorted using a FACS Aria and added in a MLR of allogeneic pDCs and syngeneic CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ effector T cells. The proliferation of effector CD4⁺CD25⁻ T cells

was measured 6 days later (**Figure 4**). In the absence of Tregs, 80.5% of CD4⁺CD25⁻ effector T cells proliferated. The addition of CD8⁺CD40Ig Tregs stimulated by a control non-activating peptide did not significantly modify this proliferation. In contrast, addition of freshly purified naïve Tregs or Du51-stimulated Tregs resulted in significant inhibition of the proliferation of effector T cells by CD8⁺CD40Ig Tregs. Thus, Du51-peptide-stimulated CD8⁺CD40Ig Tregs suppress to a greater extent the proliferation of effector cells than CD8⁺CD40Ig Tregs stimulated by a control peptide.

Identification of Du51-specific CD8⁺CD45RC^{low} Tregs using MHC class I tetramer revealed their enrichment in CD40Ig-treated recipients.

An important challenge in transplantation remains the identification of antigen-specific Tregs as they represent a more potent suppressive population and very few natural epitopes have been identified so far. In addition, to date, in the rat and transplantation settings, no tools were available to directly visualize and detect antigen-specific CD8⁺ Treg populations. To that end, we generated a MHC class I tetramer RT1.A^a/Du51 that was labeled with PE and APC and stained specific populations in the spleen and graft (**Figure 5A and B**).

Cells were first stained with a mixture of PE-conjugated and APC-conjugated RT1.A^a/Du51 tetramers, together with a control tetramer RT1.A^a/MTF-E labeled with BV421. This dual fluorochrome strategy, previously described for antigen-specific CD8⁺ effector T cells, allows the discrimination of signal and noise staining, as specific CD8 Tregs will bind equally to each version of RT1.A^a/Du51 tetramer whereas random elements will not (25). Among double positive stained events, non-peptide-specific cells can be visualized and excluded as they bind to a control tetramer bearing the same heavy chain RT1.A^a but with an irrelevant peptide associated. Cells were secondary stained with CD8-PeCy7 and CD45RC-FITC to identify either CD8⁺CD45RC^{low} Tregs or CD8⁺CD45RC^{high} T cells. With such strategy, we were able to identify 2.19±0.6% in the spleen and 1.158±0.25% in the graft of Du51-specific cells among CD8⁺CD40Ig Tregs (**Figure 5A and B**). In the naive splenic CD8⁺CD45RC^{low} Tregs population, we evaluated the precursor frequency at 0.73±0.2%, demonstrating that even 120 days following transplantation and CD40Ig treatment, the frequency was still increased around 3 times and that in untreated animals, we were able to identify a

pool of donor-specific Tregs (**Figure 5A**). This difference was true when looking at the percentage and absolute number of tetramer-positive CD8⁺CD40Ig Tregs or naive CD8⁺CD45RC^{low} T cells among the total organ (0.624±0.128 vs. 0.173±0.071 respectively for percentage and 623800±127700 vs. 172600±70500 for absolute number of total splenocytes, p<0.05). There was also significantly more Du51-specific cells among CD8⁺CD40Ig Tregs than among CD8⁺CD45RC^{high} T cells from untreated or CD40Ig-treated animals, in terms of both the percentage of positive cells among each population and percentage or absolute number among the total spleen, and percentage among the total graft-infiltrating T cells (GITC) (**Figure 5A and B**). There was no difference between CD8⁺CD45RC^{low} and CD8⁺CD45RC^{high} T cells from untreated animals in the spleen (**Figure 5A**). Interestingly, tetramer-positive cells were localized both in the graft and the spleen within the CD8^{high} subset of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs (**Figure 5A and B**).

Altogether, these results demonstrated that we were able to generate a functional RT1A³/Du51 tetramer to detect alloantigen-specific CD8⁺ Tregs, a population that was significantly increased upon transplantation and CD40Ig treatment.

Site-specific accumulation of Vβ-biased CD8⁺CD45RC^{low} T cells.

In naïve T cells, the length distribution of the TCR β-chain CDR3 hypervariable region is Gaussian. Alteration of this Gaussian distribution is the hallmark of activation and selection of T cells in response to antigen. We showed previously that CD8⁺CD40Ig Tregs expressed a specific altered Vβ11 repertoire (and a normal Gaussian-type distribution for all other Vβ families), with the dominant CDR3β length in all animals (9 amino acid) using Immunoscope (5). These previous results suggested the possibility of an oligoclonal expansion of CD8⁺CD40Ig T cells. We first confirmed the preferential expression of the Vβ11 chain by flow cytometry using an anti-mouse Vβ11 antibody that cross-reacts with rat (p<0.01 compared to naïve CD8⁺CD45RC^{low} Tregs) (**Figure 6A and B**). We also investigated the repertoire of GITC from CD40Ig-treated recipients and observed an altered Vβ11 family with a peak of the same CDR3 size in all animals identical to that observed in spleen cells ((5) **and data not shown**). Furthermore, GITC displayed several other Vβ families altered (Vβ1, 7, 15, 17 and 18) with the same predominant CDR3 peak in each of them for all animals. As compared to naïve animals, Vβ11 family transcript accumulation was increased 11-fold in

9

splenic CD8⁺CD40Ig T cells (5) and 40-fold in the GITC while the second family most represented in the graft (Vβ18) in GITC showed an 11-fold increase and a CDR3β length of 7 aa for each animals (**data not shown**).

To confirm that the repertoire analysis of Vβ11 in the spleen and Vβ11 and Vβ18 chains in the graft correlated with tetramer-positive cells, we performed a Vβ repertoire PCR analysis on tetramer-specific sorted Tregs. We observed and confirmed that Du51-specific CD8⁺CD40Ig Tregs sorted from 4 different recipients all recombined the specific Vβ11 and Vβ18 chain (**data not shown**).

The fact that CD8⁺CD40Ig Tregs expressed a selected TCR Vβ11 gene family repertoire suggests an induced immune response, giving support to their memory phenotype, and furthermore, a biased TCR cell response to common antigens. The preferential accumulation of this TCR Vβ11 family repertoire and other TCR Vβ families in the graft as compared to the spleen suggest a preferential migration of biased and expanded-CD8⁺CD40Ig Tregs into the graft (6).

TCR repertoire sequencing reflected differential recruitment of CD8⁺CD40Ig Tregs to the tolerated organ vs. spleen.

To analyze the repertoire of Vβ11⁺ spleen and graft Tregs and Vβ18⁺ graft Tregs, cDNA obtained from naïve or CD40Ig-induced CD8⁺CD45RC^{low} Treg cells from 5 to 7 animals were amplified using Vβ and Cβ specific primers and PCR products were sequenced and analyzed (**Table 1 and Suppl. Table 1**).

According to previous observations (5), sequencing revealed a predominant CDR3β length of 9 amino acid for Vβ11-TCRs across untreated/treated spleen and treated grafts (28.5%, 31.4% and 36.1% respectively), while Vβ18-TCRs selected a 7 amino acid predominant CDR3β length (37.8%) (**Table 1**). The distributions of CDR3 lengths and Jβ gene usage across both the TCR amino acid clonotypes and the TCR repertoires (i.e. accounting for the number of copies of each clonotype) of each animal are shown in **Figure 7** and summarized in **Table 1**. There appears to be less diversity in the Jβ gene usage of the Vβ11 (**Figure 7E**) and Vβ18 (**Figure 7F**) clonotypes obtained from the treated graft compared with the spleen samples. This could be related to the lower diversity in the graft samples. The distributions of CDR3 lengths and Jβ gene usage

across all sequences indicate substantial variations between animals and between groups (**Figure 7 C, D, G, H**), largely due to clonotypes with different CDR3 lengths and J β gene usage dominating in different animals. Furthermore, we should point out that some shared clonotypes for both V β 11 and V β 18-TCR were identified, including one particular V β 18 clonotype (GGWEETQ) that was shared by 3 out of 6 animals (**Suppl. Table 1**).

There was a significant difference in the diversity of the V β 11 repertoires between the spleen of untreated animals and the graft of treated animals, as evaluated by the number of different TCR amino acid clonotypes (**Figure 8A**; $p=0.036$, Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison post-test) and Simpson's diversity index (**Figure 8C**; $p=0.048$). The Simpson's diversity indices reflect the evenness of the clone size distribution across clonotypes. There was also a trend for reduced diversity of the V β 11 repertoires from the spleens of treated animals compared with untreated animals (**Figure 8A, C and Table 1**). Notably, there was substantially greater inter-animal variations in TCR repertoire diversity in the samples obtained from the CD40Ig treated animals compared with the untreated animals. We also observed a reduced number of clonotypes for the V β 18 repertoire of CD40Ig-treated graft compared to previously published V β 18 repertoire from untreated animals (**Figure 8B, D, Table 1 and (26)**).

Altogether, these results highlight the private nature of both the V β 11 and V β 18 TCR repertoires and the substantial clonotypic diversity of TCR-biased CD8⁺CD40Ig Tregs. TCR-biased CD8⁺CD40Ig Tregs that migrate and reside long-term in the graft displayed a more limited and distinct repertoire vs. CD8⁺CD40Ig Tregs that are localized in the spleen.

Tolerance induction by *in vivo* peptide treatment correlated with increase proportion of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs and total inhibition of anti-donor antibody responses.

To further determine the potential of the immuno-dominant peptide identified in the generation *in vivo* of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs and in allograft survival, animals were separately treated using two different protocols of peptide administration with no other treatment. In the first one, animals received five intravenous injections of 500 μ g of peptide (**Figure 9A**). We observed that injections of either control peptide or Du51 were not sufficient to induce a significant prolongation of allograft survival (respectively,

11

11 and 9.5 days, n=4) (**Figure 9A**). In the second one, to improve the efficacy of the treatment, and because such small peptides are rapidly eliminated from the recipient's body, we tested mini-osmotic pumps with a constant intra-peritoneal delivery of 20.8µg of peptide per hour for 28 days, starting day-7 before transplantation. Interestingly, this protocol allowed significant prolongation of allograft survival ($p < 0.01$ compared to control peptide and no treatment) with 25% of indefinite allograft survival using Du51 compared to control peptide (**Figure 9A**).

Grafted hearts and spleens of the long-surviving recipients treated with Du51 were analyzed for signs of chronic rejection, presence of anti-donor antibodies, proportion of $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregs and tetramer-positive Tregs, and *in vitro* suppression towards $CD4^+$ effector T cells (**Figure 9B, C, D and E**). Anatomopathologic analysis of the graft of long-surviving recipients showed no signs of chronic rejection according to a previously established score (27) (**Figure 9B**). In addition, we observed a trend for an increase in the percentage and absolute number of total $CD8^+$ T cells, in particular of $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregs in the spleen (**Figure 9D**), as well as tetramer-positive Du51-specific Tregs (**Figure 9E**), suggesting that antigen-specific $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregs were induced/amplified by *in vivo* peptide treatment, while other subsets were not. We confirmed that these peptide-induced activated $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregs displayed suppressive activity *ex vivo* since they efficiently inhibit effector $CD4^+$ T cell proliferation in the same manner as freshly purified $CD8^+CD40Ig$ Tregs (**data not shown**). Finally, we observed a total inhibition of total IgG, IgG1, IgG2a and IgG2b allo-antibodies responses that could correlate with the absence of chronic rejection (27) (**Figure 9C**).

DISCUSSION

Our current knowledge on how Tregs recognize peptides and the role of this recognition is very limited and mostly based on either transgenic mouse models using CD4⁺ Treg's TCR gene transfer (8, 11) or on murine Qa-1-restricted CD8⁺ Tregs involved in autoimmune disease and cancer and whose Qa-1-peptide repertoire has been described in the last few years (28). However, these studies suggest that antigen-specific Tregs are crucially influencing the outcome of long-term transplantation and contribute to the establishment of tolerance (29). Recent studies have characterized peptides recognized by CD8⁺ Tregs during cancer (an heme oxygenase-1-derived peptide), autoimmunity (V β -derived peptide) or even pregnancy (minor antigen-derived peptide) but not during transplantation (2). Transplantation is a particular setting to identify antigen recognized by Tregs as the presence of the graft is a continuous source of allo-antigens and that is most certainly essential for the function and maintenance of regulatory populations and thus the survival of the grafted organ (30). The recognition of alloantigens in the context of regulation has been shown by us and others to occur mainly by the indirect pathway of presentation, and in particular supported by pDCs (6, 29, 31).

In this report, we demonstrated for the first time that CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, through the indirect pathway of presentation, can recognize one dominant allo-peptide (and one sub-dominant) derived from the β 1 domain of natural donor MHC class II molecules. These peptides share 80-90% homology with human HLA class II molecules and thus could be used to detect CD8⁺ Tregs in human. The identification of natural peptide recognized by regulatory T cells in transplantation is an important goal as new therapeutic strategies using amplified CD4⁺ Tregs are being tested currently in human transplantation (29, 32). The difficulty is that these human CD4⁺ Tregs amplified by non-specific stimulus such as anti-CD3/CD28 antibodies are less efficient than antigen-specific Tregs (2, 33), display limited expansion capacity and are usually outgrown by conventional effector T cells (34). The use of specific antigen to expand Tregs in short-term culture would surely improve clinical settings. As a proof of principle, we used this dominant peptide in untreated grafted recipients, without immunosuppressive treatment, and observed significant prolongation of allograft survival with 25% of recipients showing indefinite tolerance to their allograft. This is the first time this extended survival can be obtained in rats with allopeptide alone (i.e. without immunosuppressive drugs) and clearly

demonstrates both the efficiency of this peptide and the implication of the indirect pathway of presentation in tolerance induction. In addition, this survival was accompanied by a total inhibition of anti-donor antibodies that is probably related to the occurrence of CD8⁺ Tregs after infusion of the allopeptide. This result is important as it shows the potency of peptide-induced Tregs to inhibit acute and chronic allograft rejection occurrence, and opens new possibilities in human transplantation. In addition, such expanded highly suppressive Tregs could provide us with more fundamental information on new and poorly described genes overexpressed with such conditions and that could be used as biomarkers (6). Finally, we could assume that the presence of this population in some groups of patients could be associated with a better prognosis during the course of diseases (35).

We have analyzed different markers potentially expressed by regulatory T cells. Foxp3 does not seem to be an interesting marker of CD8⁺CD40Ig Tregs unstimulated or stimulated with peptide, although upon several rounds of strong anti-CD3/anti-CD28/IL-2 stimulation, we were able to detect important levels of Foxp3 (data not shown). We also found increased IFN γ production and decreased IL-12 expression after specific-peptide stimulation. IFN γ was already shown by us as a crucial cytokine in our model (6). Interestingly, tetramer staining of Du51-specific CD8⁺ Tregs revealed that this population expressed high levels of CD8. Recently, it has been shown that expanded human CD8⁺ Tregs displayed a CD8^{high} phenotype and were capable of inducing long-term tolerance in a humanized mice model of GVHD (36).

Here, we also described that the Du51 peptide displayed an unusual length of 15 amino acids and that shorter peptides that were tested by us failed to induce significant recognition by the CD8⁺CD40Ig Tregs. Most of the literature has focused on short peptides (8-10 amino acids) bound to MHC class I, although it is known that 5-10% of peptides are longer peptides (more than 10 amino acids) that can be presented by MHC class I molecules (37, 38). So far, such peptides have been identified for CTL models and are mostly derived from viral antigens. To our knowledge, we provide the first description of a 15 amino acids peptide that can be structurally recognized by CD8⁺ Tregs, as shown with our RT1A^a/Du51 tetramers. This may imply that such a long super-bulged peptide cannot easily be recognized by TCRs and that only a limited population has access to it (i.e. Tregs vs. effector T cells), and this by extension probably limits the immune response. Recent studies suggested that these long peptides drive a TCR recognition more focused on the peptide (39)

and that TCRs recognize MHC class I peptides of a preferential length (40). The rat MHC class I molecule RT1.A^a has been known to accommodate particularly long peptides, as demonstrated previously by Speir et al in a model of maternally transmitted minor histocompatibility antigen (MTF-E) of 13 residues (24). They showed that important anchor residues (in particular arginine at position 13 (P13)) allowed binding with considerable bulged conformation. This peptide was able to shift conformation and increased potential cross-reactivity, and the conclusion was made that this longer peptide would probably be linked with the development of a special repertoire of tolerant T cells. According to the literature, RT1.A^a selectively binds peptides with key-position residues that is to say Gln, Met or Leu at P2, Phe at P3, Pro at P4 and Arg at the C terminus (21, 22). MTF-E has arginine at C-terminus P13. We also observed that Du51 displayed an Arg at the C-term end.

We previously showed that CD8⁺CD40Ig Tregs preferentially used a TCR that recombined the Vβ11 chain and displayed a CDR3β of 9 amino acids (5). These results suggested the expansion of an oligoclonal population of Tregs. However, sequencing of around 700 CDR3β across six long-surviving animals demonstrated that CD8⁺CD40Ig Tregs displayed a relatively diverse repertoire in the spleen. Nevertheless, a more frequent repeated sequence was found in some animals. Analysis of the TCR repertoire in the graft revealed the predominance of two TCR-Vβ chains: Vβ11 (as in the spleen) and Vβ18. Sequencing revealed a more biased and restricted repertoire than in the spleen, with some shared clonotypes for the Vβ18 TCR. One interesting hypothesis would be that CD8⁺ Tregs bearing such biased and restricted clonotypes are more potent suppressors and migrate early in the graft to exert their inhibitory activity, and then stay localized in the tolerated transplant where immune regulation is required (41). In contrast, CD8⁺CD40Ig Tregs that reside in the spleen but displayed a more diverse and private repertoire (and consequently closer to the naïve Tregs' repertoire) potentially identify distinct regulatory populations (that possibly do not express the same chemokines) that can be recruited upon subsequent inflammation. Although we can find some shared clonotypes for both Vβ11 and Vβ18 (Suppl. Table 1), we could not find public CDR3 sequences. TCR sequences that are shared between individuals tend to be more efficiently produced by a process of convergent recombination (42) and present at a higher frequency in the naïve T cell repertoire (43-45). However, inter-individually shared TCR sequences are not necessarily dominant in the immune response to

antigen (46). This appears to be the case in our model, suggesting that this process may be modified by either TCR expansion or TCR α chain pairing. More recent publications have revealed the important contribution of the alpha-chain in the specific pMHC recognition and how TCR diversity should take into consideration, as some specific TCR V α pairings dictate and alter MHC restriction (47, 48). In the literature, a consensus on TCR diversity was obtained stating that more is the better. This was shown for CD4⁺ Tregs and authors demonstrated that a high TCR diversity ensures optimal Treg expansion and function (13, 16, 49), but this has not yet been described for CD8⁺ Tregs. We were able to produce tetramer of RT1.A^a/Du51, that in addition of being a valuable tool to track antigen-specific cells, can also be used to determine TCR fine specificity and affinity. The current thought is that, in contradiction to effector T cells whose high-affinity TCR might be more advantageous and confer improved function, regulatory T cells do not need high affinity TCRs and function is not improved nor affected by augmented TCR affinity (50). To note, as in the donor-specific blood transfusion model of induction of long-term allograft survival, we identified in the graft a bias in the repertoire toward the V β 18 chain and further sequencing of that V β 18-TCR revealed some public clonotypes in some recipients. The public sequence described by Douillard et al. was only found once in one animal of your study and did not represent the V β 18-repertoire in our model (26). In our model, the V β 18 chain did not represent the dominant TCR rearrangement, although TCRs bearing that chain accumulated in the graft 120 days after transplantation. The repertoire analysis of Douillard et al. was performed during the first days after transplantation so we cannot exclude the presence of such clones at early time points, but we could argue that they probably identify a distinct population of CD8⁺ Tregs.

In conclusion, our study indicates that MHC class II donor antigen can be used to boost antigen-specific CD8⁺ Treg generation and/or function, and that in turn, these Tregs inhibit anti-donor immune responses allowing the establishment of a true tolerance. We also demonstrated that in accordance with CD4⁺ Tregs, CD8⁺ Tregs' TCRs display a private and relatively diverse repertoire, dependent on organ location, that ensures efficient expansion and suppression of alloreactive immune responses. Altogether, these results highlight the importance of the TCR, of its interaction with MHC/peptide and open new possibilities in the generation of this population that could be transferrable in human settings.

MATERIALS AND METHODS

Animals and cardiac transplantation models.

Allotransplantations of heart were performed between whole MHC incompatible LEW.1W (RT1.A^u as donors) and LEW.1A (RT1.A^a as recipients) male rats as previously described (5). The experiments were approved by the regional ethical committee for animal experimentation.

Adenovirus-mediated gene transfer.

The recombinant non-coding adenovirus (Ad) Add324 and the Ad encoding for the extracellular portion of mouse CD40 fused to the constant domains of human IgG1 (AdCD40Ig) with the mouse CMV promoter as well as the procedure of intragraft delivery have been described previously (5). Briefly, adenoviral particles ($2 \cdot 10^{10}$ infectious particles) were slowly injected at 3 points into the cardiac ventricular walls.

Peptides libraries.

16-mer overlapping peptide libraries with 4 amino acids lagging were designed to cover the entire polymorphic sequences of MHC-I RT1.A^u (alpha 1, 2 and 3 domains), MHC-II RT1.B^u (all domains) and MHC-II RT1.D^u (alpha2 and beta1 domains) as previously published (17-19) and manufactured by GL Biochem Ltd (Shanghai, China). Lyophilized peptides were dissolved in 0.4% sterile DMSO / sterile water and stored at -80°C. The control peptides were derived from donor and recipient matched sequences.

Degenerated 9 to 15-mer overlapping peptides with 1 to 2 amino acid lagging were designed to cover the sequence of positively isolated 16-mer peptide and synthesized by GL Biochem Ltd (Shanghai, China).

All peptides were shown to be >95% homogeneous by analytical reverse phase HPLC and amino acid sequences were confirmed.

Peptides were diluted in complete RPMI-1640 at a concentration of 120µg/ml.

Cell purification.

T cells were purified as previously described (6). Briefly, total splenocytes were depleted with a cocktail of anti-γδ T cells (V65), anti-CD45RA cells (OX33), anti-CD161 NK cells (3.2.3) and anti-CD11b/c

monocytes (OX42) using magnetic beads (Dyna). Enriched T cells were labeled with anti-CD45RC-biotin (OX22) and Streptavidin-PE-Cy7, anti-CD8 α -PE (OX8), anti-TCR $\alpha\beta$ -Alexa 647 (R73) and anti-CD25-FITC (OX39) mAbs. CD8⁺CD45RC^{low} T cells and CD4⁺CD25⁻ T cells were sorted after gating of TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells with FACSAria (BD Biosciences, Mountain View, CA). Purity of sorted populations was greater than 99%.

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) were purified as previously described (6). Briefly, splenocytes recovered after collagenase digestion were further purified by negative depletion with anti-TCR (R73 and V65) T cells and anti-CD45R (OX33) B cells mAbs. Enriched cells were labeled with anti-CD45R-PE (His24), anti-CD4-APC (OX35), anti-TCR-FITC (R73) and anti-CD45RA-FITC (OX33). pDCs, defined as CD45R and CD4 positive cells, were sorted after gating on FITC negative cells.

Mixed lymphocyte reaction.

For MLR coculture assays, pDCs from LEW.1A naive rats (1.25×10^4 cells), syngeneic CD8⁺CD40Ig Tregs (5×10^4 cells) and 120 $\mu\text{g/ml}$ of allogeneic peptides were plated in triplicate in 200 μl of complete RPMI-1640 medium in round-bottom 96 wells plates for 6 days at 37°C, 5% CO₂. pDCs were matured with 0.5 μM of CpG ODN 1826.

For MLR suppressive assays, CFSE labeled CD4⁺CD25⁻ T cells from LEW.1A origin (5×10^4 cells) and pDCs isolated from donor LEW.1W animals (1.25×10^4 cells) were plated in triplicate for 6 days in a final volume of 200 μl of completed RPMI-1640 medium in round-bottom 96 wells plates with FACS-sorted freshly purified naive CD8⁺CD45RC^{low} Treg cells or peptide-expanded CD8⁺CD40Ig Treg cells (5×10^4 cells).

For anti-CD3/anti-CD28 stimulations, round-bottom 96 wells plates were coated with anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$, BD Pharmingen) and anti-CD28 (10 $\mu\text{g/ml}$) mAbs for 1 hour at 37°C, 5% CO₂, then washed and 5.10^4 CD8⁺CD40Ig Treg cells were added to each well in 200 μl completed RPMI-1640 for 1, 2, 3 and 6 days.

Proliferation of CFSE-labeled naïve CD4⁺CD25⁻ T cells and phenotype of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were analyzed by flow cytometry on a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) after gating on TCR⁺CD4⁺ cells or TCR⁺CD8⁺ cells among live cells (DAPI negative).

Extracellular and intracellular staining.

For extracellular staining, cells were stained with the following mAbs: anti-TCR $\alpha\beta$ (R73, Alexa Fluor 647–conjugated), anti-CD8 α (OX8, PE-Cy7-conjugated, ebiosciences), anti-CD4 (W3.25, PE-Cy7-conjugated), anti-CD45RC (OX22, FITC-conjugated), anti-CD28 (JJ319, biotin-labeled), anti-CD71 (OX26, biotin-labeled), anti-mouse Vb11 (KT11, biotin-labeled, AbD Serotec) anti-CD25 (OX39, biotin-labeled) and anti-MHC-II (OX6, biotin-labeled).

For intracellular staining, 10 μ g/ml of brefeldin A was added to the culture 4 hours before extracellular staining. Cells were then stained for intracellular IFN γ (DB1-FITC, kindly provided by Dr Van Der Meisle, Netherlands) and Foxp3 (biotin-labeled, ebiosciences) using BD cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

All biotinylated mAbs were visualized using Streptavidin-PerCP.Cy5.5 (BD Biosciences). A FACSCanto II cytofluorimeter (BD Biosciences, Mountain View, CA) was used to measure fluorescence, and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc. USA, version 7.6.5). Cells were first gated by their morphology and dead cells excluded by selecting DAPI negative viable cells.

Cytokine assays.

IFN γ , IL-10 were measured in coculture supernatants using ELISA from BD Biosciences OptEIA, IL-12 and TGF β using ELISA from Invitrogen and R&D System respectively.

Production of biotinylated RT1-A^a-peptide complexes.

Briefly, the heavy chain RT1-A^a and the β 2microglobuline (β 2m) were cloned in pET24 and produced in Escherichia coli BL21-DE3. Recombinant proteins were produced as inclusion bodies, dissolved in 8M urea and refolded in vitro as previously described for human HLA-A2/peptide complexes (51). RT1-A^a, β 2m and Du51 peptide were refolded in 0,4M L-arginine, 0,1M Tris pH8, 2mM EDTA, 5mM reduced glutathione, and 0,5mM oxydated glutathione for 5 days at 4°C. The solution was then concentrated and the buffer changed on amicon membrane 10 Kd (Millipore, Bedford, MA). Folded MHC/peptide complexes were

biotinylated with the BirA enzyme (Avidity, Denvers CO) for 5h at 30°C and desalted on Hiprep 26/10 desalting column (GE Healthcare). MHC/peptide complexes were then purified by anion exchange Q-Sepharose chromatography. Biotinylation was tested by tetramerization with streptavidin (Sigma Aldrich) at a molar ratio of 4:1.

Tetramerization and staining.

Tetramerization of RT1.A^a/Du51 was performed at room temperature by addition of streptavidin-PE (Jackson ImmunoResearch) or streptavidin-APC (BD Biosciences) at a 4:1-molar ratio, in 4 equal aliquots added at 15-min intervals. Likewise, the control tetramer RT1.A^a/MTF-E (ILFPSSERLISNR) was conjugated to streptavidin-BV421 (Biolegend) and represented 1.6+/-0.7% of non-specific staining among Du51-specific cells. These 3 reagents were mixed and added to plated cells at 10 µg/mL for 1 hour at 4°C. Cells were further stained for CD8 and CD45RC and fluorescence was analyzed on a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA). Cells were first gated by their morphology and dead cells excluded by selecting 7-AAD (BD Biosciences) negative cells.

PCR and sequencing.

cDNA was obtained as previously described (5). Briefly, total RNA was isolated and reverse transcribed using an MMLV Reverse-Transcriptase kit and according to manufacturer's instructions (Invitrogen). cDNA were amplified by PCR using a Cβ primer and a Vβ11 primer described previously (26). PCR products were loaded onto a 2% agarose gel and electrophoresed. A ~300 bp band corresponding to PCR product was purified using Nucleospin extract II kit (Macherey Nagel, Germany). Purified PCR products were further ligated into pCR®2.1-TOPO® vector (TOPO TA cloning® kit, Invitrogen France) according to the manufacturer's instruction and single bacterial colonies were used for sequencing the TCR CDR3β regions.

TCR repertoire analysis.

The diversities of the TCR repertoires for each individual were evaluated using two different measures of diversity, the number of different TCR amino acid clonotypes and Simpson's diversity index (52).

Simpson's diversity index accounts for the clonal dominance hierarchy and provides a relative measure of diversity that ranges in value from 0 (minimal diversity) to 1 (maximal diversity). To account for differences in the sizes of the TCR repertoire samples, the TCR repertoire diversity measures were estimated for each animal as the median value of 10,000 random draws of subsamples of 44 TCR sequences (i.e. the number of V β 11 sequences obtained from the graft of treated Animal 1, which was the minimum sample size across all animals) from the total TCR repertoire sample for each individual (52). The diversity measures were calculated using Matlab (The Mathworks, Natick, MA).

Peptides treatment in vivo.

16-mer peptides were dissolved in 0.4% DMSO/PBS (500 μ g/injection) before injection. For the first protocol, single doses of peptide (500 μ g/injection) were injected intravenously at different time points before and after transplantation at day -6, -3, 0 +3 and +6 into grafted LEW.1A recipients. In the second protocol, mini osmotic pumps (ALZET, Cupertino, CA, USA) were implanted intraperitoneally in recipients and delivered continuously 20.83 μ g/hour of 16-mer peptides for 14 days. A first pump was implanted on day -7 before transplantation and was replaced by a second one at day +7, allowing delivery of 14mg of peptide per animal for 28 consecutive days. Allografts were monitored daily by palpation and allograft rejection was defined as complete cessation of palpable heart beat.

Morphometric analysis of cardiac grafts.

The upper third of the graft was fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five μ m coronal sections were stained with hematoxylin-eosine-safron. Tissues were analyzed by a pathologist (K.R.) blinded to the groups and chronic rejection was evaluated as previously described (53).

Donor specific alloantibody detection.

Allo-antibodies were analyzed by cytofluorimetry as described elsewhere (27). Briefly, after digestion by collagenase D and red blood cell lysis, allogeneic spleen cells were incubated with diluted (1/8) heat-inactivated serum, and then with FITC-conjugated goat anti-rat IgG antibodies (H+L chain specific) (Jackson Laboratories), a mouse anti-rat IgG1 MAb (MCA 194, Serotec), IgG2a (MCA 278, Serotec) or

IgG2b (MCA 195, Serotec). Antibody binding was revealed using FITC-coupled F(ab)² goat anti-mouse IgG (Jackson Laboratories). Cells were analyzed using a FACS Canto II cytofluorimeter (BD Biosciences, Mountain View, CA) and the results were expressed as mean channel fluorescence for each serum.

Statistical analysis

For the peptide activation test, a non-parametric Wilcoxon signed-rank test, comparing column median to a hypothetical value of 1.0, was done. Statistical significance for the TCR V β 11 expression, phenotype of activated cells, cytokine expression, proliferation assay and tetramer staining was evaluated by a two-tailed Mann Whitney t test. Graft survival was analyzed by Kaplan-Meier log-rank test. The Two-Way ANOVA test and Bonferroni post-tests were used for donor-specific antibody analysis and splenocyte phenotypic characterization. For the diversity analysis, Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison post-test were performed. Analyses were made with GraphPad Prism 5.04 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) and a P-value less than 0.05 was considered significant.

Acknowledgments

We thank Dr F-Xavier Hubert for review of the manuscript and Claire Usal and Bernard Martinet for technical assistance in animal models. We thank the Vector Core of the University Hospital of Nantes, which is supported by the Association Française Contre les Myopathies, for producing the adenoviral vectors. We thank the Fondation Progreffe for financial support and Crédit Agricole for the donation of the FACSaria. This work was supported by a Marie Curie fellowship from the 6th FP of the EU awarded to C.G., an INSERM-Region Pays de la Loire Fellowship awarded to E.P., and an Australian Research Council Future Fellowship awarded to V.V.

REFERENCES

1. Bluestone, J.A., Auchincloss, H., Nepom, G.T., Rotrosen, D., St Clair, E.W., and Turka, L.A. 2010. The Immune Tolerance Network at 10 years: tolerance research at the bedside. *Nat Rev Immunol* 10:797-803.
2. Guillonneau, C., Picarda, E., and Anegeon, I. 2010. CD8+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 15:751-756.
3. Li, X.L., Menoret, S., Le Mauff, B., Angin, M., and Anegeon, I. 2008. Promises and obstacles for the blockade of CD40-CD40L interactions in allotransplantation. *Transplantation* 86:10-15.
4. Guillot, C., Guillonneau, C., Mathieu, P., Gerdes, C.A., Menoret, S., Braudeau, C., Tesson, L., Renaudin, K., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., et al. 2002. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 168:1600-1609.
5. Guillonneau, C., Hill, M., Hubert, F.X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X.L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., et al. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:1096-1106.
6. Li, X.L., Menoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 185:823-833.
7. Picarda, E., Anegeon, I., and Guillonneau, C. 2011. T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy* 3:35-37.
8. Tsang, J.Y., Ratnasothy, K., Li, D., Chen, Y., Bucy, R.P., Lau, K.F., Smyth, L., Lombardi, G., Lechler, R., and Tam, P.K. 2011. The potency of allospecific Tregs cells appears to correlate with T cell receptor functional avidity. *Am J Transplant* 11:1610-1620.
9. Joffre, O., Santolaria, T., Calise, D., Al Saati, T., Hudrisier, D., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P. 2008. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 14:88-92.

10. Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1455-1465.
11. Tsang, J.Y., Tanriver, Y., Jiang, S., Xue, S.A., Ratnasothy, K., Chen, D., Stauss, H.J., Bucy, R.P., Lombardi, G., and Lechler, R. 2008. Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* 118:3619-3628.
12. Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F.O., Lechler, R.I., and Lombardi, G. 2011. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 3:83ra42.
13. Wing, J.B., and Sakaguchi, S. 2011. TCR diversity and Treg cells, sometimes more is more. *Eur J Immunol* 41:3097-3100.
14. Masteller, E.L., Tang, Q., and Bluestone, J.A. 2006. Antigen-specific regulatory T cells--ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol* 18:103-110.
15. Ohkura, N., and Sakaguchi, S. 2010. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 32:95-106.
16. Fohse, L., Suffner, J., Suhre, K., Wahl, B., Lindner, C., Lee, C.W., Schmitz, S., Haas, J.D., Lamprecht, S., Koenecke, C., et al. 2011. High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 41:3101-3113.
17. van Denderen, B., Peche, H., Gagne, K., Usal, C., Cuturi, M.C., and Soulillou, J.P. 2001. Identification of immunodominant donor MHC peptides following rejection and donor strain transfusion-induced tolerance of heart allografts in adult rats. *Eur J Immunol* 31:1333-1339.
18. Ballet, C., Renaudin, K., Degauque, N., Le Mai, H., Boëffard, F., Lair, D., Berthelot, L., Feng, C., Smit, H., Usal, C., et al. 2008. Indirect CD4+ TH1 response, anti-donor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long term recipients conditioned by donor antigens priming. *Am J Transplant* 9:697-708.

19. Ettinger, R.A., Moustakas, A.K., and Lobaton, S.D. 2004. Open reading frame sequencing and structure-based alignment of polypeptides encoded by RT1-Bb, RT1-Ba, RT1-Db, and RT1-Da alleles. *Immunogenetics* 56:585-596.
20. Thorpe, C.J., Moss, D.S., Powis, S.J., Howard, J.C., Butcher, G.W., and Travers, P.J. 1995. An analysis of the antigen binding site of RT1.Aa suggests an allele-specific motif. *Immunogenetics* 41:329-331.
21. Powis, S.J., Young, L.L., Joly, E., Barker, P.J., Richardson, L., Brandt, R.P., Melief, C.J., Howard, J.C., and Butcher, G.W. 1996. The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 4:159-165.
22. Stevens, J., Wiesmuller, K.H., Barker, P.J., Walden, P., Butcher, G.W., and Joly, E. 1998. Efficient generation of major histocompatibility complex class I-peptide complexes using synthetic peptide libraries. *J Biol Chem* 273:2874-2884.
23. Stevens, J., Wiesmuller, K.H., Walden, P., and Joly, E. 1998. Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries. *Eur J Immunol* 28:1272-1279.
24. Speir, J.A., Stevens, J., Joly, E., Butcher, G.W., and Wilson, I.A. 2001. Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa. *Immunity* 14:81-92.
25. Chattopadhyay, P.K., Melenhorst, J.J., Ladell, K., Gostick, E., Scheinberg, P., Barrett, A.J., Wooldridge, L., Roederer, M., Sewell, A.K., and Price, D.A. 2008. Techniques to improve the direct ex vivo detection of low frequency antigen-specific CD8⁺ T cells with peptide-major histocompatibility complex class I tetramers. *Cytometry A* 73:1001-1009.
26. Douillard, P., Pannetier, C., Josien, R., Menoret, S., Kourilsky, P., Soulillou, J.P., and Cuturi, M.C. 1996. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 157:1250-1260.
27. Guillonneau, C., Seveno, C., Dugast, A.S., Li, X.L., Renaudin, K., Haspot, F., Usal, C., Veziers, J., Anegon, I., and Vanhove, B. 2007. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 179:8164-8171.

28. Kim, H.J., and Cantor, H. 2011. Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8(+) regulatory T cells. *Semin Immunol* 23:446-452.
29. Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 12:417-430.
30. Hamano, K., Rawsthorne, M.A., Bushell, A.R., Morris, P.J., and Wood, K.J. 1996. Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor microchimerism is essential for maintenance of tolerance to alloantigen in vivo in anti-CD4 treated recipients. *Transplantation* 62:856-860.
31. Gokmen, M.R., Lombardi, G., and Lechler, R.I. 2008. The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 20:568-574.
32. Safinia, N., Leech, J., Hernandez-Fuentes, M., Lechler, R., and Lombardi, G. 2013. Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy. *Clin Exp Immunol* 172:158-168.
33. Renner, P., Popp, F.C., Eggenhofer, E., Slowik, P., Piso, P., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., and Dahlke, M.H. 2010. Antigen-specific recognition is critical for the function of regulatory CD8(+)CD28(-) T cells. *Transpl Immunol* 22:144-149.
34. Tang, Q., Bluestone, J.A., and Kang, S.M. 2012. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *J Mol Cell Biol* 4:11-21.
35. Ordonez, L., Bernard, I., L'Faqihi-Olive, F.E., Tervaert, J.W., Damoiseaux, J., and Saoudi, A. 2009. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One* 4:e5287.
36. Zheng, J., Liu, Y., Liu, M., Xiang, Z., Lam, K.T., Lewis, D.B., Lau, Y.L., and Tu, W. 2013. Human CD8+ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. *Sci Transl Med* 5:168ra169.
37. Burrows, S.R., Rossjohn, J., and McCluskey, J. 2006. Have we cut ourselves too short in mapping CTL epitopes? *Trends Immunol* 27:11-16.

38. Hickman, H.D., Luis, A.D., Buchli, R., Few, S.R., Sathiamurthy, M., VanGundy, R.S., Giberson, C.F., and Hildebrand, W.H. 2004. Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J Immunol* 172:2944-2952.
39. Liu, Y.C., Chen, Z., Burrows, S.R., Purcell, A.W., McCluskey, J., Rossjohn, J., and Gras, S. 2012. The energetic basis underpinning T-cell receptor recognition of a super-bulged peptide bound to a major histocompatibility complex class I molecule. *J Biol Chem* 287:12267-12276.
40. Ekeruche-Makinde, J., Miles, J.J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Cole, D.K., Dolton, G., Schauenburg, A.J., Tan, M.P., Pentier, J.M., Llewellyn-Lacey, S., et al. 2013. Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood* 121:1112-1123.
41. Hayashi, Y., Tsukumo, S., Shiota, H., Kishihara, K., and Yasutomo, K. 2004. Antigen-specific T cell repertoire modification of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5240-5248.
42. Venturi, V., Price, D.A., Douek, D.C., and Davenport, M.P. 2008. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol* 8:231-238.
43. Quigley, M.F., Greenaway, H.Y., Venturi, V., Lindsay, R., Quinn, K.M., Seder, R.A., Douek, D.C., Davenport, M.P., and Price, D.A. 2010. Convergent recombination shapes the clonotypic landscape of the naive T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19414-19419.
44. Robins, H.S., Srivastava, S.K., Campregher, P.V., Turtle, C.J., Andriesen, J., Riddell, S.R., Carlson, C.S., and Warren, E.H. 2010. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci Transl Med* 2:47ra64.
45. Venturi, V., Quigley, M.F., Greenaway, H.Y., Ng, P.C., Ende, Z.S., McIntosh, T., Asher, T.E., Almeida, J.R., Levy, S., Price, D.A., et al. 2011. A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing. *J Immunol* 186:4285-4294.
46. Thomas, P.G., Handel, A., Doherty, P.C., and La Gruta, N.L. 2013. Ecological analysis of antigen-specific CTL repertoires defines the relationship between naive and immune T-cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1839-1844.

-
47. Day, E.B., Guillonneau, C., Gras, S., La Gruta, N.L., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Purcell, A.W., Rossjohn, J., and Turner, S.J. 2011. Structural basis for enabling T-cell receptor diversity within biased virus-specific CD8⁺ T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9536-9541.
 48. Turner, S.J., and Rossjohn, J. 2011. alphabeta T cell receptors come out swinging. *Immunity* 35:660-662.
 49. Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.H., Relland, L.M., et al. 2011. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35:109-122.
 50. Plesa, G., Zheng, L., Medvec, A., Wilson, C.B., Robles-Oteiza, C., Liddy, N., Bennett, A.D., Gavarret, J., Vuidepot, A., Zhao, Y., et al. 2012. TCR affinity and specificity requirements for human regulatory T-cell function. *Blood* 119:3420-3430.
 51. Garboczi, D.N., Hung, D.T., and Wiley, D.C. 1992. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3429-3433.
 52. Venturi, V., Kedzierska, K., Turner, S.J., Doherty, P.C., and Davenport, M.P. 2007. Methods for comparing the diversity of samples of the T cell receptor repertoire. *J Immunol Methods* 321:182-195.
 53. Guillonneau, C., Louvet, C., Renaudin, K., Heslan, J.M., Heslan, M., Tesson, L., Vignes, C., Guillot, C., Choi, Y., Turka, L.A., et al. 2004. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 172:1619-1629.

Figure 1. Picarda et al.

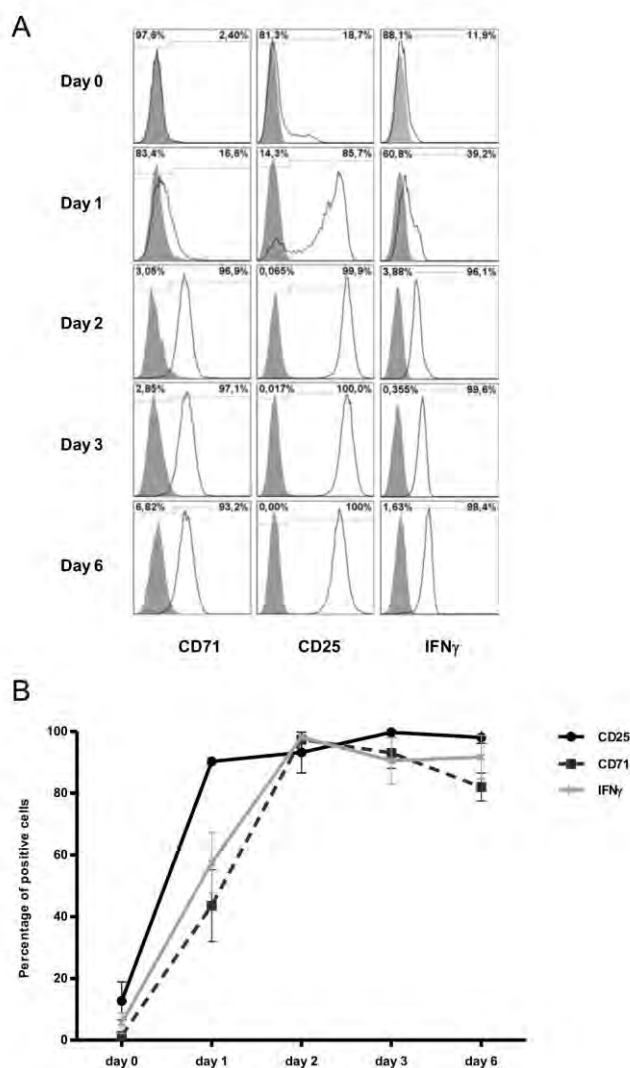


Figure 1: Screening of CD8⁺ Tregs activation markers by flow cytometry. (A) CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were isolated from the spleens of CD40I_g-treated rats by cell sorting and analyzed for their expression of T cell activation markers at day 0 and after 1 to 6 days of polyclonal stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies. Grey filled histograms represent the isotype control staining. (B) Data are summarized, plotting means \pm SEM. n=3.

Figure 2. Picarda et al.

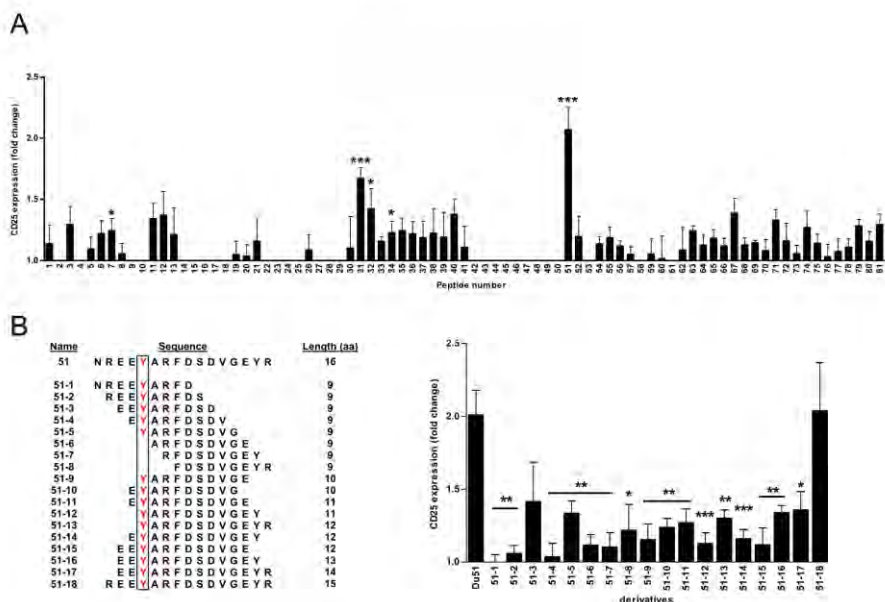


Figure 2: Analysis of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs activation in response to donor-derived peptides stimulation. (A) CD8⁺ Tregs were cocultured for 6 days with syngeneic CpG-matured pDCs in the presence of peptides. For each experiment, the percentage of CD25 positive Tregs after 6 days of coculture with pDCs only, was given the value 1. Mean value 1 is equal to 32.85 ± 1.98%. Results are expressed as the ratio ± SEM between the percentage of CD25 positive cells after peptide stimulation and percentage of CD25 positive cells in the control condition without peptide. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus control condition (value 1.0). n=4 to 18 for each peptide. (B) Analysis of Treg activation in response to Du51-shorter peptide derivatives. On the left, 18 Du51-derivatives are detailed and classified by amino acids sequence length, from 9 aa to 15 aa. The box highlights mismatched amino acids between the donor and recipient. On the right, Treg activation in response to Du51-derivatives was analyzed by CD25 expression. CD8⁺ Tregs were cocultured for 6 days with syngeneic CpG-matured pDCs in the presence of each peptide. Bars represent the ratio between the percentage of CD25 positive cells after peptide stimulation and percentage of CD25 positive cells in the control condition without peptide. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus Du51 condition. n=3 to 14 for each peptide.

Figure 3. Picarda et al.

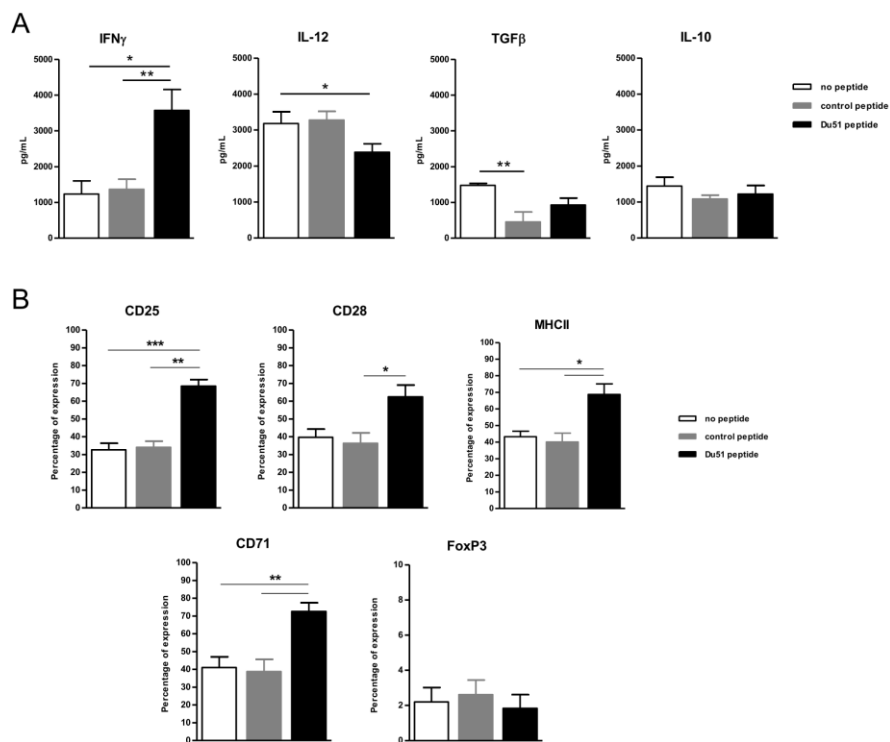


Figure 3: CD8⁺ Tregs phenotype following ex vivo allo-peptide stimulation. (A) Tregs and syngeneic CpG-matured pDCs were cultured for 6 days, alone, with a control peptide or with Du51 peptide. Expression of indicated markers was analyzed on CD8⁺ Tregs in the culture supernatant by ELISA (A) or by flow cytometry (B) after in vitro stimulation. Graphs represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 4$ to 7.

Figure 4. Picarda et al.

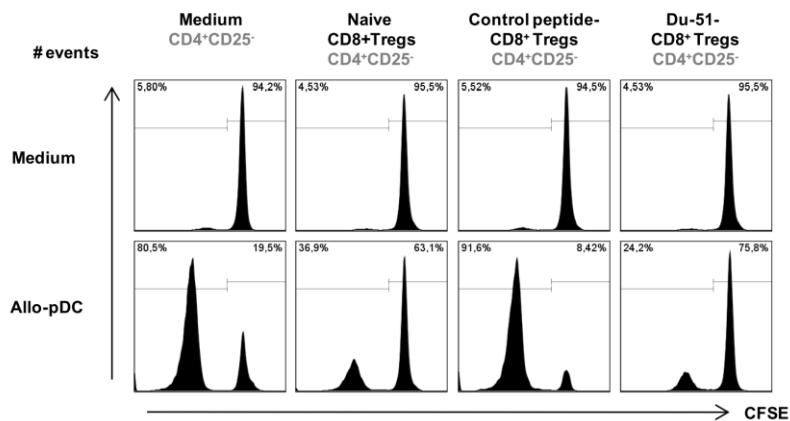


Figure 4: Du51-activated Tregs displayed efficient suppressive activity. Fresh CD8⁺CD40Ig Tregs and syngeneic CpG-matured pDCs were cocultured for 6 days with peptides. At day 6, Tregs were isolated by cell sorting (TCR⁺) and their regulatory function was analyzed by measuring their capacity to suppress MLR assay. The proliferation of naïve CFSE-labeled LEW.1A CD4⁺CD25⁻ T cells stimulated with donor LEW.1W pDCs was analyzed after 6 days of culture, in the absence or presence of naive LEW.1A freshly isolated or 6 days peptides-stimulated CD8⁺ Tregs at a 1:1 ratio effector:suppressor. Plots are representative of 4 independent experiments.

Figure 5. Picarda et al.

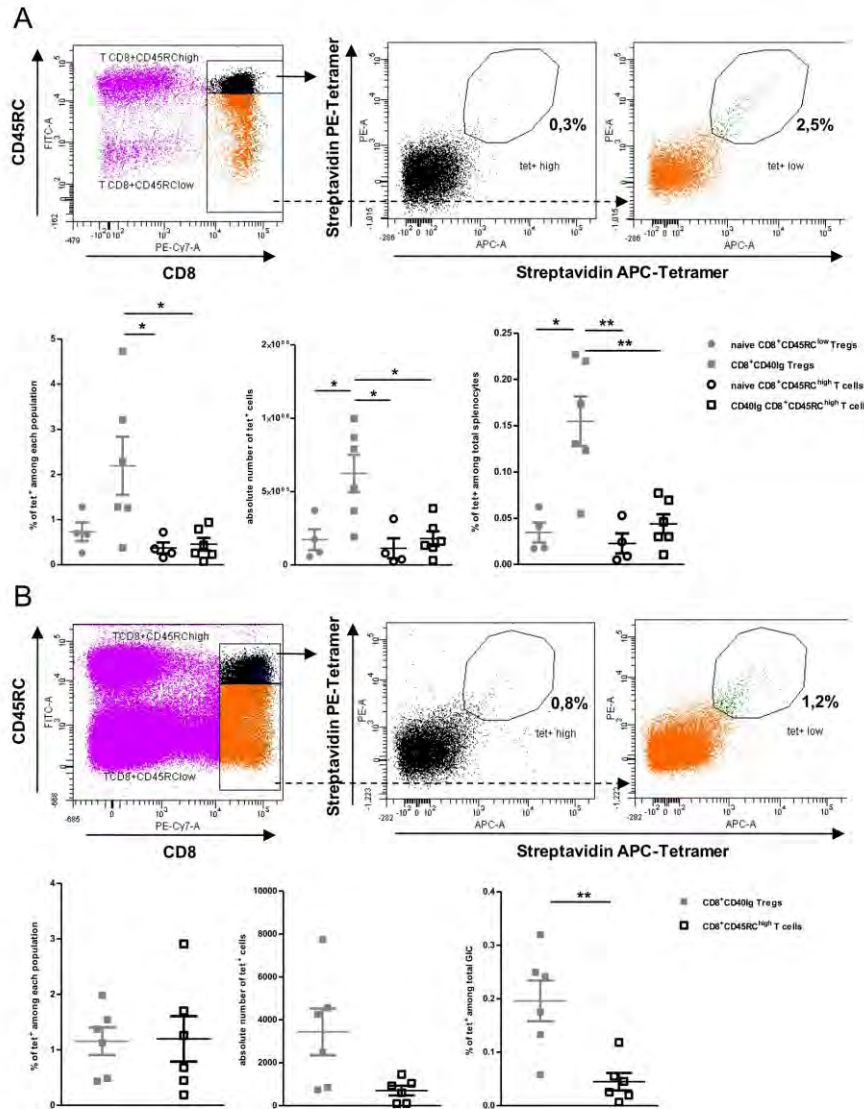


Figure 5: Enrichment of Du51-specific Tregs in long-term CD40lg-treated recipients. Spleen (A) and graft (B) of long-surviving recipients or untreated animals were incubated with RT1.A³/Du51 tetramers labeled with streptavidin conjugated to phycoerythrin (PE) and allophycocyanin (APC). Top panels show representative plots. Bottom panels show results plotted into graphs for percentage of tetramer⁺ cells among each population (left), absolute number of cells (mid) and % of total organ cells (right) ± SEM. *p<0.05, **p<0.01.

Figure 6. Picarda et al.

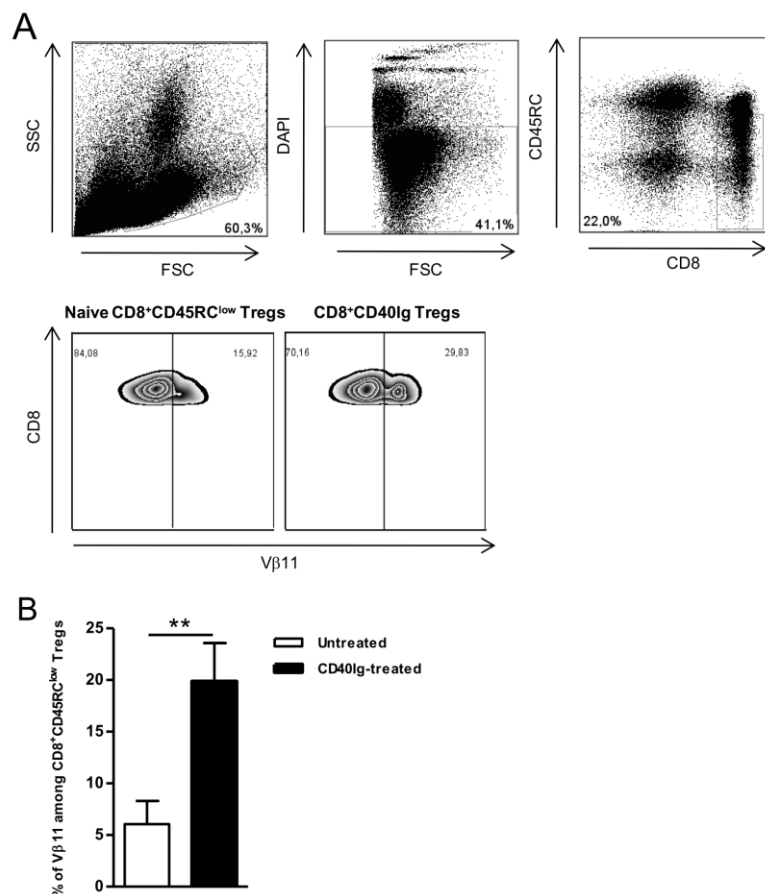


Figure 6: Vbeta 11 chain was preferentially recombined in CD8⁺CD45RC^{low} T cells. (A) Vβ11 chain protein expression by CD8⁺CD45RC^{low} T cells from untreated LEW.1A and CD40Ig-treated rats. Background was measured with a control isotype antibody and is less than 9%. Data are representative of nine independent experiments. (B) Data are summarized and background non-specific staining was subtracted, plotting mean ± SEM of Vβ11 positive cells. **p<0.01, n=8 and 9 for untreated and CD40Ig-treated rats, respectively.

Figure 7. Picarda et al.

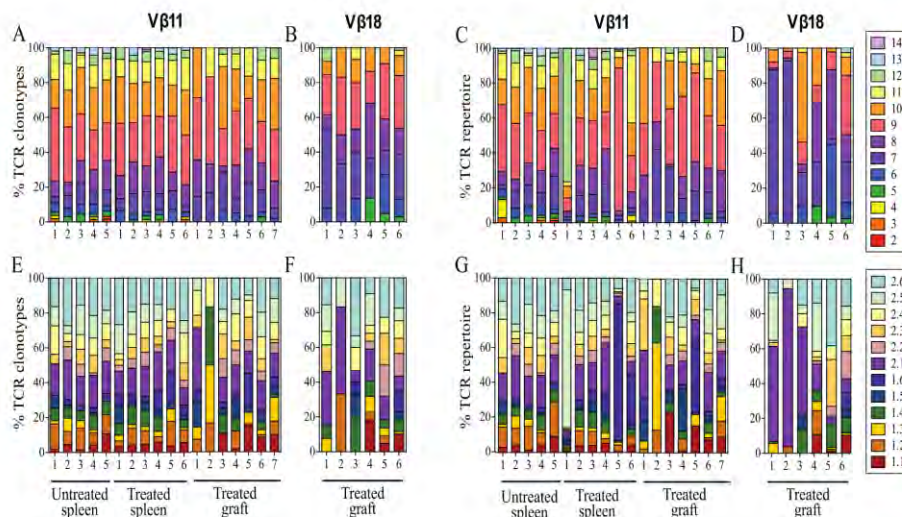


Figure 7: Comparison of the features of Vβ11 and Vβ18 TCR repertoires obtained from CD8⁺CD45RC^{low} Tregs of the spleens or GITCs of the grafts from CD401g-treated and untreated animals. Shown are the percentages of the TCRβ amino acid clonotypes (A, B, E, F) and the TCRβ repertoires (i.e. including clonal dominance)(C, D, G, H) for each CD401g-treated and untreated animal that have a particular CDR3 length (A-D) and Jβ gene usage (E-H).

Figure 8. Picarda et al.

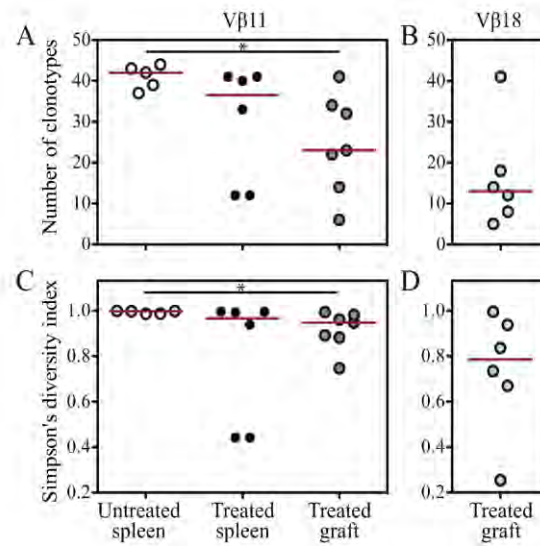


Figure 8: Comparison of TCR β repertoire diversity between the spleen and graft from CD40Ig-treated and untreated animals. The number of TCR amino acid clonotypes (A, B) and Simpson's diversity indices (B, C) were estimated for a sample size of 44 TCR sequences per individual repertoire.* p<0.05.

Figure 9. Picarda et al.

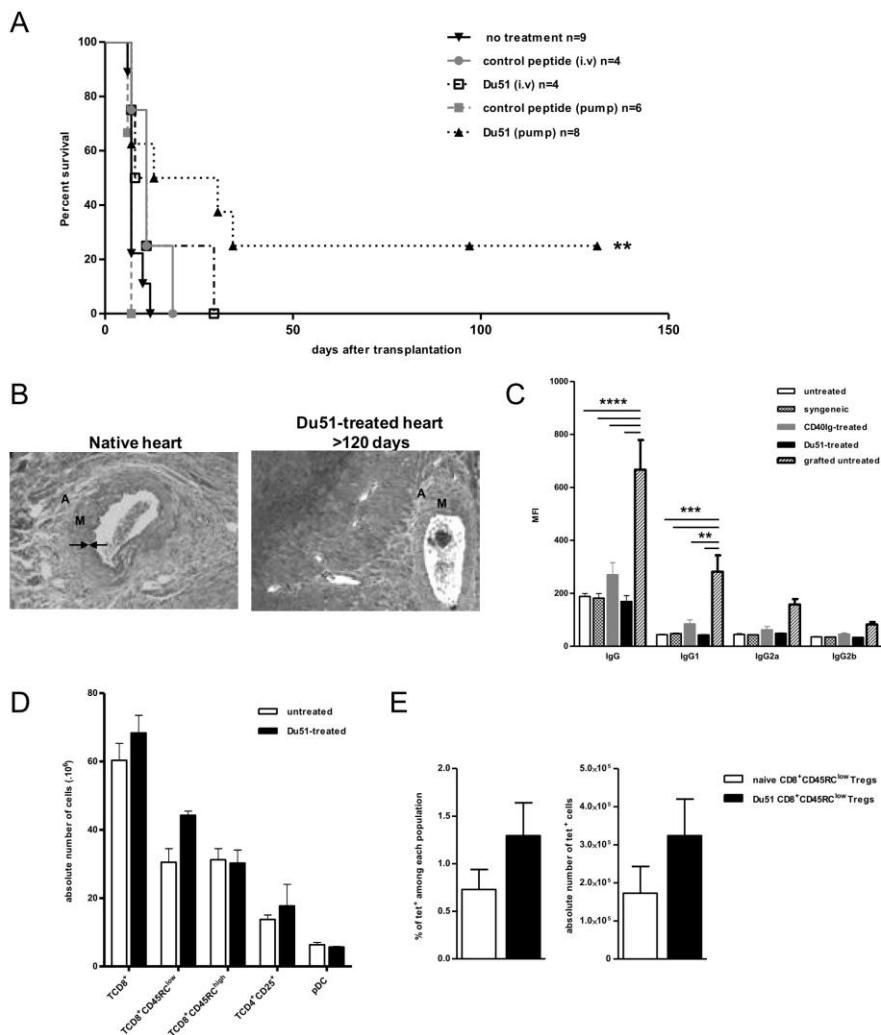


Figure 9: Tolerance induction and inhibition of alloantibody production after Du51 administration. (A) Recipients were either untreated (n=9), treated with 5 single intravenous injections of 0.5 mg peptide at day -6, -3 pre-graft, day 0, +3 and +7 post-graft (n=4), or treated with continuous infusion of peptide by intraperitoneal mini osmotic pumps (ALZET), delivering 20.83µg/hour for 28 days, starting at day-7 (peptide 51: n=8). **P<0.01 versus untreated animals and control peptide. (B) Anatomopatologic analysis of graft for signs of chronic rejection lesions comparing native heart to Du51-treated long surviving recipients. (C) Alloantibody production was evaluated in untreated (n=3), syngeneic grafted (n=3), CD40lg-treated (n=3), Du51-treated (n=2) or grafted untreated recipients (n=3). Sera were incubated with donor splenocytes and analyzed by flow cytometry for IgG, IgG1, IgG2a or IgG2b Abs production. Background staining due to direct recognition of IgG on splenocytes was observed for untreated animals, free of alloantibodies. Graph represents MFI ± SEM. *p<0.05, **p<0.01. (D) Spleens were recovered at day 120 and cell population were stained and analyzed by flow cytometry. Graph represents the absolute number of each sub-population in the

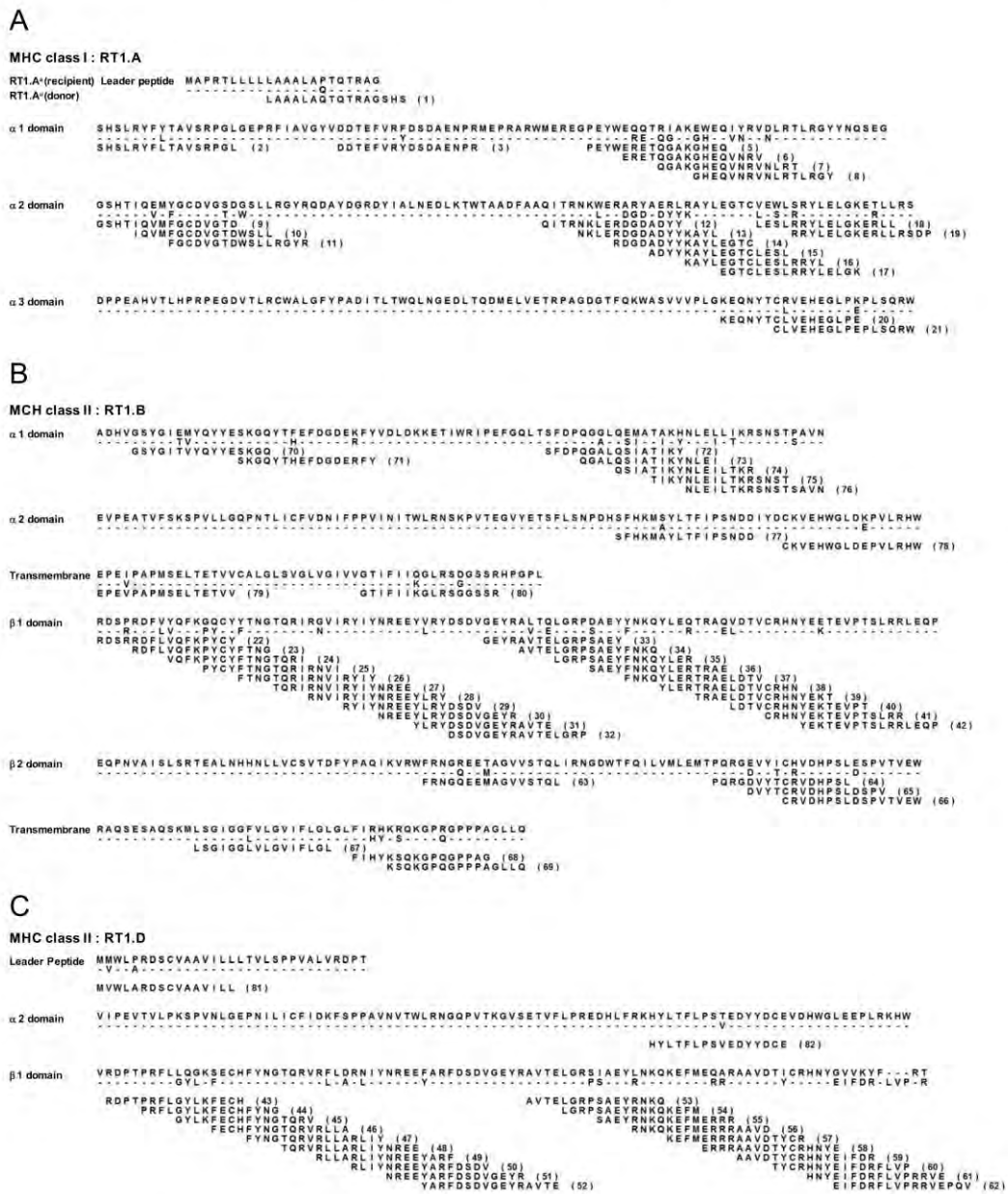
total spleen from either untreated (n=12) or Du51-treated (n=2) recipients. **(E)** Spleen of Du51-treated long surviving of untreated recipients were incubated with RT1.A^a/Du51 tetramers labeled with streptavidin conjugated to phycoerythrin (PE) and allophycocyanin (APC). Results are plotted into graphs for percentage of tetramer⁺ cells among each population and absolute number of cells \pm SEM.

Table 1. Picarda et al.

	SPLEEN		GRAFT	
	V β 11			V β 18
	Untreated	CD40Ig-treated		
Rat analyzed	5	6	7	6
TCRs sequenced	358	646	510	482
Predominant CDR3b length, aa	9 (28,5%)	9 (31,4%)	9 (36,1%)	7 (37,8%)
Predominant J β region	2.6 (19%) 2.1 (18,4%)	1.6 (22,6%) 2.5 (20,1%)	2.1 (14,3%)	2.1 (33,4%)
Different clonotype	91% (327)	63% (407)	51% (259)	30,5% (147)
Repeated clonotype	5,2% (17)	5,9% (24)	27,4% (71)	32,7% (48)
Clonotype/TCRs sequenced per animal	1 : 55/68 2 : 66/72 3 : 71/73 4 : 70/70 5 : 65/75	1 : 30/119 2 : 93/103 3 : 87/99 4 : 99/113 5 : 28/116 6 : 70/96	1 : 14/44 2 : 6/76 3 : 28/69 4 : 58/87 5 : 31/77 6 : 71/80 7 : 51/77	1 : 13/88 2 : 6/54 3 : 15/80 4 : 22/94 5 : 22/89 6 : 69/77
Repertoire diversity	"Private" Broad in all animals	"Private" Broad in 3 animals Limited in 3 animals	"Private" Broad in 3 animals Limited in 4 animals	"Private" Limited in 5 animals

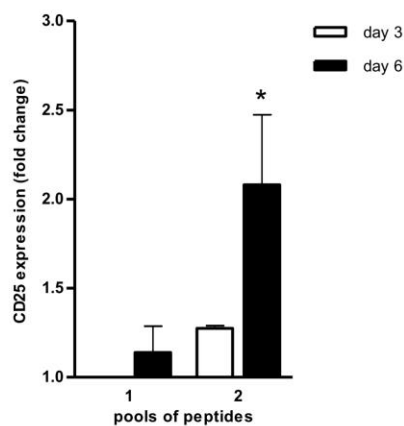
Table 1: Summary of the V β 11 and V β 18 repertoire in spleen and graft of untreated and CD40Ig-treated rats 120 days after transplantation.

Suppl. Fig.1. Picarda et al.



Suppl. Figure 1: Amino acid sequence alignment of the recipient a-haplotype (upper sequence) and donor u-haplotype (lower sequence) RT1 molecules. Sixteen amino acids-long overlapping peptides (82 synthetic peptides) were chosen along the polymorphic regions of the MHC-I RT1.A^u (α 1, α 2 and α 3 domains) (A), MHC-II RT1.B^u (all domains) (B) and RT1.D^u (α 2, β 1domains) (C).

Suppl Fig. 2. Picarda et al.



Suppl. Figure 2: 6 days of stimulation with matured pDCs and pools of peptides efficiently activates CD8⁺ Tregs. Peptides were grouped into pools of peptides and tested in an in vitro assay where mature syngeneic recipient pDCs and sorted-CD8⁺CD40Ig Treg cells from CD40Ig-treated long-term allograft bearing recipients were cocultured for 3 or 6 days. Results are expressed as the ratio \pm SEM between the percentage of CD25 positive cells after peptide stimulation and percentage of CD25 positive cells in the control condition without peptide. * $p < 0.05$, $n = 3$ to 7.

Suppl. Table 1. Picarda et al.

Vbeta	CDR3b region (aa)	Jb	length	Vb11												Vb18						Number of animals sharing TCR											
				Untreated Spleen					Treated Spleen					Treated Graft					Treated Graft														
				1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	Vb11	Vb18				
Vb11	SLAWGGYAEQ	b2.1	10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SLDGGYEQ	b2.6	8	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SLGDGSYAEQ	b2.1	10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SLOGNTGQI	b2.2	9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SLRGETQ	b2.5	7	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SLTGGRQNTL	b2.4	10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
Vb11	SLVGAEQ	b2.1	7	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SLVGYEQ	b2.6	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SPGGAGDKI	b2.3	9	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SPGGSYAEQ	b2.1	9	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb11	SSQGNQDY	b1.2	7	0	3	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Vb18	GGWFETQ	b2.5	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	3	4	0	0	0	3
Vb18	STGLNTL	b2.4	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	2

Suppl. Table 1: Amino acid sequence, J β usage and CDR3 length of clonotypes shared from the V β 11 and V β 18 repertoires in the spleen and graft of untreated and CD40Ig-treated rats 120 days after transplantation.

Résumé de l'article I

Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, nous avons précédemment montré que le traitement avec CD40Ig entraîne une survie indéfinie de l'allogreffe par l'induction de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (Tregs CD8⁺CD40Ig), notamment grâce à l'interaction privilégiée avec les pDCs. Le rôle exact de l'interaction TCR/CMH/peptide dans l'activité des Tregs reste à ce jour mal connu et sujet à débat. Dans cette étude, nous avons identifié un peptide dérivé du CMH de classe II du donneur (appelée Du51), reconnu par les Tregs CD8⁺CD40Ig avec un TCR biaisé, et activant ces cellules aussi bien au niveau de leur phénotype que dans leur fonction suppressive. Nous avons généré un tétramère de complexe RT1.A^a/Du51 pour identifier les LTs spécifiques du Du51 et analyser leur localisation et leur fréquence. Nous avons également mis en évidence que les Tregs CD8⁺CD40Ig expriment un répertoire Vβ11 biaisé et sont recrutées de manière différentielle dans la rate par rapport au greffon. De plus, dans le greffon, un répertoire Vβ18 biaisé et restreint a été identifié avec des clonotypes partagés. Enfin, nous avons démontré que le traitement de receveurs naïfs avec l'allopeptide identifié induit une prolongation significative de la survie de l'allogreffe. Ensemble, ces résultats démontrent que le traitement CD40Ig induit des altérations du répertoire des Tregs, donnant lieu à la composition différentielle des segments géniques au niveau du CDR3β, dans la greffe ou en périphérie, et à la reconnaissance d'un même antigène du donneur avec un fort potentiel thérapeutique, soulignant l'importance de l'interaction TCR/peptide/CMH pour la génération et la fonction des Tregs.

Résultats complémentaires

Les premiers résultats complémentaires présentés ci-après (1. à 7.) constituent les réponses apportées aux questions soulevées par les « reviewers » du Journal of Clinical Investigation, à la suite de la soumission de l'article I en juin 2013. L'article sera resoumis dans les prochaines semaines. Par ailleurs, les résultats complémentaires concernant la cristallographie (8.) et l'étude du peptide Bu31 sous-dominant (9. à 12.) ont été générés en parallèle des travaux présentés dans l'article I.

1. Des LTs CD8⁺CD45RC^{high} issus d'animaux traités avec AdCD40Ig reconnaissent l'allopeptide dominant Du51.

Afin d'analyser la reconnaissance du peptide Du51 par les LTs CD8⁺CD45RC^{high} issus d'animaux long terme, ces cellules ont été triées au Facs ARIA et cultivées pendant 6 jours avec des pDCs syngéniques matures naïves triées et l'allopeptide. L'expression de CD25 par les LTs CD8⁺CD45RC^{high} a été évaluée par cytométrie en flux.

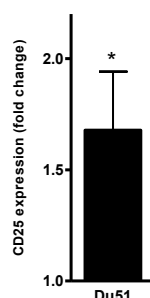


Figure 24 : Analyse de l'activation des LTs CD8⁺CD45RC^{high} d'animaux long terme en réponse à la stimulation par le peptide Du51.

Les LTs CD8⁺CD45RC^{high} triés de la rate ont été cocultivés pendant 6 jours avec des pDCs syngéniques maturées avec du CpG, en l'absence ou en présence du peptide Du51. Les résultats sont exprimés en ratio \pm SEM entre le pourcentage de cellules CD25⁺ après stimulation et dans la condition contrôle sans peptide. Wilcoxon signed-rank test * $P < 0.05$ versus condition contrôle (valeur 1.0). $n = 7$.

Le peptide Du51 induit une surexpression significative du marqueur CD25 à la surface des LTs CD8⁺CD45RC^{high} (1,678 \pm 0,263 fold vs. no peptide, $p < 0.05$) (**Figure 24**). Elle est moins élevée que dans le cas de la reconnaissance du peptide Du51 par les Tregs CD8⁺CD40Ig (Figure 2A de l'article I : 2,07 \pm 0,18 fold vs. no peptide, $p < 0.001$). Ce résultat suggère qu'une fraction des LTs CD8⁺CD45RC^{high} issus d'animaux traités avec CD40Ig reconnaît l'allopeptide dominant Du51, pouvant correspondre à des cellules potentiellement régulatrices ou effectrices de même spécificité que les Tregs CD8⁺CD40Ig.

2. Les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 exercent l'activité suppressive la plus forte.

Dans l'article I, le maintien de la fonction suppressive des Tregs CD8⁺CD40Ig après 6 jours de coculture *in vitro* avec des pDCs syngéniques et le peptide Du51 a été analysé (Figure 4). Dans l'expérience présente, nous avons étudié l'activité suppressive des Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 fraîchement triées grâce au tétramère de complexe CMHp RT1A^a/Du51. Pour cela, des nTregs CD8⁺CD45RC^{low} issues d'un animal naïf, des Tregs CD8⁺CD40Ig totales ou divisées en deux fractions, à savoir les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 (tet⁺) ou non spécifiques (tet⁻), ont été incubées avec des pDCs allogéniques et des LTs CD4⁺CD25⁻ marqués au CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) fraîchement triés. La prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ a été analysée 6 jours plus tard (Figure 25).

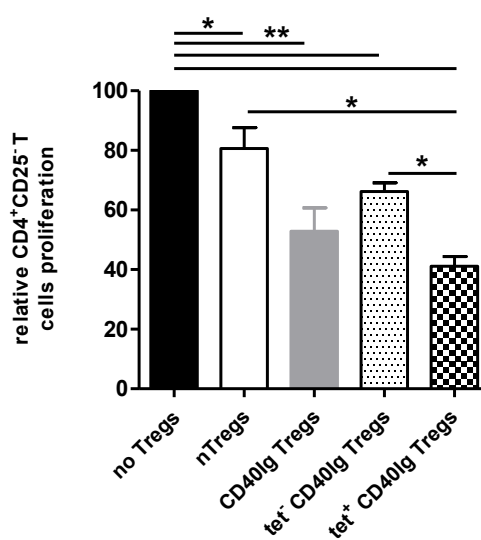


Figure 25 : Les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du peptide Du51 inhibent la prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs syngéniques, de façon significativement plus efficace que les Tregs non spécifiques et que les nTregs CD8⁺CD45RC^{low}.

La prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs triés par Facs ARIA et marqués au CFSE, stimulés par des pDCs allogéniques triées, a été évaluée après 6 jours de coculture, en absence (no Tregs) ou en présence de nTregs CD8⁺CD45RC^{low} (nTregs), de la population globale de Tregs CD8⁺CD40Ig (CD40Ig Tregs), de Tregs CD8⁺CD40Ig Du51-non spécifiques (fraction tet⁻ CD40Ig Tregs), ou de Tregs CD8⁺CD40Ig Du51-spécifiques (fraction tet⁺ CD40Ig Tregs), triées grâce au tétramère RT1.A^a/Du51, au ratio effecteur/suppresseur 1:1. Les résultats sont exprimés en prolifération relative des LTs CD4⁺CD25⁻ ± SEM. n=4. Mann-Whitney t test *P<0.05. Wilcoxon signed-rank test *P<0.05 **P<0.001 versus no Tregs (valeur 100).

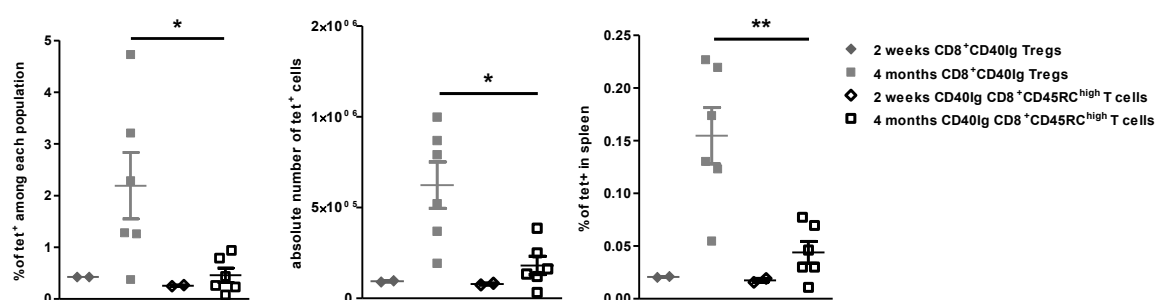
La valeur 100 a été attribuée au pourcentage de prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ en l'absence de Tregs (environ égal à 80%). L'ajout des différentes sous-populations de Tregs induit une inhibition significative de la prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻. En particulier, les LTs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 exercent la suppression la plus forte (41,1% de

cellules proliférantes seulement) et sont plus efficaces en comparaison aux nTregs CD8⁺CD45RC^{low} et aux Tregs CD8⁺CD40Ig Du51-non spécifiques. Ces résultats suggèrent que les Tregs CD8⁺ spécifiques du Du51 sont la population la plus efficace du pool total de Tregs CD8⁺CD40Ig.

3. Les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 sont recrutées dans le greffon au cours des deux premières semaines suivant la greffe puis dans la rate.

Dans l'article I (Figure 5), nous avons détecté et étudié la proportion de LTs CD8⁺ spécifiques du peptide Du51 dans la rate et le greffon d'animaux long terme traités avec CD40Ig. Afin d'étudier la cinétique d'apparition et la localisation de ces cellules à des temps précoces post-greffe, nous avons réalisé des marquages de la rate et du greffon de receveurs traités avec CD40Ig deux semaines après la transplantation. Les cellules ont été d'abord marquées avec le tétramère RT1.A^a/Du51 couplé à -PE et -APC, en combinaison avec un tétramère contrôle RT1.Aa/MTF-E couplé à -BV421, puis avec des anticorps anti-CD8 et anti-CD45RC comme décrit dans l'article.

Rate



Greffon

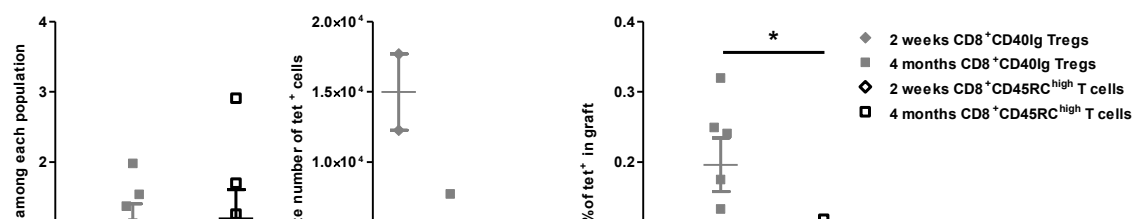


Figure 26 : Distribution des cellules spécifiques du Du51 à deux semaines ou quatre mois post-greffe.

La rate (panel du haut) et le greffon (panel du bas) d'animaux traités avec CD40Ig ont été prélevés à deux semaines (n=2) et 120 jours post-greffe (n=6) et incubés avec les tétramères RT1.Aa/Du51 conjugués à la streptavidine-PE ou -APC. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules tétramère⁺ au sein de chaque population (gauche), le nombre absolu (centre) et le pourcentage de cellules (droite) dans l'organe ± SEM. Mann-Whitney t test *P<0.05 **P<0.01

Deux semaines après la greffe, les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 sont recrutées dans le greffon, où leur nombre absolu est élevé (panel du milieu en bas), mais pas dans la rate (panel du haut) (**Figure 26**). Quatre mois après la greffe, leur proportion et leur nombre absolu sont augmentés dans la rate vis-à-vis des nTregs CD8⁺CD45RC^{low}, des LTs CD8⁺CD45RC^{high} naïfs (Figure 5 de l'article I) et vis-à-vis de la proportion et du nombre à deux semaines (panel du haut). Ces résultats suggèrent une accumulation précoce des Tregs allospécifiques dans le greffon et plus tardive dans la rate, en accord avec les observations de Li (Li et al., 2010).

4. Les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 sont nécessaires pour prévenir du rejet aigu d'allogreffe chez des receveurs secondaires naïfs irradiés.

Afin d'étudier l'importance de la population de Tregs CD8⁺ spécifique d'allopeptide dans l'induction de tolérance *in vivo*, des expériences de transfert adoptif ont été réalisées. La rate d'animaux long terme a été incubée avec le tétramère RT1.A^a/Du51 puis les Tregs CD8⁺CD40Ig ont été triées au Facs ARIA en deux fractions séparées : la fraction positive contenant les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 et la fraction négative contenant le reste des cellules, non spécifiques. Le nombre de cellules dans la fraction positive étant trop faible pour un transfert *in vivo*, la fraction négative du tri a été transférée adoptivement à des receveurs secondaires naïfs irradiés la veille de la transplantation cardiaque.

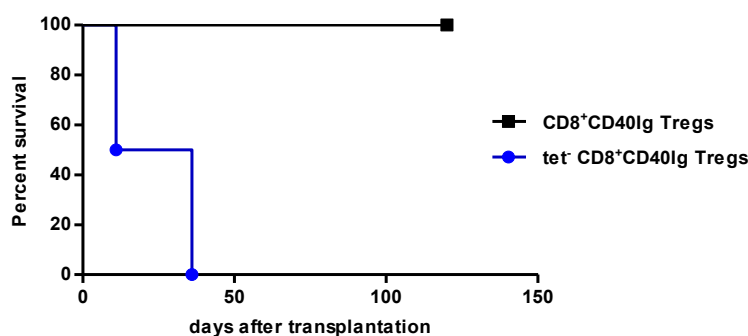


Figure 27 : Transfert adoptif des Tregs CD8⁺CD40Ig tet⁺, déplétées en cellules spécifiques du Du51. Les splénocytes de rats long terme traités par AdCD40Ig ont été incubés avec le tétramère RT1.A^a/Du51 couplé à la streptavidine-PE et -APC et un tétramère contrôle RT1.A^a/MTF-E couplé à la streptavidine-BV421 ou directement avec les anticorps anti-CD8 et anti-CD45RC. Les populations de Tregs CD8⁺CD40Ig totales (n=5) ou de Tregs CD8⁺CD40Ig Du-51 non spécifiques (n=2), représentant la fraction négative du marquage tétramère, ont été triées par Facs ARIA et 2.5×10⁶ cellules ont été injectées par voie intraveineuse à des receveurs naïfs (LEW.1A), irradiés à la dose sous-létale de 4 Gy, la veille de l'allogreffe cardiaque (LEW.1W).

Contrairement aux Tregs CD8⁺CD40Ig totales, les Tregs CD8⁺CD40Ig déplétées de la sous-population spécifique de l'allopeptide Du51, à nombre équivalent, ne permettent pas le

transfert de la tolérance à des receveurs secondaires naïfs (**Figure 27**). Ce résultat obtenu avec deux receveurs est en cours de validation par la réalisation de nouveaux transferts mais suggère d'ores et déjà un rôle crucial des Tregs $CD8^+CD40Ig$ spécifiques du Du51 dans l'activité tolérogène des Tregs *in vivo* et la prévention du rejet d'allogreffe, et confirme les résultats obtenus *in vitro*.

5. La déplétion des LTs $CD8^+$ ou le blocage des molécules du CMH-I empêche l'induction de tolérance par le peptide Du51.

Dans l'article I, nous avons démontré que l'infusion continue du peptide Du51 une semaine avant la greffe et jusqu'à trois semaines après, par le biais de mini-pompes osmotiques intrapéritonéales, induisait une prolongation significative de la survie de l'allogreffe, avec 2 receveurs sur 8 présentant une survie indéfinie, corrélée à une augmentation de la proportion et du nombre absolu de Tregs $CD8^+$ et spécifiques du Du51, une inhibition des réponses humorales anti-donneur et l'absence de signes de rejet chronique (Figure 9 de l'article I). Afin d'établir un lien entre le traitement peptidique et la génération de Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$ par reconnaissance de l'allopeptide, l'infusion de peptide Du51 a été associée à un traitement avec des anticorps déplaçant les cellules $CD8^+$ (OX8) ou bloquant le CMH-I (OX18) (anticorps que j'ai produits au sein du laboratoire par culture d'hybridomes à long terme et purification des anticorps présents dans le surnageant de culture).

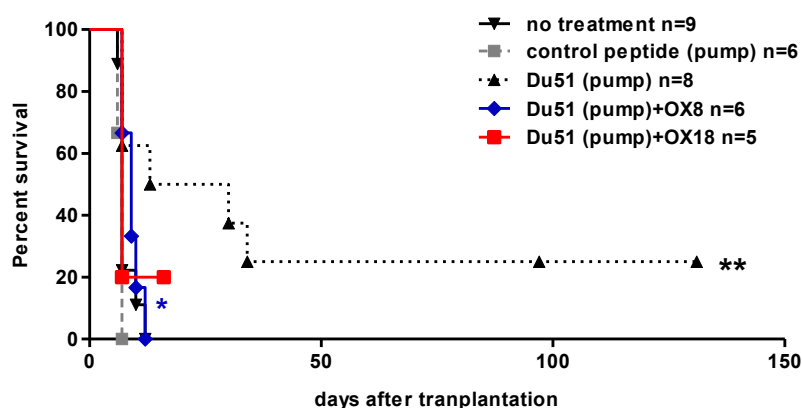


Figure 28: L'administration conjointe du peptide Du51 et d'un anticorps déplaçant les cellules $CD8^+$ (OX8) ou d'un anticorps bloquant le CMH-I (OX18) ne prévient pas du rejet aigu d'allogreffe.

Les receveurs sont soit non traités, soit traités avec une infusion continue de peptide contrôle (n=6) ou Du51 (n=8) par des mini pompes osmotiques intrapéritonéales (ALZET) délivrant $20,83\mu L$ /heure, de j-7 pré-greffe jusqu'à j+21 post-greffe, seul ou en combinaison avec un anticorps OX8 déplaçant, injecté à une dose de 4 mg/kg à j-7, j0 et j+7 (n=6), ou un anticorps OX18 bloquant, injecté à une dose de 3 mg/kg à partir de j-7 3 fois/semaine (n=5). Log-rank (Mantel-Cox) Test. ** $P < 0.01$ Du51 versus no treatment et control peptide. * $P < 0.05$ Du51 versus Du51+OX8.

De façon intéressante, l'association du peptide Du51 à un traitement anti-CD8 ne prévient pas du rejet aigu d'allogreffe, suggérant un rôle crucial des LTs CD8⁺ dans l'induction de tolérance par le peptide Du51 ($p < 0.05$ Du51 versus Du51+OX8) (**Figure 28**). De même, l'association peptide Du51/anti-CMH-I ne prévient pas du rejet d'allogreffe chez 4 receveurs sur 5 (expériences en cours). Les interactions TCR/CMH-Ip semblent donc requises pour l'induction de tolérance par l'allopeptide *in vivo*. Ces résultats suggèrent que la reconnaissance de l'allopeptide Du51, présenté par les molécules du CMH-I dans des conditions sous-immunogènes pré-greffe, génère *in vivo* une population de Tregs CD8⁺ capable de retarder ou d'inhiber le rejet d'allogreffe, voire même d'induire une tolérance chez certains receveurs.

6. Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} issues d'animaux naïfs présentent un répertoire divers et polyclonal pour la chaîne Vβ18 du TCR.

L'analyse Immunoscope réalisée sur les Tregs CD8⁺CD40Ig de la rate ne montre pas de biais du répertoire pour la chaîne Vβ18 du TCR mais une distribution gaussienne normale semblable à celle obtenue chez des animaux non traités (Guillonnet et al., 2007a). En revanche, les GITCs des animaux long terme présentent une altération pour la famille Vβ18 du TCR, avec un pic à la même longueur de CDR3β de 7AAs chez tous les animaux étudiés. De plus, les transcripts Vβ18 sont 11 fois plus représentés chez les GITCs d'un animal CD40Ig comparés aux Tregs spléniques CD8⁺CD45RC^{low} d'un animal naïf. Nous avons donc analysé le répertoire Vβ18 des LTs du greffon par séquençage du CDR3β et mis en évidence un répertoire restreint, avec des clonotypes répétés au sein de chaque animal et certains partagés entre plusieurs animaux (Table 1 de l'article I).

De la même manière que pour l'étude du répertoire Vβ11, nous avons analysé le répertoire Vβ18 des nTregs CD8⁺CD45RC^{low} de la rate d'un animal non traité, afin de s'assurer de la présence d'un répertoire divers et polyclonal et de disposer d'un contrôle au répertoire Vβ18 biaisé du greffon des animaux traités décrit dans le manuscrit (Table 1 de l'article I). Le CDR3β Vβ18 des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} de cinq rats naïfs a été séquencé. Les résultats ont été ajoutés en bleu à la table I de l'article I, l'ensemble constituant le **tableau n°3** ci-dessous. Sur les 326 TCRs séquencés, 90% des clonotypes sont différents et seuls 6,8% d'entre eux sont retrouvés au moins deux fois chez le même animal. Conformément à l'Immunoscope, le répertoire naïf Vβ18 est donc très divers et polyclonal dans la rate.

7. Les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 de la rate possèdent un répertoire privé et restreint pour la chaîne Vβ11 du TCR.

Les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51, issues de la rate de quatre animaux traités par AdCD40Ig, recombinent les chaînes Vβ11 et Vβ18 du TCR (Picarda et al, en révision). Afin d'étudier le répertoire des Tregs spécifiques d'alloantigènes, nous avons dans un premier temps séquencé le CDR3β de la chaîne Vβ11 utilisée par cette population. Les résultats ont été ajoutés en bleu à la table I de l'article I, l'ensemble constituant le **tableau n°3** ci-dessous. Sur les 281 TCRs séquencés, seule la moitié est formée de clonotypes différents. L'autre moitié est constituée de clonotypes répétés, qui représentent 23% des clonotypes totaux. Le répertoire Vβ11 des Tregs allospécifiques de la rate est donc limité et plus restreint que celui des Tregs CD8⁺CD40Ig totales décrit dans l'article I. De façon intéressante, plusieurs clonotypes des Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 sont partagés avec des clonotypes identifiés précédemment dans le répertoire Vβ11 des nTregs ou des Tregs CD8⁺CD40Ig de la rate et du greffon. Par ailleurs, bien qu'aucun biais pour la chaîne Vβ18 n'ait été observé dans la rate des animaux long terme par Immunoscope, les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 recombinent cette chaîne, suggérant un biais possible du répertoire. Pour y répondre, le séquençage du CDR3 Vβ18 des Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 est actuellement en cours.

	SPLEEN				GRAFT	
	Vβ18	Vβ11			Vβ18	
	Untreated		CD40Ig-treated			
Cells	Total Tregs		Du51-specific	Total Tregs		
Rat analyzed	5	5	4	6	7	6
TCRs sequenced	326	358	281	646	510	482
Predominant CDR3β length, aa	8 (32.5%)	9 (28.5%)	10 (29.89%) 9 (24.56)	9 (31.4%)	9 (36.1%)	7 (37.8%)
Predominant Jβ region	2.6 (25.8%) 2.1 (25.5%)	2.6 (19%) 2.1 (18.4%)	2.6 (22.06%)	1.6 (22.6%) 2.5 (20.1%)	2.1 (14.3%)	2.1 (33.4%)
Different clonotypes	90.5% (295)	91% (327)	44% (124)	63% (407)	51% (259)	30.5% (147)
Repeated clonotypes	6.8% (20)	5.2% (17)	23.4% (29)	5.9% (24)	27.4% (71)	32.7% (48)
Clonotype/ TCRs sequenced per animal	1 : 59/62 2 : 68/69 3 : 59/75 4 : 52/58 5 : 57/62	1 : 55/68 2 : 66/72 3 : 71/73 4 : 70/70 5 : 65/75	1 : 36/76 2 : 45/54 3 : 10/67 4 : 33/84	1 : 30/119 2 : 93/103 3 : 87/99 4 : 99/113 5 : 28/116 6 : 70/96	1 : 14/44 2 : 6/76 3 : 28/69 4 : 58/87 5 : 31/77 6 : 71/80 7 : 51/77	1 : 13/88 2 : 6/54 3 : 15/80 4 : 22/94 5 : 22/89 6 : 69/77
Repertoire diversity	“Private” Broad in all animals	“Private” Broad in all animals	“Private” Limited in 3 animals	“Private” Broad in 3 animals Limited in 3 animals	“Private” Broad in 3 animals Limited in 4 animals	“Private” Limited in 5 animals

Tableau 3 : Caractéristiques du répertoire des Tregs CD8⁺CD40Ig totales ou spécifiques du Du51 de la rate d’animaux traités 120 jours après la greffe.

Pour l’analyse du répertoire Vβ11 des Tregs CD8⁺CD40Ig Du51-spécifiques, la rate de rats long terme traités par AdCD40Ig a été incubée avec le tétramère RT1.A^a/Du51 couplé à la streptavidine-PE et -APC et un tétramère contrôle RT1.A^a/MTF-E couplé à la streptavidine-BV421. Les Tregs Du51-spécifiques ont été triées à l’ARIA, puis l’ARN a été isolé grâce au kit NucleoSpin RNA XS de Macherey Nagel et rétrotranscrit avec le kit de reverse transcription Sensiscript de Qiagen. Pour l’analyse du répertoire Vβ18 des animaux non traités, l’ARN issu de nTregs CD8⁺CD45RC^{low} de la rate a été extrait et rétrotranscrit grâce au kit de Reverse-Transcriptase MMLV. Les cDNAs ont été amplifiés par PCR avec les amorces Vβ11 ou Vβ18 et Cβ, migrés sur gel puis clonés dans le vecteur TOPO. Les colonies bactériennes uniques générées ont été utilisées pour le séquençage de la région CDR3β.

8. Analyse cristallographique du complexe RT1.A^a/Du51

La plateforme des protéines recombinantes de l'IFR26 de Nantes a produit des monomères de complexe RT1.A^a/Du51, selon le protocole décrit dans l'article I. Afin d'identifier le mode d'arrimage du peptide dans le sillon peptidique et sa conformation, la résolution de la structure tridimensionnelle par cristallographie est nécessaire et est réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Dominique Housset de l'Institut de Biologie Structurale, à Grenoble. Différentes conditions de cristallisation sont actuellement testées afin d'obtenir des cristaux du complexe RT1.A^a/Du51 reconnu par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low}. Quelques cristaux ont pu être obtenus au robot à 20°C, dont un diffractait (**Figure 29**). Cependant, la résolution était trop basse, limitée à 8 Å. Etant donné les complexes décrits dans la littérature pour des peptides longs, la boucle centrale formée par le peptide pourrait ne pas être visible car trop flexible dans le sillon. Seule la stabilisation par un TCR permettra de fixer la conformation.

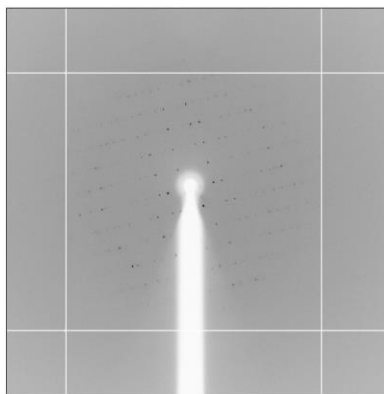


Figure 29 : Cliché de diffraction d'un cristal de complexe RT1.A^a/Du51.

9. Des Tregs CD8⁺CD40Ig reconnaissent plusieurs dérivés des peptides chevauchants Bu31 et 32, de longueurs et de séquences variables.

Sur les 82 peptides allogéniques testés *in vitro*, le peptide Du51 est le peptide immunodominant reconnu par les Tregs et le peptide Bu31 a été qualifié de sous-dominant car induisant une activation moins forte des Tregs CD8⁺CD40Ig (Figure 2A de l'article I). Afin d'identifier la séquence du peptide sous-dominant reconnu par les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques, nous avons construit une librairie de dérivés peptidiques, de 9 à 15 AAs, basée sur nos résultats et la littérature. L'expression de CD25 a été analysée après coculture des Tregs CD8⁺CD40Ig avec chaque dérivé, en présence de pDCs syngéniques matures (**Figure 30**).

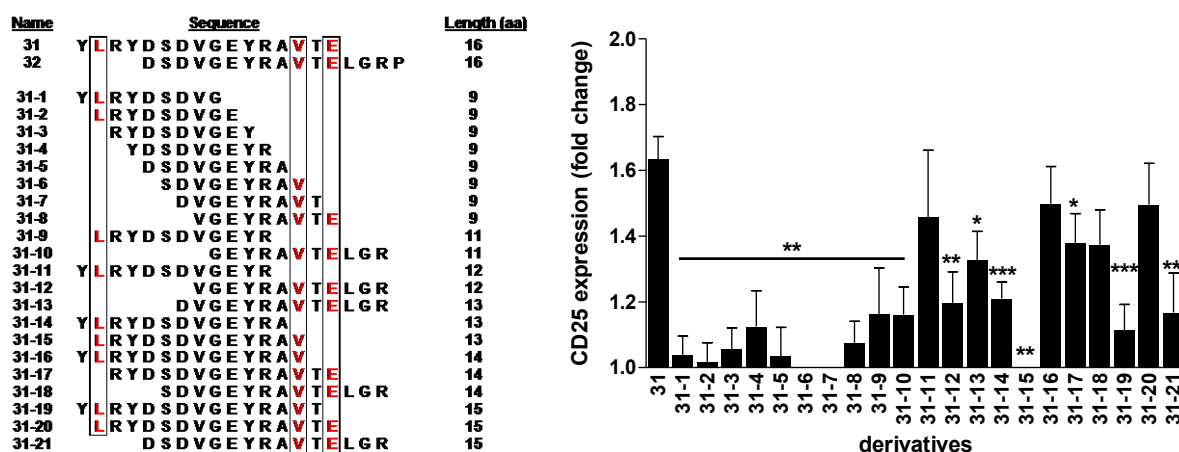


Figure 30 : Analyse de l'activation des Tregs CD8⁺CD40Ig en réponse aux dérivés du peptide Bu31. A gauche, 21 dérivés du peptide Bu31 et pour certains chevauchant avec le peptide 32, sont détaillés et classés par longueur, de 9 à 15 AAs. Les AAs différant entre donneur et receveur sont encadrés et en rouge. A droite, l'activation des Tregs en réponse aux dérivés peptidiques est analysée par l'expression de CD25. Les Tregs CD8⁺CD40Ig ont été cultivées pendant 6 jours avec des pDCs syngéniques maturées avec du CpG, en présence de chaque peptide. Le ratio \pm SEM entre le pourcentage de Tregs CD25⁺ après stimulation peptidique et le pourcentage de Tregs CD25⁺ dans la condition contrôle sans peptide est représenté. Wilcoxon signed-rank test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ versus condition peptide Bu31. $n = 3$ à 15.

Aucun des dérivés de 9 AAs n'induit l'activation des Tregs CD8⁺CD40Ig. En revanche, les dérivés 31-11, 31-16, 31-18, 31-20 génèrent une surexpression de CD25 par les Tregs équivalente à celle induite par le peptide 31, suggérant la reconnaissance par le TCR des Tregs CD8⁺CD40Ig de plusieurs épitopes antigéniques ou de la séquence commune à ces différents dérivés (DSDVGEYR), qui est aussi partagée avec le peptide Du51.

10. Les LTs CD8⁺CD45RC^{high} issus d'animaux traités avec AdCD40Ig semblent reconnaître l'allopeptide sous-dominant Bu31.

Afin d'analyser la reconnaissance du peptide sous-dominant Bu31 par les LTs CD8⁺CD45RC^{high} issus d'animaux long terme, ces cellules ont été triées au FACS ARIA et cultivées pendant 6 jours avec des pDCs syngéniques matures naïves triées et l'allopeptide. L'expression de CD25 par les LTs CD8⁺CD45RC^{high} a été évaluée par cytométrie en flux (Figure 31).

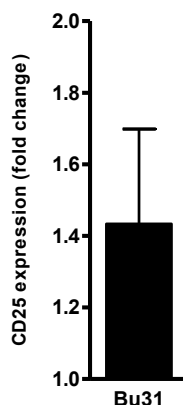


Figure 31 : Analyse de l'activation des LTs $CD8^+CD45RC^{high}$ d'animaux long terme en réponse à la stimulation par le peptide Bu31.

Les LTs $CD8^+CD45RC^{high}$ triés de la rate ont été cocultivés pendant 6 jours avec des pDCs syngéniques maturées avec du CpG, en l'absence ou en présence du peptide Bu31. Les résultats sont exprimés en ratio \pm SEM entre le pourcentage de cellules $CD25^+$ après stimulation et dans la condition contrôle sans peptide. Wilcoxon signed-rank test * $P < 0.05$ versus condition contrôle (valeur 1.0). $n=7$.

Le peptide Bu31 induit une surexpression du marqueur CD25 à la surface des LTs $CD8^+CD45RC^{high}$ ($1,433 \pm 0,265$ fold vs. sans peptide). Elle est moins élevée que dans le cas de la reconnaissance du peptide Bu31 par les Tregs $CD8^+CD40Ig$ (Figure 2A de l'article I : $1,67 \pm 0,09$ fold vs. no peptide, $p < 0.0001$). Ce résultat suggère qu'une fraction des LTs $CD8^+CD45RC^{high}$ issus d'animaux traités avec CD40Ig reconnaît l'allopeptide sous-dominant Bu31, pouvant correspondre à des cellules potentiellement régulatrices ou effectrices de même spécificité que les Tregs $CD8^+CD40Ig$.

11. La stimulation des Tregs $CD8^+CD40Ig$ avec le peptide Bu31 en présence de pDCs induit une forte production d'IFN γ et la surexpression des marqueurs CD25 et CD71.

Le phénotype des Tregs $CD8^+CD40Ig$ activées par le peptide Bu31 a été étudié *ex-vivo* après 6 jours de stimulation, de façon similaire à l'étude réalisée pour le peptide Du51 (Figure 3 de l'article I). La sécrétion de cytokines dans le surnageant de coculture et l'expression de différents marqueurs à la surface des Tregs ont respectivement été analysées par ELISA et cytométrie en flux (**Figure 32**).

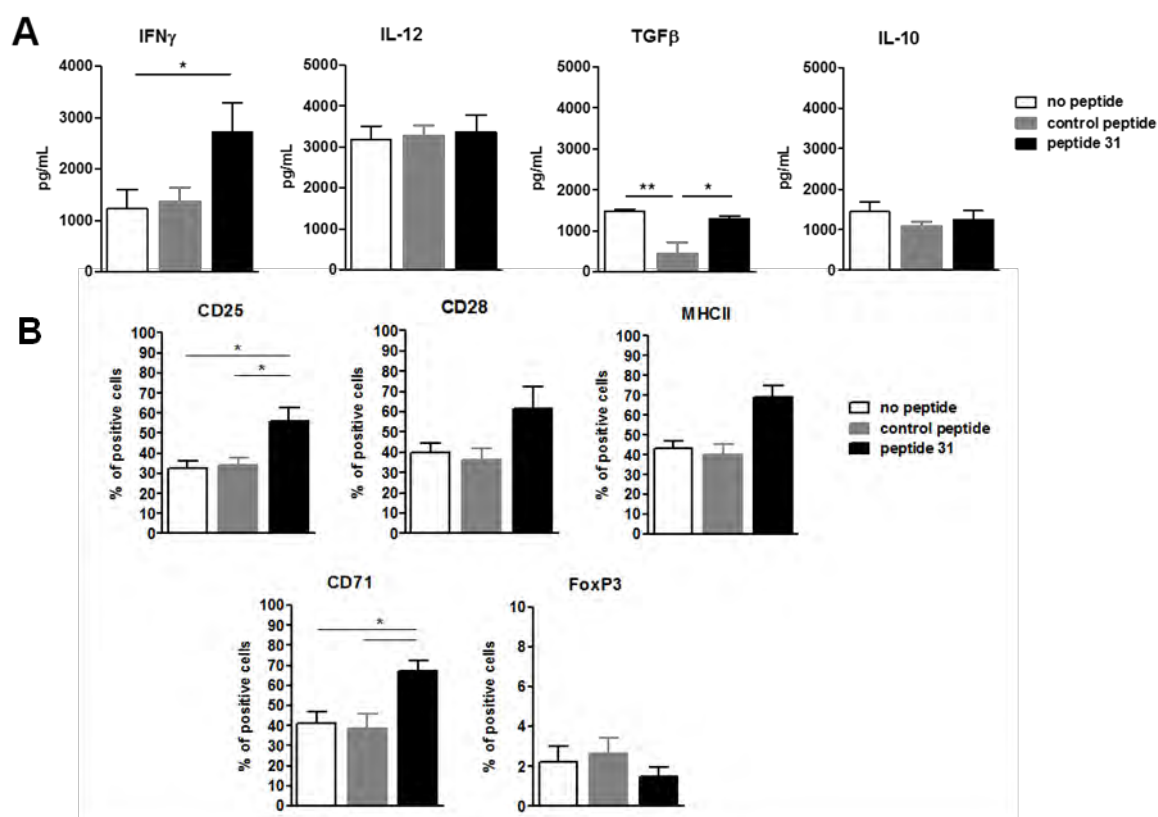


Figure 32 : Caractérisation phénotypique des Tregs CD8⁺CD40Ig après stimulation ex-vivo avec l'allopeptide Bu31.

Les Tregs CD8⁺CD40Ig et des pDCs syngéniques matures ont été triées et cultivées pendant 6 jours, seules, avec un peptide contrôle ou avec le peptide Bu31. L'expression des molécules indiquées a été analysée dans le surnageant de coculture par ELISA (A) ou à la membrane des Tregs par cytométrie en flux (B) après stimulation in vitro. La moyenne d'expression \pm SEM est représentée. Mann-Whitney *t*-test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n = 3$ to 7.

La stimulation des Tregs CD8⁺CD40Ig avec le peptide Bu31 et en présence de pDCs induit une augmentation significative de la production d'IFN γ , qui est impliquée dans leur fonction suppressive. Par ailleurs, nous avons constaté une surexpression significative de CD25 et CD71, une tendance à la surexpression de CD28 et CMH-II mais pas de modification de l'expression de FoxP3 après 6 jours de stimulation avec le peptide sous-dominant Bu31. La stimulation des Tregs par le peptide Bu31 induit des modifications phénotypiques semblables à celles induites par le peptide dominant Du51 (Figure 3 de l'Article I), mais de façon plus modérée.

12. Les Tregs CD8⁺CD40Ig activées par l'allopeptide sous-dominant Bu31 inhibent efficacement la prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs.

Afin d'étudier la capacité suppressive des Tregs après stimulation avec l'allopeptide Bu31, nous avons trié les Tregs activées après 6 jours de culture avec les pDCs syngéniques et l'allopeptide. Elles ont été ajoutées à une MLR de LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs marqués au CFSE, stimulés par des pDCs allogéniques, et dont la prolifération a été analysée 6 jours plus tard.

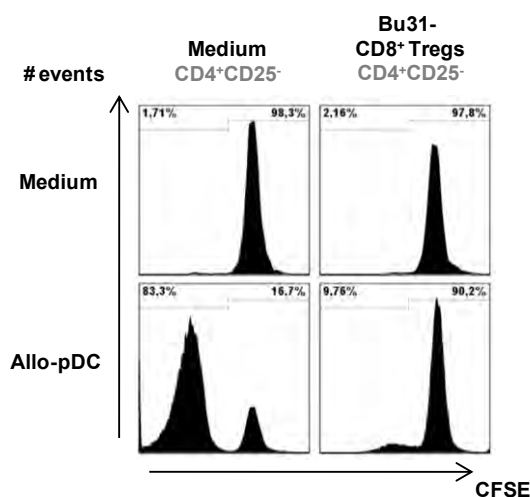


Figure 33 : Les Tregs CD8⁺CD40Ig activées par l'allopeptide Bu31 ont une activité suppressive efficace.

Les Tregs CD8⁺CD40Ig ont été cultivées pendant 6 jours avec des pDCs syngéniques et l'allopeptide. Au 6^{ème} jour, les Tregs ont été isolées par tri au Facs ARIA et testées pour leur capacité suppressive dans un test de MLR. La prolifération de LTs CD4⁺CD25⁻ naïfs syngéniques marqués au CFSE, stimulés par des pDCs du donneur, a été analysée après 6 jours de coculture, en absence ou en présence de Tregs CD8⁺ activées, au ratio effecteur/suppresseur 1:1. Les histogrammes sont représentatifs de quatre expériences indépendantes.

En l'absence de Tregs, 83,3% des LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs prolifèrent. L'ajout de nTregs CD8⁺CD45RC^{low} fraîchement triées inhibe la prolifération des LTs CD4⁺, comme décrit dans la figure 4 de l'article I. De même, l'ajout de Treg CD8⁺CD40Ig activées *ex vivo* par l'allopeptide Bu31 induit une inhibition significative de la prolifération des LTs effecteurs (**Figure 33**), démontrant que les Tregs allospécifiques maintiennent une activité suppressive efficace après stimulation *ex vivo*.

**DISCUSSION/
PERSPECTIVES**

Les caractéristiques de l'interaction TCR/peptide/CMH et son rôle dans la génération et la fonction suppressive des Tregs, autant CD4⁺ que CD8⁺, sont peu définies à ce jour. Les travaux précédents de l'équipe ont démontré que les Tregs CD8⁺CD40Ig sont spécifiques du donneur et présentent un biais du répertoire TCR vers l'utilisation préférentielle de la chaîne Vβ11. Pour autant, la spécificité antigénique fine, c'est-à-dire le ou les allopeptides reconnus, ainsi que la clonalité du TCR n'étaient pas établies. Mes travaux de thèse se sont donc concentrés sur l'étude de l'allospécificité de la population de Tregs CD8⁺CD40Ig, son influence sur l'induction, l'expansion des Tregs et sur la sélection du répertoire TCR CDR3β. Cette étude nous a permis d'approfondir nos connaissances sur la population de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} induite par la transplantation et le traitement avec l'AdCD40Ig.

Les souches de rat utilisées dans notre modèle d'étude sont incompatibles pour l'ensemble des molécules du CMH. Une équipe de notre laboratoire a précédemment construit une librairie de peptides allogéniques de 16 AAs, couvrant les régions polymorphiques des molécules du CMH-I et CMH-II (van Denderen et al., 2001). Van Denderen a caractérisé les allopeptides immunodominants qui entraînent la prolifération *in vitro* des splénocytes de receveurs en phase de rejet aigu (1W/1A sans traitement) ou tolérants à l'allogreffe cardiaque. La tolérance est induite par une DST à j-14 et j-7 pré-greffe. Les splénocytes d'animaux tolérants répondent plus fortement à un large panel d'allopeptides que les splénocytes d'animaux en rejet. De plus, certains allopeptides stimulent uniquement les splénocytes de receveurs traités par DST, suggérant l'implication de cellules régulatrices spécifiques dans l'induction ou le maintien de la tolérance. Plus récemment, Ballet a analysé les réponses alloimmunes T CD4⁺ et CD8⁺ directes et indirectes après le traitement DST induisant une survie à long terme de l'allogreffe (Ballet et al., 2009). La sécrétion d'IFNγ par les splénocytes du receveur obtenus 5 ou 7 jours après la transplantation a été mesurée par ELISPOT, en réponse à la stimulation directe par des splénocytes irradiés du donneur ou indirecte par les allopeptides. Chez des receveurs non traités en rejet aigu, deux allopeptides immunodominants ont été identifiés, le peptide 29 et le peptide 37, respectivement et majoritairement reconnus par les CD4 et les CD8. Ces deux peptides sont dérivés des régions polymorphiques de la chaîne β1 du CMH-II RT1.Dⁿ. Dans le modèle de traitement DST, Ballet a mis en évidence une inhibition de l'alloreconnaissance directe et de la réponse indirecte contre le peptide 37 par les CD8⁺, mais la persistance de l'alloreconnaissance

indirecte du peptide 29 par les LTs CD4⁺. De façon intéressante, les LTs CD4⁺CD25^{high} issus de la rate d'animaux traités par DST ne répondent pas aux peptides 29 et 37.

Contrairement au modèle DST générant des Tregs CD4⁺CD25⁻ (Degauque et al., 2007), notre modèle de traitement par AdCD40Ig induit des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} allospécifiques capables de transférer la tolérance (Guillonnet et al., 2007a). En utilisant la même librairie de peptides que Ballet (Ballet et al., 2009), complétée par de nouveaux peptides allogéniques désignés sur d'autres régions polymorphiques non étudiées auparavant (Ettinger et al., 2004), nous avons mis au point un test de coculture *ex vivo* afin d'étudier l'activation des Tregs CD8⁺CD40Ig en réponse à la présentation indirecte des allopeptides par des pDCs syngéniques. Après une étude préliminaire des marqueurs potentiellement surexprimés par les Tregs CD8⁺CD40Ig lors d'une stimulation polyclonale, notre choix s'est porté sur la molécule CD25, communément utilisée comme marqueur d'activation des LTs (Caruso et al., 1997). Dans notre modèle, la suppression exercée par les Tregs CD8⁺CD40Ig requiert une stimulation par contact avec des pDCs (Li et al., 2010). Nous avons étudié l'état de maturation nécessaire des pDCs syngéniques pour l'apprêtement des allopeptides et leur présentation aux Tregs *in vitro*. Plusieurs études ont rapporté que les pDCs activées avec du CD40L ou du CpG sont capables d'induire des Tregs chez l'Homme (Gilliet and Liu, 2002; Ito et al., 2007; Martín-Gayo et al., 2010; Moseman et al., 2004). Toutefois, des DCs à l'état immature peuvent également générer des Tregs CD4⁺ (Jonuleit et al., 2000; Levings et al., 2005). Dans notre modèle, lors de la transplantation et du traitement CD40Ig, les pDCs perçoivent les signaux de danger via leur PRRs, captent les antigènes du donneur et entament les processus de maturation et de migration. Notre hypothèse est que le blocage de la voie CD40/CD40L par la molécule CD40Ig va limiter la maturation des pDCs *in vivo*, empêcher une activation efficace des LTs et induire des Tregs CD8⁺CD40Ig. Dans notre stimulation *ex vivo*, les pDCs à l'état immature, aux capacités de phagocytose et d'apprêtement des antigènes peu efficaces (Hubert et al., 2004), n'activent pas les Tregs CD8⁺CD40Ig. Elles requièrent un signal d'activation par le CpG pour présenter les allopeptides et induire une activation significative des Tregs spécifiques. Pour les besoins de notre étude, les Tregs CD8⁺CD40Ig mémoires possiblement générées *in vivo* par interaction avec des DCs « semi-matures » ont été réactivées *ex-vivo* avec des pDCs activées et matures.

L'activation des Tregs CD8⁺CD40Ig en réponse à 82 peptides allogéniques de 16 AAs a été étudiée. Deux peptides en particulier sont reconnus par ces cellules et induisent une surexpression significative de CD25 à la surface. Le peptide immunodominant Du51, de

séquence NREEYARFSDVGEYR, dérive de la molécule du CMH-II RT1.D^u alors que le peptide Bu31 sous-dominant, YLRRYDSDVGEYRAVTE, dérive de la molécule du CMH-II RT1.B^u. Les AAs différant entre donneur et receveur sont soulignés. De façon intéressante, ces deux 16-mer partagent une séquence commune de 8 AAs **DSDVGEYR**. Les allopeptides Bu31 et Du51 de notre étude correspondent respectivement aux peptides 13 et 33 de l'étude de C. Ballet, où ils ne sont pas reconnus par les splénocytes effecteurs du rejet aigu d'allogreffe dans la combinaison LEW.1W/LEW.1A sans autre traitement (Ballet et al., 2009). Par ailleurs, les peptides immunogènes 29 et 37 identifiés dans cette étude ne sont pas reconnus par les Tregs CD8⁺CD40Ig dans notre système. L'activation des LTs CD8⁺CD45RC^{high} issus d'animaux traités avec CD40Ig, en présence de pDCs syngéniques et matures et des peptides Bu31 ou Du51, a également été analysée. Le peptide Du51 induit une surexpression significative de CD25, moins élevée que lors de la stimulation de Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, mais suggérant néanmoins sa reconnaissance par une fraction des LTs CD8⁺CD45RC^{high}. Cette observation implique l'existence d'une population spécifique du peptide Du51 parmi les LTs CD8⁺CD45RC^{high}, de phénotype non étudié, ce qui a été confirmé par la suite grâce au marquage avec un tétramère. L'activation par le peptide Bu31 est moins forte et non significative.

Nous avons par la suite testé l'activation des Tregs en réponse à une série d'allopeptides plus courts, dérivés du 16-mer Du51 et des 16-mer chevauchants Bu31 et 32. Historiquement, les études de bibliothèques de peptides aléatoires et de spectrométrie de masse se sont limitées à des longueurs courtes de 8 à 10 AAs et ont permis le développement d'outils puissants de prédictions d'épitopes antigéniques potentiels mais n'excédant pas 11 AAs. Pourtant, environ 10% des peptides présentés ont une longueur supérieure à 11 AAs (Burrows et al., 2006), allant même jusqu'à 25 AAs (Bell et al., 2009). Les études récentes suggèrent que le CMH-I peut apprêter des peptides beaucoup plus longs que précédemment établi, invitant à élargir les études et les algorithmes de liaison à des peptides allant jusqu'à 15/16 AAs. De façon intéressante, seul le dérivé peptidique 51-18, REEYARFSDVGEYR, active les Tregs de façon équivalente au peptide Du51. D'après les critères établis, sa longueur de 15 AAs est inhabituelle pour une présentation sur une molécule du CMH-I. Toutefois, le sillon du CMH-I RT1.A^a de rat accommode préférentiellement des peptides de 9 à 15 AAs et possédant une arginine en C-term (Stevens et al., 1998a), capable de former de nombreux ponts hydrogènes et interactions électrostatiques avec la poche F du sillon. La structure cristallographique du RT1.A^a en complexe avec un AgmH nommé MTF-E de 13 AAs a par ailleurs été publiée,

révélant deux structures possibles du peptide, lequel forme un renflement important hors de la poche peptidique et présente une surface de liaison plus importante pour le TCR (Speir et al., 2001). Le peptide 51-18 possède une arginine (R) en N-term et en C-term qui peut servir de point d'ancrage dans les poches A et F du sillon, comme suggéré par l'analyse des résidus ancrés favorables après l'élution de 9-mers recombinés à RT1.A^a par le groupe de Joly (Stevens et al., 1998b). L'acide glutamique hydrophile (E) a également été décrit comme une ancre favorable en position 2 (P2) dans l'étude de Powis (Powis et al., 1996). Notre hypothèse suggère que les AAs centraux dépassent largement en dehors du sillon dans une conformation dite « bulged » ou forment un « zig-zag » au sein de la poche. La database structurale PDB contient des structures CMH-Ip avec des peptides longs jusqu'à 16 AAs, mais pour lesquelles seul l'ancrage du peptide en N-term et C-term est visible (Bade-Döding et al., 2011). La région centrale renflée du peptide est désordonnée et non visible, en accord avec un haut degré de mobilité du peptide (Miles et al., 2006; Probst-Kepper et al., 2004; Tynan et al., 2007). Afin d'élucider la structure tridimensionnelle du complexe RT1.A^a/Du51, les protéines recombinantes formant la chaîne RT1.A^a ont été repliées avec le peptide Du51 *in vitro*. Les complexes obtenus ont été biotinylés pour former des tétramères utilisables en cytométrie en flux. La cristallisation du complexe RT1.A^a/Du51 est actuellement à l'essai par l'équipe du Dr Housset de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. L'obtention de la structure de ce complexe CMH du soi/allopeptide reconnu par des Tregs CD8⁺ permettra de comprendre le mode de fixation d'un peptide inhabituellement long (résidus ancrés et exposés) et de prédire l'influence d'une substitution de résidu sur la présentation du peptide et la reconnaissance par le TCR des Tregs CD8⁺. Par exemple, nous pouvons imaginer que la tyrosine (Y) allogénique en P5 du Du51 soit un résidu ancre important, permettant le renflement des résidus P8 à P13 ou P14 en dehors du sillon, potentiellement contactés par les TCRs spécifiques. Il est probable que le peptide soit flexible dans le sillon et adopte plusieurs conformations différentes. Les TCRs spécifiques pourraient alors reconnaître une seule conformation ou déformer les différentes structures du CMHp non liées lors de la reconnaissance (Tynan et al., 2007). En outre, notre système offre la possibilité de générer des mutants du peptide allogénique. Dans un premier temps, chaque AA sera remplacé par une alanine et l'activation des Tregs CD8⁺CD40Ig en réponse au mutant sera évaluée *ex vivo*. La mutation de certains acides aminés pourrait entraîner une baisse d'affinité des Tregs pour le complexe CMHp, ne permettant pas leur activation, comme cela a été décrit pour la réponse de LTs CD8⁺ OT-I à différents mutants d'un peptide dérivé d'OVA (Denton et al., 2011). Des analyses structurales et biophysiques des complexes CMH/peptide mutant permettront par ailleurs d'étudier

l'impact de la mutation sur la conformation et la stabilité du peptide, influençant la reconnaissance par le TCR. D'autre part, plusieurs dérivés des peptides Bu31 et 32 sont reconnus par les Tregs CD8⁺CD40Ig, de longueurs et de séquences différentes, rendant l'interprétation des résultats plus complexe. Ainsi, le 12-mer 31-11, YLRYDSDVGEYR, induit une activation des Tregs équivalente au peptide Bu31. Sa séquence semble favorable à l'apprêtement sur le RT1.A^a, avec une leucine (L) en P2 et une arginine (R) en C-term. Le dérivé 31-16 possède une séquence proche du 31-11 avec deux acides aminés de plus en C-term (AV) et active également fortement les Tregs. Enfin, le 15-mer 31-20, de séquence LRYDSDVGEYRAVTE, est potentiellement reconnu par les Tregs CD8⁺CD40Ig. Ces trois dérivés partagent la séquence commune DSDVGEYR avec le peptide Bu31 mais également le Du51, suggérant la possibilité qu'un même pool de Tregs crossréactifs reconnaisse ces différents peptides. Après la production de tétramère de complexe RT1.A^a/Bu31 et RT1.A^a/31-11, nous réaliserons des co-marquages avec le tétramère RT1.Aa/Du51 afin d'explorer cette hypothèse. Il est possible que l'affinité de l'interaction TCR des Tregs avec les complexes RT1.A^a/Bu31 ou dérivés et RT1.A^a/Du51 soit plus ou moins élevée, expliquant ainsi les différences de réponse *in vitro* des Tregs. L'analyse structurale du peptide sous-dominant Bu31 et de ses dérivés sera également réalisée.

Afin d'étudier le phénotype des Tregs stimulées *in vitro* par les peptides Du51 et Bu31, l'expression de différents marqueurs et la sécrétion de cytokines dans le surnageant de coculture ont été analysées. En accord avec les résultats précédemment publiés (Guillonnet et al., 2007a), les Tregs CD8⁺CD40Ig stimulées par les peptides dominants sécrètent de grandes quantités d'IFN γ , comme révélé par marquage intracellulaire (non montré) et par ELISA. Les forts taux d'IL-12 observés dans les différentes conditions de stimulation sont probablement le fait des pDCs maturées avec le CpG (Hubert et al., 2004). Par ailleurs, l'IL-10 et le TGF- β détectés dans le surnageant peuvent être produits par les Tregs CD8⁺CD40Ig, bien qu'un rôle de ces cytokines dans leur activité suppressive ait été écarté (Li et al., 2010). Plusieurs études décrivent la sécrétion possible de ces cytokines par les pDCs humaines ou murines (Kang et al., 2007; Parcina et al., 2009), mais pas par les pDCs activées de rat (Hubert et al., 2004). La stimulation des Tregs CD8⁺CD40Ig par les peptides Bu31 et Du51 induit la surexpression de CD25, CD28, CMH-II et CD71 par rapport à la stimulation sans peptide et à la stimulation avec un peptide contrôle. L'expression relativement élevée (30 à 40%) des différents marqueurs, observée après six jours de stimulation avec des pDCs syngéniques seules, peut s'expliquer par la sécrétion de cytokines des pDCs matures, activant

légèrement les Tregs syngéniques dans notre test. De façon intéressante, le marqueur CD71 est utilisé dans l'étude de Sagoo, en association avec le CD69 (absent chez le rat), pour sélectionner les Tregs humaines CD4⁺CD25⁺ spécifiques d'alloantigènes, enrichies après stimulation avec des DCs allogéniques *ex-vivo* (Sagoo et al., 2011). Par ailleurs, les Tregs CD8⁺CD40Ig ne semblent pas exprimer FoxP3. Il serait également intéressant d'analyser la production des cytokines FGL2 et IL-34 impliquées dans la fonction suppressive des Tregs CD8⁺, après stimulation *in vitro* par les allopeptides (Li et al., 2010)(Bézie, Picarda et al., en révision)(Bézie, Picarda et al., en préparation).

Par ailleurs, les Tregs stimulées par le peptide immunodominant Du51 maintiennent leur activité suppressive après activation *in vitro*. En effet, elles inhibent la prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs syngéniques en présence de pDCs du donneur. En revanche, les Tregs qui ne sont pas activées lors de la coculture avec un peptide contrôle survivent difficilement et perdent leur capacité suppressive. Grâce au tétramère de complexe CMHp RT1.A^a/Du51 généré, nous avons récemment trié les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques de Du51 afin d'étudier leur capacité suppressive *in vitro*. De façon très intéressante, les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques de Du51 inhibent plus efficacement la prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs, stimulés par la voie directe d'alloreconnaissance, que les Tregs non spécifiques du Du51 et les nTregs CD8⁺CD45RC^{low} polyclonales. Notre hypothèse suggère que le traitement CD40Ig, associé à la transplantation, induirait la génération de Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques de Du51 à partir de précurseurs naïfs T CD8⁺CD45RC^{low} et/ou CD8⁺CD45RC^{high}, leur conférant des propriétés tolérogènes augmentées par rapport aux Tregs CD8⁺CD40Ig non-spécifiques et aux nTregs CD8⁺CD45RC^{low}. Dans cette MLR, les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques de Du51, triées avec le tétramère, sont sélectionnées pour la reconnaissance d'un complexe CMH du soi (RT1.A^a)/allopeptide (Du51). Leur TCR de spécificité indirecte ne peut donc pas interagir avec les complexes CMH étranger/peptide présentés par les pDCs du donneur. Or, nous avons décrit auparavant que les Tregs nécessitent un contact avec les pDCs pour exercer leur activité suppressive (Li et al., 2010). Dans notre test, il est possible que les Tregs de spécificité indirecte soient activées par la liaison aux tétramères, qui peuvent stimuler fortement les LTs (Wooldridge et al., 2009). Dans ce cas, les Tregs CD8⁺ pourraient ne pas requérir d'autres interactions TCR/CMHp avec les pDCs pour inhiber la prolifération des LTs CD4⁺ de manière très efficace. De plus, les Tregs spécifiques du Du51 sont des cellules mémoires qui ont déjà rencontré l'antigène et peuvent être réactivées en l'absence de costimulation. Enfin, dans cette MLR, à défaut de jouer un rôle

dans la présentation antigénique aux Tregs spécifiques du Du51, les pDCs peuvent leur délivrer des signaux de façon « bystander » non spécifique, comme décrit récemment pour des Tregs transgéniques CD4⁺ (Wan et al., 2013). Ces résultats sont en accord avec plusieurs études démontrant un potentiel supérieur des Tregs de spécificité indirecte *in vitro* (Hara et al., 2001; Jiang et al., 2006). Nous réalisons actuellement une MLR indirecte, où les Tregs spécifiques du Du51 triées sont mises en présence de pDCs syngéniques chargées avec un lysat de cellules du donneur et de LTs CD4⁺ syngéniques. Ce test permettra d'évaluer la capacité suppressive des Tregs sur la prolifération des LTs CD4⁺ stimulés par la voie de présentation indirecte des antigènes du donneur.

Afin d'étudier l'importance des Tregs de spécificité indirecte dans l'induction de la tolérance, 2,5 millions de Tregs CD8⁺CD40Ig déplétées en cellules spécifiques du Du51 ont été transférées adoptivement *in vivo* à des receveurs secondaires naïfs irradiés et greffés. De manière très intéressante, ces cellules ne permettent pas le transfert de la tolérance, contrairement aux Tregs CD8⁺CD40Ig totales (Guillonnet et al., 2007a). Ces résultats préliminaires suggèrent que la population spécifique d'alloantigène est nécessaire à l'activité suppressive globale du pool de Tregs CD8⁺CD40Ig et à l'induction de tolérance *in vivo*. De façon similaire, dans l'étude de Tsang, le transfert de Tregs CD4⁺ de spécificité directe uniquement n'inhibe pas le rejet d'allogreffe cardiaque, contrairement au transfert de Tregs portant une spécificité double (directe et indirecte)(Tsang et al., 2008). Nos observations font écho à l'étude récemment publiée du groupe de Cantor. En effet, dans leur modèle d'arthrite auto-immune chez la souris, le transfert de Tregs CD8 α ⁺ tétramères négatives, à savoir déplétées en Tregs spécifiques du complexe Qa-1/Hsp60_{p216}, ne prévient pas du développement de l'arthrite (Leavenworth et al., 2013). En revanche, le transfert des Tregs tétramères positives spécifiques, expandues *in vitro* avec de l'IL-15 complexé, protège de la maladie. Dans notre étude, nous avons transféré uniquement la fraction négative des Tregs marquées avec le tétramère du fait du nombre insuffisant de Tregs spécifiques du Du51 triées. Dans le but d'expandre ces cellules *ex-vivo* avant leur transfert *in vivo*, nous testerons différentes conditions de culture, notamment avec de l'IL-2, IL-15, une stimulation anti-CD3 et anti-CD28 ou avec des pDCs syngéniques chargées avec le peptide Du51. Un transfert *in vivo* des Tregs spécifiques du Du51 enrichies sera réalisé et devrait permettre d'obtenir une survie à long-terme de l'allogreffe cardiaque.

Pour la première fois chez le rat en transplantation, la génération d'un tétramère de complexe RT1.A^a/Du51 nous a permis d'évaluer la proportion de LTs spécifiques dans la rate et le greffon deux semaines et quatre mois après la greffe. Li a montré que les Tregs s'accumulent en premier lieu dans le greffon (une semaine) et plus tardivement dans la rate (un mois), bien que le transfert adoptif des splénocytes à une semaine induise une survie chez 50% des receveurs. Nos résultats préliminaires de marquage avec le tétramère deux semaines après la greffe montrent qu'un nombre élevé de Tregs spécifiques du Du51 infiltrent le greffon des rats traités avec CD40Ig, suggérant un recrutement précoce des Tregs allospécifiques. Par ailleurs, nous avons détecté des cellules spécifiques du Du51 au sein des nTregs CD8⁺CD45RC^{low} et des LTs CD8⁺CD45RC^{high} naïfs de la rate, suggérant que les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51, enrichies chez les animaux long terme, peuvent dériver de précurseurs présents dans ces deux populations naïves, comme décrit pour les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ dans un modèle murin de tolérance à l'allogreffe cardiaque induite par le traitement DST + anti-CD4 (Francis et al., 2011). Par ailleurs, des cellules spécifiques du Du51 sont présentes parmi les LTs CD8⁺CD45RC^{high} issus d'animaux long terme. Afin d'identifier la nature régulatrice ou effectrice de ces cellules, elles seront triées avec le tétramère et testées pour leur capacité suppressive dans une MLR comme précédemment décrit. Notre système offre l'opportunité de générer et d'expandre *in vitro* des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques du Du51, à partir de nTregs ou de LTs CD8⁺CD45RC^{high} naïfs. Ainsi, ces deux populations seront cultivées avec des pDCs syngéniques chargées avec l'allopeptide en présence de différentes cytokines, puis transférées *in vivo* à des receveurs naïfs avant la transplantation. En outre, dans le but d'étudier la distribution des Tregs spécifiques au sein des organes, la réalisation de marquages immunohistologiques de rates et de greffons d'animaux long terme avec le tétramère RT1.A^a/Du51 sont prévus, comme cela a été décrit (Panoskaltis-Mortari et al., 2008).

La caractérisation phénotypique des Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 sera réalisée. Dans ce but, nous pourrions procéder à un enrichissement magnétique des cellules tétramère positives (Moon et al., 2009). En effet, de très nombreuses études utilisent cette technique pour l'analyse phénotypique de la population d'intérêt par cytométrie en flux. Après tri à l'ARIA, l'ARN des cellules tétramère positives pourra également être extrait, permettant l'analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR ou par la réalisation de puces à ADN. De façon similaire aux études réalisées sur la population totale CD8⁺CD40Ig, une analyse comparative de l'expression de gènes entre la population restreinte de Tregs

CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 et les nTregs CD8⁺CD45RC^{low} sera conduite et permettra certainement d'identifier de nouveaux gènes et/ou d'affiner la liste de gènes déjà établie associés à la tolérance (Angin, Le Mauff, résultats non publiés). En particulier, nous étudierons avec intérêt l'expression de la molécule du CMH-II par ces cellules. En effet, cette molécule distingue deux populations cellulaires chez les Tregs CD4⁺ humaines (Baecher-Allan et al., 2004). Dans notre modèle, environ 30% des Tregs CD8⁺CD40Ig expriment le CMH-II. Ces cellules sont localisées dans le greffon et dans la rate et expriment fortement la molécule CD28 (Picarda et al., résultats non publiés). De façon intéressante, les Tregs CD8⁺CD40IgCMH-II⁺ sont capables de transférer la tolérance *in vivo*, contrairement aux Tregs CMH-II⁻. Pourtant, les études *in vitro* ne révèlent pas de différences dans l'activité suppressive de ces deux sous-types de Tregs (Picarda et al., résultats non publiés), contrairement aux études chez l'Homme (Schaier et al., 2012). Par ailleurs, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité *in vitro* en co-incubant des LTs CD4⁺, des pDCs allogéniques et des Tregs, démontrant pour la première fois une capacité cytotoxique des Tregs CD8⁺CD40Ig totales. Ces résultats préliminaires révèlent une légère tendance vers une cytotoxicité plus élevée des Tregs CMH-II⁺ à de forts ratios, en accord avec l'expression plus importante de plusieurs gènes impliqués dans la mort cellulaire que sont granzyme B, syntaxine, DAPK, perforine par les Tregs CMH-II⁺ (Picarda et al., résultats non publiés). Il est donc intéressant d'évaluer l'expression de la molécule du CMH-II par les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51, car elle pourrait jouer un rôle fonctionnel dans leur activité suppressive par interaction avec les LTs CD4⁺ induisant leur anergie et leur apoptose (Chai et al., 1998; Sidhu et al., 1992).

Des résultats préliminaires de notre équipe ont mis en évidence un biais vers l'utilisation préférentielle de la chaîne V β 11 du TCR par les Tregs CD8⁺CD40Ig de la rate, suggérant une expansion oligoclonale de ces cellules par la sélection et l'expansion d'une population spécifique d'alloantigènes communs (Guillonnet et al., 2007a). De plus, le greffon des rats long terme, largement infiltré par les Tregs CD8⁺ (Guillonnet et al., 2007a), présente plusieurs altérations des chaînes V β du TCR, notamment les chaînes V β 1, V β 7, V β 15, V β 17, V β 11 et V β 18, avec une accumulation des transcrits des chaînes V β 11 et V β 18. Le répertoire TCR des GITCs du greffon traité avec CD40Ig 120 jours après la greffe a été comparé au répertoire des Tregs de la rate car il est impossible d'analyser un greffon contrôle LEW.1W/LEW.1A si tardivement après son rejet. Dans un premier temps, le séquençage du

CDR3 β a été réalisé sur la population globale de Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du donneur, puis nous avons récemment affiné l'étude et confirmé les résultats grâce à l'utilisation du tétramère RT1.A^a/Du51 (tri global des tétramères positives). Conformément aux études publiées sur le répertoire des nTregs (Pacholczyk and Kern, 2008; Pomié et al., 2011), celui des nTregs CD8⁺CD45RC^{low} est polyclonal et très divers pour les chaînes V β 11 et V β 18 d'intérêt. En revanche, le répertoire des Tregs CD8⁺CD40Ig de la rate tend à être plus restreint que celui des nTregs de la rate, alors que celui des Tregs du greffon est significativement plus restreint. Toutefois, les nouveaux résultats générés, étudiant le répertoire de la chaîne V β 11 recombinaison par les Tregs spécifiques du Du51, révèlent un répertoire limité et plus restreint que celui du pool total de Tregs CD8⁺CD40Ig de la rate, mais de diversité équivalente à celui du greffon. Sur la soixantaine de TCRs séquencés par animal, aucun clonotype ou motif en AAs partagé n'a pu être mis en évidence, démontrant le caractère privé du répertoire spécifique d'antigène, avec la présence d'un biais de type 1 du TCR (cf § 2.4.1 Les différents biais du répertoire) et d'un CDR3 prédominant de 9 AAs (Turner et al., 2006). Bien que la chaîne V β 18 ne soit pas biaisée dans la rate (Immunoscope), les Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 semblent la recombinaison, tout comme les GITCs du greffon. Le séquençage du CDR3 β de la chaîne V β 18 des Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 est en cours, afin de confirmer un réel biais vers l'utilisation de cette chaîne. Le répertoire V β 18 du greffon est quand à lui très biaisé et restreint (CDR3 prédominant de 7 AAs), avec un clonotype partagé par trois animaux sur six. L'ensemble de ces résultats suggère l'accumulation préférentielle de Tregs allospécifiques avec un TCR biaisé dans la rate, mais aussi et surtout au niveau du transplant, source continue d'alloantigènes, où elles restent localisées pour assurer le maintien de la régulation immune, permettant même de prolonger la survie d'allogreffe après retransplantation du greffon long-surviveur chez un receveur naïf (Li et al., 2010). Il est important de noter que l'étude du répertoire a été réalisée sur un nombre limité de TCRs par animal et n'est que le reflet de la sélection aléatoire d'une population beaucoup plus large. Des techniques de séquençage haut débit permettraient d'étudier des dizaines de milliers de séquences et peut-être de trouver des répertoires publics (technique en développement pour le rat mais non disponible à l'heure actuelle). Par ailleurs, ces observations ne concernent que la chaîne β du TCR, étudiée le plus souvent en priorité pour cause de manque d'outils (amorces, anticorps) ciblant la chaîne α . Or d'après différentes études, la chaîne α du TCR contribue largement à la reconnaissance spécifique du complexe CMHp (Day et al., 2011; Yokosuka et al., 2002) et pourrait être cruciale pour la

reconnaissance du complexe RT1.A^a/Du51 dans notre modèle. Afin de caractériser le TCR des Tregs allospécifiques au niveau structural et moléculaire, nous réaliserons un tri unicellulaire des Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 de haute affinité pour le complexe CMHp, c'est-à-dire les plus fortement marquées par le tétramère. L'utilisation des chaînes α et β sera confirmée par PCR et séquençage. Comme suggéré par l'étude globale du répertoire, il est probable que de nombreux clonotypes différents soient identifiés. Toutefois, la présence d'un motif commun parmi les Tregs de haute affinité n'est pas à exclure. Après la sélection d'un ou de plusieurs couples $\alpha\beta$, le TCR spécifique sera cloné, produit, purifié et caractérisé structurellement en collaboration avec S. Gras de l'équipe du DR. Rossjohn (Protein Crystallography Unit, Monash University, Australia). Si la cristallisation du complexe RT1.A^a/Du51 est obtenue, le ou les TCRs spécifiques seront mis en complexe avec le CMHp. L'obtention d'une co-structure d'un TCR de Tregs/allopeptide/CMH serait une première et permettrait de comprendre le mode de reconnaissance par les Tregs CD8⁺ d'un allopeptide long, sélectionnant un répertoire TCR restreint et privé. Très peu d'études corrélient l'influence de la diversité du répertoire TCR avec la qualité de la réponse immune. Une grande diversité du répertoire TCR des nTregs serait cruciale pour leur expansion *in vivo*, le remodelage du répertoire en périphérie et les capacités suppressives *in vivo*. En effet, la présence d'un répertoire TCR naïf divers plutôt que restreint augmente la probabilité qu'il contienne un clone spécifique d'un antigène, quel qu'il soit (Wing and Sakaguchi, 2011). Ainsi, lors de la rencontre avec les auto- ou alloantigènes en périphérie, les Tregs hautement diverses s'expandent et survivent plus efficacement que des Tregs au répertoire TCR restreint, elles remodelent leur répertoire en réponse à l'antigène et inhibent ainsi les réponses immunes aux autoantigènes de tissu ou aux alloantigènes, et ce de façon spécifique de l'antigène. En ce sens, le transfert de Tregs CD4⁺ polyclonales hautement diverses permet une meilleure inhibition des réponses T alloimmunes *in vivo* dans un modèle de GvHD chez la souris (Föhse et al., 2011), pouvant s'expliquer par une probabilité accrue de l'émergence de Tregs spécifiques d'antigènes. Par ailleurs, dans un modèle de colite induite par le transfert de LTs pathogènes chez la souris, le co-transfert de Tregs CD8⁺CD28⁻ WT prévient du développement de la maladie, contrairement à celui de Tregs CD8⁺CD28⁻ déficients pour AIRE (Pomié et al., 2011). Les auteurs attribuent ce défaut à une altération fine du répertoire TCR des Tregs AIRE⁰, chez lesquels des spécificités antigéniques nécessaires à la prévention de la colite pourraient manquer. Enfin, Adeegbe a montré que la diversité élevée des TCRs de Tregs CD4⁺ avant leur transfert *in vivo* conduit à la sélection d'un pool de Tregs

thérapeutiques aux TCRs biaisés après transfert, qui préviennent de l'autoimmunité chez des souris IL2R $\beta^{-/-}$ (Adeegbe et al., 2010). De façon similaire, la présence d'un répertoire TCR divers des nTregs CD8⁺CD45RC^{low} dans notre modèle va favoriser l'expansion de Tregs CD8⁺CD40Ig spécifiques du Du51 après la transplantation et le traitement CD40Ig, créant un remodelage du répertoire en périphérie avec l'apparition de biais V β 11 et V β 18, et assurant un contrôle plus efficace des réponses alloimmunes.

Enfin, l'identification de l'allopeptide dominant reconnu par les Tregs CD8⁺CD40Ig nous a permis de tester son potentiel thérapeutique *in vivo* dans l'induction de tolérance à l'allogreffe. Plusieurs études ont démontré les effets immunomodulateurs de peptides synthétiques, dérivés des régions conservées des molécules du CMH, sur les réponses alloimmunes (Zang and Murphy, 2005), *in vitro* par inhibition de la progression du cycle cellulaire (Boytim et al., 1998) ou induction d'apoptose (Murphy et al., 1999) et *in vivo* par inhibition de l'activation et de la fonction effectrice de LTs allogéniques dans un modèle murin de DST (Murphy et al., 2003). De plus, l'administration d'un peptide dérivé de la molécule HLA-B7 nommé Allotrap, associé à la ciclosporine, prolonge l'allogreffe de peau chez la souris (Buelow et al., 1995) et de cœur chez le rat, tout en atténuant l'artériosclérose (Murphy et al., 1997). Les effets immunomodulateurs de ce peptide ont été associés à la modulation de l'activité d'HO-1 (Iyer et al., 1998). D'autre part, l'administration intratrachéale d'un 15-mer dérivé de la région hypervariable de H2-K^b prolonge la survie d'allogreffe cardiaque (Akiyama et al., 2002) ou induit une tolérance en combinaison avec un anticorps anti-CD4 non déplétant (Aramaki et al., 2003), et génère des cellules régulatrices chez la souris. Enfin, d'après une étude pilote chez l'Homme, l'administration orale de faibles doses de peptides dérivés des molécules du CMH du donneur (HLA-DR2), à des patients présentant des dysfonctions chroniques rénales de l'allogreffe, induit une inhibition complète de l'alloréactivité indirecte *in vitro* (Womer et al., 2008). En revanche, les mécanismes de suppression n'ont pas été élucidés. Dans notre modèle, nous avons testé l'administration intraveineuse et intrapéritonéale des peptides Bu31 et Du51, dérivés des molécules du CMH-II du donneur. La voie intraveineuse n'a pas permis de prolongation significative de l'allogreffe cardiaque. D'après une étude de Sireci, l'infusion du peptide HY à des souris femelles, par voie intrapéritonéale grâce à des mini-pompes osmotiques, induit des Tregs CD8⁺ capables de retarder le rejet de greffe de peau mâle (Sireci et al., 2009). L'implantation des mini-pompes chargées avec les allopeptides le jour de la greffe n'a pas permis de prévenir le rejet d'allogreffe. En revanche, l'infusion continue du peptide Du51, débutant une semaine

avant la greffe et jusqu'à trois semaines post-greffe, induit une prolongation significative de la survie d'allogreffe cardiaque sans autre traitement, avec une survie indéfinie de l'allogreffe chez 25% des receveurs. De façon intéressante, la combinaison du peptide Du51 et d'un anticorps déplétant OX8 empêche l'induction de tolérance par le peptide Du51. Ce résultat suggère que l'allopeptide Du51, administré en faible dose de façon sous-immunogène, génère *in vivo* des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques, capables d'inhiber le rejet d'allogreffe. De plus, l'administration conjointe du peptide Du51 et d'un anticorps bloquant anti-CMH-I ne prévient pas du rejet d'allogreffe chez 4 animaux sur 5 (expérience toujours en cours), impliquant la nécessité d'une interaction avec le CMH-I pour l'induction de tolérance. Notre hypothèse est que le peptide Du51 infusé *in vivo* va être apprêté sur les molécules du CMH-I des pDCs de la rate. Bien que le peptide se replie *in vitro* avec la molécule du CMH-I classique RT1.Aa, une présentation sur le CMH-I non classique RTBM-1, analogue de Qa-1 et HLA-E, ne peut être exclue. En effet, des populations de Tregs CD8⁺ restreintes à Qa-1 chez la souris et HLA-E chez l'Homme ont été décrites, suggérant l'existence possible de Tregs CD8⁺ restreintes à RTBM-1 chez le rat. Après l'apprêtement du peptide *in vivo*, la reconnaissance du complexe CMHp par le TCR des LTs CD8⁺CD45RC^{high} et/ou nTregs CD8⁺CD45RC^{low}, en conditions tolérogènes, va induire la génération et l'expansion de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques d'alloantigènes, capables de contrôler le rejet aigu et chronique d'allogreffe. En effet, l'analyse des deux animaux long terme traités avec le peptide a révélé une inhibition totale des réponses humorales anti-donneur et une absence de signes de rejet chronique dans le greffon. Des expériences de transfert adoptif de splénocytes et de Tregs ont été réalisées mais les receveurs secondaires n'ont survécu que quelques heures après l'intervention à cause de problèmes techniques chirurgicaux, ne permettant pas de conclure sur la capacité de transfert de la tolérance. Des expériences sont en cours pour répondre à cette interrogation. Nous avons par ailleurs tenté d'associer le traitement peptidique avec une dose sous-optimale de ciclosporine ou de rapamycine, sans amélioration notable de la survie d'allogreffe. Un vecteur adénoviral codant pour le peptide Du51 sous le contrôle d'un promoteur CMV, formé par la séquence leader de l'IL-10 suivie de deux séquences peptidiques Du51 en tête à queue et d'une séquence poly-A SV40, est actuellement en construction (DeBruyne et al., 2000). Cet outil permettra l'expression rapide, importante et localisée du peptide 51 et devrait permettre d'améliorer la survie d'allogreffe. Concernant le peptide Bu31, nous n'avons pas observé de prolongation de survie lors de son administration aux mêmes doses que le peptide Du51. Ce résultat pourrait s'expliquer par de possibles différences d'affinité et de stabilité du peptide en complexe avec le CMH. Nous testerons des

doses plus élevées de peptide Bu31 ou son association avec un immunosuppresseur à court terme. De manière intéressante, le peptide Du51 identifié dans notre modèle possède 93% d'homologie avec les molécules HLA-DP, DQ et DR humaines. Par ailleurs, une population naturelle de LTs CD8⁺CD45RC^{low} a été décrite chez l'Homme (Ordonez et al., 2009, 2013). Des travaux de notre équipe étudient le potentiel suppresseur de cette population et son rôle en transplantation humaine mais ils ont été réalisés en dehors du cadre de ma thèse. Il serait donc intéressant, et de potentiel intérêt thérapeutique futur, d'étudier la réponse de ces cellules à l'homologue humain du peptide Du51.

En conclusion, notre étude démontre qu'un peptide dérivé du CMH-II du donneur peut être utilisé pour stimuler la génération et la fonction de Tregs CD8⁺ allospécifiques, qui inhibent alors les réponses immunes anti-donneur et induisent un état de tolérance. Nous avons aussi mis en évidence que l'allopeptide sélectionne un répertoire TCR relativement restreint, différent du répertoire polyclonal présent avant la transplantation. Ces résultats soulignent l'importance de l'interaction TCR/peptide/CMH dans la génération et l'expansion de Tregs allospécifiques mais aussi dans l'activation de leur fonction suppressive (**schéma bilan**) et confirme le potentiel thérapeutique de l'utilisation de Tregs spécifiques d'alloantigènes comme stratégie d'induction de tolérance en transplantation.

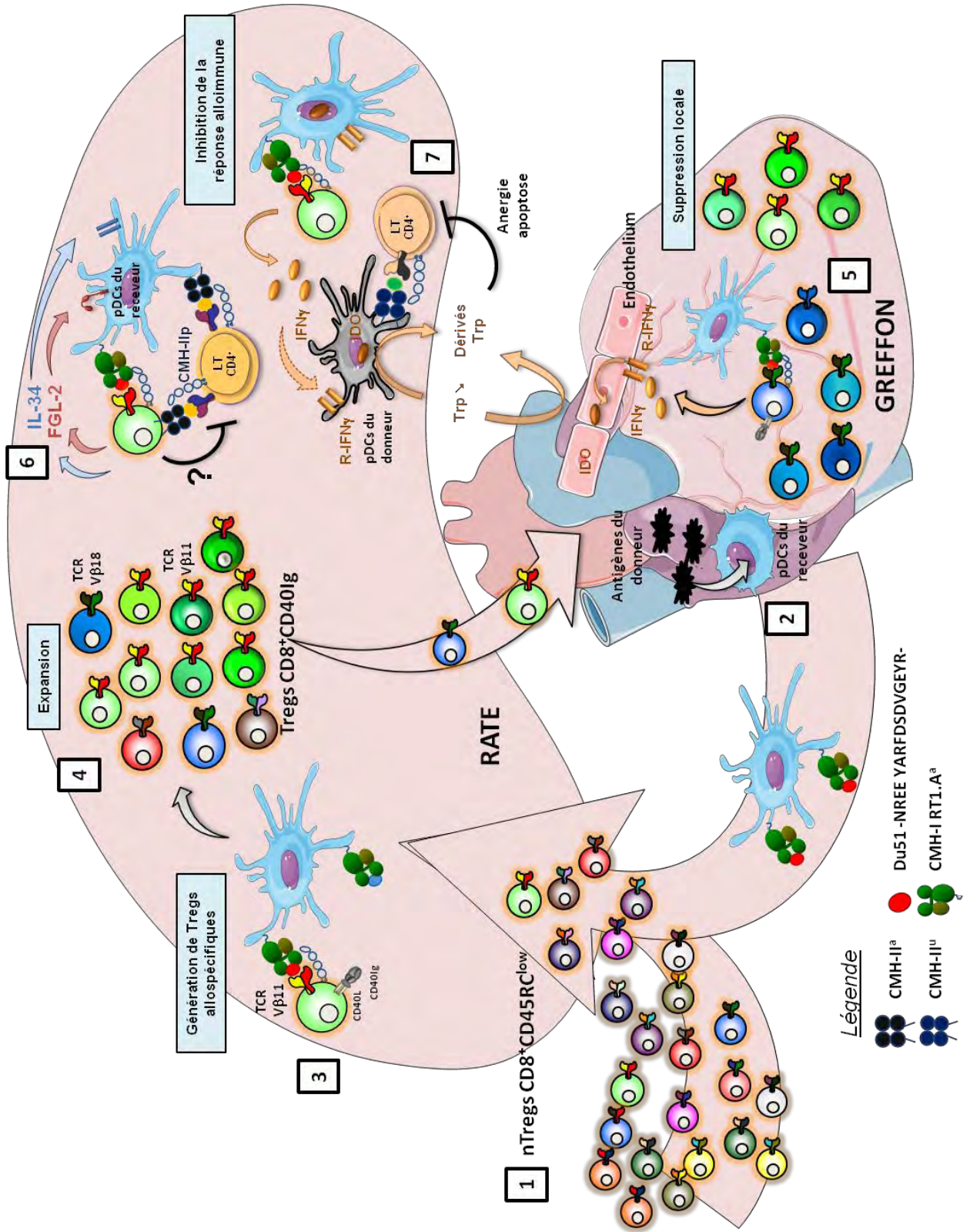


Figure 34 : Schéma bilan du rôle de l'interaction TCR/peptide/CMH dans les mécanismes d'induction, d'expansion et de suppression des Tregs CD8⁺CD45RC^{low}

[1] Avant la transplantation et le traitement par AdCD40Ig, la population de nTregs CD8⁺CD45RC^{low} est polyclonale et possède un répertoire TCR non biaisé et hautement divers (Guillonnet et al., 2007).

[2] Lors de la greffe, les pDCs immatures du receveur vont percevoir des signaux de danger, s'activer et infiltrer le greffon pour capturer des antigènes du donneur. Elles enclenchent alors un processus de maturation, appréhendent de nombreux alloantigènes sur leurs molécules du CMH et migrent vers la rate. Une pDCs du receveur présentant un complexe RT1.A^a du soi/allopeptide Du51 est représentée. Une autre source d'alloantigènes possible est la migration et la mort des DCs du donneur dans la rate (non représenté).

[3] Les Tregs CD8⁺ allospécifiques sont générées par la reconnaissance du complexe RT1.A^a/Du51 par certains clones de nTregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques, recombinaison des chaînes Vβ11 et Vβ18 du TCR (un clone vert Vβ11⁺ est représenté)(Picarda et al., en révision). Une autre hypothèse est la conversion de LTs CD8⁺CD45RC^{high} naïfs spécifiques en Tregs CD8⁺CD45RC^{low} allospécifiques (non représenté).

[4] Suite à la reconnaissance par le TCR, les Tregs CD8⁺ Vβ11⁺ et Vβ18⁺ spécifiques du peptide Du51 s'expandent préférentiellement, créant un biais dans le répertoire TCR. Quatre mois après l'allogreffe, les Tregs Vβ11⁺ allospécifiques sont enrichies dans la rate et possèdent un répertoire TCR restreint et privé (Picarda et al., en révision). Les Tregs spécifiques de Du51 utilisant la chaîne Vβ11, mais avec des régions CDR3 différentes, sont représentées en nuances de vert. Les cellules rouge et marron correspondent aux Tregs non spécifiques du peptide Du51, présentes dans le pool de Tregs CD8⁺CD40Ig.

[5] Dans le greffon des animaux long terme, les Tregs allospécifiques résidentes utilisent préférentiellement les chaînes Vβ11 et Vβ18 du TCR, pour lesquelles la diversité du répertoire CDR3 est limitée, suggérant la migration d'un pool de Tregs spécifiques dans le transplant pour y assurer une immunosuppression locale à long-terme (Picarda et al., en révision). Les Tregs biaisées pour le Vβ18 sont représentées en nuances de bleu.

[6] Les points 6 et 7 illustrent les mécanismes de suppression identifiés dans les études précédentes (Li et al., 2010, Bézie, Picarda et al., en révision, Bézie, Picarda et al., en préparation), appliqués aux Tregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques de Du51 et fortement inhibitrices (Picarda et al., en révision). Elles pourraient inhiber la prolifération des LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs, activés par la voie d'allorecognition indirecte, via la sécrétion des cytokines immunosuppressives FGL2 et IL-34, qui induisent un signal inhibiteur dans les pDCs en se liant à leurs récepteurs spécifiques. L'anergie ou l'apoptose des LTs CD4⁺ par une interaction entre leur TCR et le CMH-II exprimé par une fraction des Tregs CD8⁺CD40Ig est une hypothèse envisageable.

[7] Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques de Du51, activées par les pDCs syngéniques du receveur, pourraient inhiber la prolifération de LTs CD4⁺CD25⁻ effecteurs proches, activés par l'allorecognition directe de complexes CMHp étrangers sur les pDCs du donneur émigrées du greffon. Leur sécrétion d'IFNγ pourrait notamment induire l'expression deIDO par les pDCs. D'autre part, les Tregs sécrètent de l'IFNγ qui induit l'expression deIDO par les cellules endothéliales du greffon (Guillonnet et al., 2007), entraînant la dégradation du tryptophane (Trp) et la production de métabolites pro-apoptotiques responsables de l'anergie et l'apoptose des LTs effecteurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaltonen, J., Björnses, P., Sandkuijl, L., Perheentupa, J., and Peltonen, L. (1994). An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21. *Nat. Genet.* *8*, 83–87.
- Adams, A.B., Williams, M.A., Jones, T.R., Shirasugi, N., Durham, M.M., Kaech, S.M., Wherry, E.J., Onami, T., Lanier, J.G., Kokko, K.E., et al. (2003). Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.* *111*, 1887–1895.
- Adams, A.B., Shirasugi, N., Jones, T.R., Durham, M.M., Strobert, E.A., Cowan, S., Rees, P., Hendrix, R., Price, K., Kenyon, N.S., et al. (2005). Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 542–550.
- Adeegbe, D., Matsutani, T., Yang, J., Altman, N.H., and Malek, T.R. (2010). CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cells with limited TCR diversity in control of autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 56–66.
- Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H., and Hancock, W.W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *Plos One* *6*, e24226.
- Akiyama, Y., Shirasugi, N., Aramaki, O., Matsumoto, K., Shimazu, M., Kitajima, M., Ikeda, Y., and Niimi, M. (2002). Intratracheal delivery of a single major histocompatibility complex class I peptide induced prolonged survival of fully allogeneic cardiac grafts and generated regulatory cells. *Hum. Immunol.* *63*, 888–892.
- Aldrich, C.J., Waltrip, R., Hermel, E., Attaya, M., Lindahl, K.F., Monaco, J.J., and Forman, J. (1992). T cell recognition of QA-1b antigens on cells lacking a functional Tap-2 transporter. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *149*, 3773–3777.
- Allen, C.D.C., Okada, T., Tang, H.L., and Cyster, J.G. (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* *315*, 528–531.
- Amarnath, S., Chen, H., Foley, J.E., Costanzo, C.M., Sennesh, J.D., Solomon, M.A., and Fowler, D.H. (2011). Host-based Th2 cell therapy for prolongation of cardiac allograft viability. *Plos One* *6*, e18885.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* *298*, 1395–1401.
- Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O’Shea, J.J., and Shevach, E.M. (2008). CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* *205*, 1975–1981.
- Angin, M., Poirier, N., Dilek, N., Le Guiner, C., Toromanoff, A., Blancher, A., Cherel, Y., Deschamps, J.-Y., Tillou, X., Renaudin, K., et al. (2012). Gene transfer of human CD40Ig does not prevent rejection in a non-human primate kidney allotransplantation model. *Transpl. Immunol.* *27*, 139–145.
- Anjubault, T., Martin, J., Hubert, F.-X., Chauvin, C., Heymann, D., and Josien, R. (2012). Constitutive expression of TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)/receptor activating NF-κB ligand (RANK)-L by rat plasmacytoid dendritic cells. *Plos One* *7*, e33713.
- Antonysamy, M.A., Fanslow, W.C., Fu, F., Li, W., Qian, S., Troutt, A.B., and Thomson, A.W. (1999). Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 577–584.
- Aoyagi, T., Yamashita, K., Suzuki, T., Uno, M., Goto, R., Taniguchi, M., Shimamura, T., Takahashi, N., Miura, T., Okimura, K., et al. (2009). A human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys: induction and maintenance therapy. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *9*, 1732–1741.
- Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* *199*, 1401–1408.

- Aramaki, O., Shirasugi, N., Akiyama, Y., Takayama, T., Shimazu, M., Kitajima, M., Ikeda, Y., and Niimi, M. (2003). Induction of operational tolerance and generation of regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen combined with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody. *Transplantation* 76, 1305–1314.
- Archbold, J.K., Macdonald, W.A., Miles, J.J., Brennan, R.M., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., Burrows, S.R., and Rossjohn, J. (2006). Alloreactivity between disparate cognate and allogeneic pMHC-I complexes is the result of highly focused, peptide-dependent structural mimicry. *J. Biol. Chem.* 281, 34324–34332.
- Argaet, V.P., Schmidt, C.W., Burrows, S.R., Silins, S.L., Kurilla, M.G., Doolan, D.L., Suhrbier, A., Moss, D.J., Kieff, E., Sculley, T.B., et al. (1994). Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* 180, 2335–2340.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286, 958–961.
- Aschenbrenner, K., D’Cruz, L.M., Vollmann, E.H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L.K., Rolink, A., and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 8, 351–358.
- Ashley, C.W., and Baecher-Allan, C. (2009). Cutting Edge: Responder T cells regulate human DR⁺ effector regulatory T cell activity via granzyme B. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 4843–4847.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O’Garra, A., Biron, C., Brière, F., et al. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* 2, 1144–1150.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190, 995–1004.
- Auchincloss, H., Lee, R., Shea, S., Markowitz, J.S., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1993). The role of “indirect” recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3373–3377.
- Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S.E., Perroni, L., Dagna-Bricarelli, F., Sartirana, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., et al. (2006). Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest.* 116, 1713–1722.
- Bade-Döding, C., Theodosis, A., Gras, S., Kjer-Nielsen, L., Eiz-Vesper, B., Seltsam, A., Huyton, T., Rossjohn, J., McCluskey, J., and Blasczyk, R. (2011). The impact of human leukocyte antigen (HLA) micropolymorphism on ligand specificity within the HLA-B*41 allotypic family. *Haematologica* 96, 110–118.
- Badell, I.R., Thompson, P.W., Turner, A.P., Russell, M.C., Avila, J.G., Cano, J.A., Robertson, J.M., Leopardi, F.V., Strobert, E.A., Iwakoshi, N.N., et al. (2012). Nondepleting Anti-CD40-Based Therapy Prolongs Allograft Survival in Nonhuman Primates. *Am. J. Transplant.* 12, 126–135.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V., and Hafler, D.A. (2004). Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 16, 89–98.
- Baecher-Allan, C., Wolf, E., and Hafler, D.A. (2006). MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 176, 4622–4631.
- Baeten, D., Louis, S., Braud, C., Braudeau, C., Ballet, C., Moizant, F., Pallier, A., Giral, M., Brouard, S., and Souillou, J.-P. (2006). Phenotypically and functionally distinct CD8⁺ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J. Am. Soc. Nephrol. Jasn* 17, 294–304.
- Baker, R.J., Hernandez-Fuentes, M.P., Brookes, P.A., Chaudhry, A.N., Cook, H.T., and Lechler, R.I. (2001). Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 7199–7206.

- Baldwin, K.K., Trenchak, B.P., Altman, J.D., and Davis, M.M. (1999). Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 689–698.
- Ballet, C., Renaudin, K., Degauque, N., Mai, H.L., Boëffard, F., Lair, D., Berthelot, L., Feng, C., Smit, H., Usal, C., et al. (2009). Indirect CD4⁺ TH1 response, antidonor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long-term recipients conditioned by donor antigens priming. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *9*, 697–708.
- Bashuda, H., Kimikawa, M., Seino, K., Kato, Y., Ono, F., Shimizu, A., Yagita, H., Teraoka, S., and Okumura, K. (2005). Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* *115*, 1896–1902.
- Battaglia, M., and Roncarolo, M.-G. (2011a). Immune intervention with T regulatory cells: past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. *Semin. Immunol.* *23*, 182–194.
- Battaglia, M., and Roncarolo, M.-G. (2011b). Immune intervention with T regulatory cells: past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. *Semin. Immunol.* *23*, 182–194.
- Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R., and Roncarolo, M.-G. (2006a). Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin. Immunol.* *18*, 120–127.
- Battaglia, M., Stabilini, A., Draghici, E., Gregori, S., Mocchetti, C., Bonifacio, E., and Roncarolo, M.-G. (2006b). Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* *55*, 40–49.
- Beeston, T., Smith, T.R.F., Maricic, I., Tang, X., and Kumar, V. (2010). Involvement of IFN- γ and perforin, but not Fas/FasL interactions in regulatory T cell-mediated suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *229*, 91–97.
- Bell, M.J., Burrows, J.M., Brennan, R., Miles, J.J., Tellam, J., McCluskey, J., Rossjohn, J., Khanna, R., and Burrows, S.R. (2009). The peptide length specificity of some HLA class I alleles is very broad and includes peptides of up to 25 amino acids in length. *Mol. Immunol.* *46*, 1911–1917.
- Benítez, F., and Najafian, N. (2008). Novel Noninvasive Assays to Predict Transplantation Rejection and Tolerance: Enumeration of Cytokine-Producing Alloreactive T Cells. *Clin. Lab. Med.* *28*, 365–373.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* *393*, 478–480.
- Bensinger, S.J., Bandeira, A., Jordan, M.S., Caton, A.J., and Laufer, T.M. (2001). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J. Exp. Med.* *194*, 427–438.
- Beres, A.J., Haribhai, D., Chadwick, A.C., Gonyo, P.J., Williams, C.B., and Drobyski, W.R. (2012). CD8⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells are induced during graft-versus-host disease and mitigate disease severity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 464–474.
- Bestard, O., Cruzado, J.M., Mestre, M., Caldés, A., Bas, J., Carrera, M., Torras, J., Rama, I., Moreso, F., Serón, D., et al. (2007). Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3⁺ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 4901–4909.
- Betts, R.J., and Kemeny, D.M. (2009). CD8⁺ T cells in asthma: Friend or foe? *Pharmacol. Ther.* *121*, 123–131.
- Bevan, M.J. (1984). High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol. Today* *5*, 128–130.
- Beverly, B., Kang, S.M., Lenardo, M.J., and Schwartz, R.H. (1992). Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int. Immunol.* *4*, 661–671.

- BILLINGHAM, R.E., and MEDAWAR, P.B. (1953). Desensitization to skin homografts by injections of donor skin extracts. *Ann. Surg.* *137*, 444–449.
- Birkeland, M.L., Johnson, P., Trowbridge, I.S., and Puré, E. (1989). Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 6734–6738.
- Bjorndahl, J.M., Sung, S.S., Hansen, J.A., and Fu, S.M. (1989). Human T cell activation: differential response to anti-CD28 as compared to anti-CD3 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* *19*, 881–887.
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* *32*, 129–140.
- Blair, P.J., Riley, J.L., Harlan, D.M., Abe, R., Tadaki, D.K., Hoffmann, S.C., White, L., Francomano, T., Perfetto, S.J., Kirk, A.D., et al. (2000). CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J. Exp. Med.* *191*, 651–660.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 443–473.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network. *Immunity* *31*, 513–525.
- Bonaccorsi, I., Cantoni, C., Carrega, P., Oliveri, D., Lui, G., Conte, R., Navarra, M., Cavaliere, R., Traggiai, E., Gattorno, M., et al. (2010). The immune inhibitory receptor LAIR-1 is highly expressed by plasmacytoid dendritic cells and acts complementary with NKp44 to control IFN α production. *Plos One* *5*, e15080.
- Boor, P.P.C., Metselaar, H.J., Jonge, S. de, Mancham, S., van der Laan, L.J.W., and Kwekkeboom, J. (2011). Human plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ LAG-3⁺ Foxp3⁺ CTLA-4⁺ regulatory T cells that suppress allo-reactive memory T cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1663–1674.
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmethofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., et al. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1303–1310.
- Borg, N.A., Ely, L.K., Beddoe, T., Macdonald, W.A., Reid, H.H., Clements, C.S., Purcell, A.W., Kjer-Nielsen, L., Miles, J.J., Burrows, S.R., et al. (2005). The CDR3 regions of an immunodominant T cell receptor dictate the “energetic landscape” of peptide-MHC recognition. *Nat. Immunol.* *6*, 171–180.
- Le Borgne, M., Ladi, E., Dzhagalov, I., Herzmark, P., Liao, Y.F., Chakraborty, A.K., and Robey, E.A. (2009). The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla. *Nat. Immunol.* *10*, 823–830.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell’Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* *110*, 1225–1232.
- Bos, E.M., Leuvenink, H.G.D., van Goor, H., and Ploeg, R.J. (2007). Kidney grafts from brain dead donors: Inferior quality or opportunity for improvement? *Kidney Int.* *72*, 797–805.
- Bose, A., Inoue, Y., Kokko, K.E., and Lakkis, F.G. (2003). Cutting edge: perforin down-regulates CD4 and CD8 T cell-mediated immune responses to a transplanted organ. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 1611–1614.
- Bouaziz, J.-D., Le Buanec, H., Saussine, A., Bensussan, A., and Bagot, M. (2012). IL-10 producing regulatory B cells in mice and humans: state of the art. *Curr. Mol. Med.* *12*, 519–527.
- Bowerman, N.A., Colf, L.A., Garcia, K.C., and Kranz, D.M. (2009). Different strategies adopted by K(b) and L(d) to generate T cell specificity directed against their respective bound peptides. *J. Biol. Chem.* *284*, 32551–32561.

- Boytim, M.L., Lyu, S.C., Jung, R., Krensky, A.M., and Clayberger, C. (1998). Inhibition of cell cycle progression by a synthetic peptide corresponding to residues 65-79 of an HLA class II sequence: functional similarities but mechanistic differences with the immunosuppressive drug rapamycin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 2215–2222.
- Brady, B.L., Steinel, N.C., and Bassing, C.H. (2010). Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 3801–3808.
- Braudeau, C., Racape, M., Giral, M., Louis, S., Moreau, A., Berthelot, L., Heslan, M., Ashton-Chess, J., Souillou, J.-P., and Brouard, S. (2007). Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *20*, 845–855.
- Braun, M.Y., McCormack, A., Webb, G., and Batchelor, J.R. (1993). Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation* *55*, 177–182.
- Brennan, T.V., Jaigirdar, A., Hoang, V., Hayden, T., Liu, F.-C., Zaid, H., Chang, C.K., Bucy, R.P., Tang, Q., and Kang, S.-M. (2009). Preferential Priming of Alloreactive T Cells with Indirect Reactivity. *Am. J. Transplant.* *9*, 709–718.
- Brenner, D., Krammer, P.H., and Arnold, R. (2008). Concepts of activated T cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *66*, 52–64.
- Broichhausen, C., Riquelme, P., Geissler, E.K., and Hutchinson, J.A. (2012). Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* *17*, 332–342.
- Brown, D.M. (2010). Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cell. Immunol.* *262*, 89–95.
- Brown, K., Sacks, S.H., and Wong, W. (2008). Extensive and bidirectional transfer of major histocompatibility complex class II molecules between donor and recipient cells in vivo following solid organ transplantation. *Faseb J.* *22*, 3776–3784.
- Brown, K., Sacks, S.H., and Wong, W. (2011). Coexpression of Donor Peptide/Recipient MHC Complex and Intact Donor MHC: Evidence for a Link between the Direct and Indirect Pathways. *Am. J. Transplant.* *11*, 826–831.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepers, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* *27*, 68–73.
- Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., and Ware, C.F. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* *373*, 441–444.
- Brunstein, C.G., Miller, J.S., Cao, Q., McKenna, D.H., Hippen, K.L., Curtsinger, J., Defor, T., Levine, B.L., June, C.H., Rubinstein, P., et al. (2011). Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* *117*, 1061–1070.
- Brusko, T.M., Koya, R.C., Zhu, S., Lee, M.R., Putnam, A.L., McClymont, S.A., Nishimura, M.I., Han, S., Chang, L.-J., Atkinson, M.A., et al. (2010). Human Antigen-Specific Regulatory T Cells Generated by T Cell Receptor Gene Transfer. *Plos One* *5*, e11726.
- Buckwalter, M.R., and Albert, M.L. (2009). Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Curr. Biol.* *19*, R355–R361.
- Buelow, R., Veyron, P., Clayberger, C., Pouletty, P., and Touraine, J.L. (1995). Prolongation of skin allograft survival in mice following administration of ALLOTRAP. *Transplantation* *59*, 455–460.

- Bühler, L.H., Spitzer, T.R., Sykes, M., Sachs, D.H., Delmonico, F.L., Tolkoff-Rubin, N., Saidman, S.L., Sackstein, R., McAfee, S., Dey, B., et al. (2002). Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 74, 1405–1409.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.-W.J., Vegoe, A.L., Hsieh, C.-S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008). Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28, 112–121.
- Burrell, B.E., and Bishop, D.K. (2010). Th17 Cells and Transplant Acceptance. *Transplantation* 90, 945–948.
- Burrell, B.E., and Bromberg, J.S. (2012). Fates of CD4+ T cells in a tolerant environment depend on timing and place of antigen exposure. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 576–589.
- Burrows, S.R., Khanna, R., Burrows, J.M., and Moss, D.J. (1994). An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 179, 1155–1161.
- Burrows, S.R., Rossjohn, J., and McCluskey, J. (2006). Have we cut ourselves too short in mapping CTL epitopes? *Trends Immunol.* 27, 11–16.
- Cabaniols, J.P., Fazilleau, N., Casrouge, A., Kourilsky, P., and Kanellopoulos, J.M. (2001). Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *J. Exp. Med.* 194, 1385–1390.
- Campbell, K.A., Ovendale, P.J., Kennedy, M.K., Fanslow, W.C., Reed, S.G., and Maliszewski, C.R. (1996). CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* 4, 283–289.
- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. d., De Francesco, M. a., Fiorentini, S., Peroni, L., Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A., et al. (1997). Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 27, 71–76.
- Carvalho-Gaspar, M., Jones, N.D., Luo, S., Martin, L., Brook, M.O., and Wood, K.J. (2008). Location and time-dependent control of rejection by regulatory T cells culminates in a failure to generate memory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 6640–6648.
- Casiraghi, F., Perico, N., and Remuzzi, G. (2013). Mesenchymal stromal cells to promote solid organ transplantation tolerance. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 18, 51–58.
- Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (2000). Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 5782–5787.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5, 919–923.
- Celli, S., Albert, M.L., and Bousso, P. (2011). Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat. Med.* 17, 744–749.
- Chai, J.G., Bartok, I., Scott, D., Dyson, J., and Lechler, R. (1998). T:T antigen presentation by activated murine CD8+ T cells induces anergy and apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 3655–3665.
- Chang, C.C., Ciubotariu, R., Manavalan, J.S., Yuan, J., Colovai, A.I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., et al. (2002). Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 3, 237–243.
- Chauveau, C., Rémy, S., Royer, P.J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F.-X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., et al. (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106, 1694–1702.

- Chen, L.C., Delgado, J.C., Jensen, P.E., and Chen, X. (2009). Direct expansion of human allospecific FoxP3+CD4+ regulatory T cells with allogeneic B cells for therapeutic application. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 4094–4102.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Chen, W., Liang, X., Peterson, A.J., Munn, D.H., and Blazar, B.R. (2008). The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 5396–5404.
- Chen, Z.K., Cobbold, S.P., Waldmann, H., and Metcalfe, S. (1996). Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. *Transplantation* *62*, 1200–1206.
- Cheong, C., Matos, I., Choi, J.-H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., et al. (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* *143*, 416–429.
- Chiffolleau, E., Bériou, G., Dutartre, P., Usal, C., Soulillou, J.-P., and Cuturi, M.C. (2002). Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 5058–5069.
- Chikuma, S., Terawaki, S., Hayashi, T., Nabeshima, R., Yoshida, T., Shibayama, S., Okazaki, T., and Honjo, T. (2009). PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 6682–6689.
- Christopher Garcia, K., Adams, J.J., Feng, D., and Ely, L.K. (2009). The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nat. Immunol.* *10*, 143–147.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* *17*, 983–988.
- Ciubotariu, R., Colovai, A.I., Pennesi, G., Liu, Z., Smith, D., Berlocco, P., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (1998). Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 5193–5202.
- Clipstone, N.A., and Crabtree, G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* *357*, 695–697.
- Cobbold, S.P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., and Waldmann, H. (2004). Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 6003–6010.
- Coenen, J.J.A., Koenen, H.J.P.M., Rijssen, E. van, Boon, L., Joosten, I., and Hilbrands, L.B. (2006). CTLA-4 Engagement and Regulatory CD4+CD25+ T Cells Independently Control CD8+-Mediated Responses under Costimulation Blockade. *J. Immunol.* *176*, 5240–5246.
- Cole, D.K., Yuan, F., Rizkallah, P.J., Miles, J.J., Gostick, E., Price, D.A., Gao, G.F., Jakobsen, B.K., and Sewell, A.K. (2009). Germ line-governed recognition of a cancer epitope by an immunodominant human T-cell receptor. *J. Biol. Chem.* *284*, 27281–27289.
- Colf, L.A., Bankovich, A.J., Hanick, N.A., Bowerman, N.A., Jones, L.L., Kranz, D.M., and Garcia, K.C. (2007). How a Single T Cell Receptor Recognizes Both Self and Foreign MHC. *Cell* *129*, 135–146.
- Collins, E.J., Garboczi, D.N., and Wiley, D.C. (1994). Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site. *Nature* *371*, 626–629.

- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566–569.
- Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., et al. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* *11*, 1093–1101.
- Colovai, A.I., Mirza, M., Vlad, G., Wang, S. u, Ho, E., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2003). Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum. Immunol.* *64*, 31–37.
- Colvin, R.B., and Smith, R.N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 807–817.
- Conlon, T.M., Saeb-Parsy, K., Cole, J.L., Motallebzadeh, R., Qureshi, M.S., Rehakova, S., Negus, M.C., Callaghan, C.J., Bolton, E.M., Bradley, J.A., et al. (2012). Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 2643–2652.
- Correale, J., and Villa, A. (2008). Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *195*, 121–134.
- Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol.* *70*, 326–336.
- Corthay, A., Nandakumar, K.S., and Holmdahl, R. (2001). Evaluation of the percentage of peripheral T cells with two different T cell receptor alpha-chains and of their potential role in autoimmunity. *J. Autoimmun.* *16*, 423–429.
- Cose, S.C., Kelly, J.M., and Carbone, F.R. (1995). Characterization of diverse primary herpes simplex virus type 1 gB-specific cytotoxic T-cell response showing a preferential V beta bias. *J. Virol.* *69*, 5849–5852.
- Crawford, F., Kozono, H., White, J., Marrack, P., and Kappler, J. (1998). Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity* *8*, 675–682.
- Csorba, T.R., Lyon, A.W., and Hollenberg, M.D. (2010). Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* *47*, 51–71.
- Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* *30*, 626–635.
- Currier, J.R., and Robinson, M.A. (2001). Spectratype/immunoscope analysis of the expressed TCR repertoire. *Curr. Protoc. Immunol. Ed. John E Coligan Al Chapter 10*, Unit 10.28.
- D’Elios, M.M., Josien, R., Manghetti, M., Amedei, A., de Carli, M., Cuturi, M.C., Blanco, G., Buzelin, F., del Prete, G., and Soulillou, J.P. (1997). Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney Int.* *51*, 1876–1884.
- D’Orsogna, L.J., Nguyen, T.H.O., Claas, F.H.J., Witt, C., and Mifsud, N.A. (2013). Endogenous-peptide-dependent alloreactivity: new scientific insights and clinical implications. *Tissue Antigens* *81*, 399–407.
- Dai, H., Wan, N., Zhang, S., Moore, Y., Wan, F., and Dai, Z. (2010). Cutting edge: programmed death-1 defines CD8+CD122+ T cells as regulatory versus memory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 803–807.
- Dai, S., Huseby, E.S., Rubtsova, K., Scott-Browne, J., Crawford, F., Macdonald, W.A., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2008). Crossreactive T Cells spotlight the germline rules for alphabeta T cell-receptor interactions with MHC molecules. *Immunity* *28*, 324–334.
- Daniels, M.A., and Jameson, S.C. (2000). Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J. Exp. Med.* *191*, 335–346.

- Daniels, M.A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Holländer, G.A., Gascoigne, N.R.J., and Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* *444*, 724–729.
- Darrasse-Jèze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *206*, 1853–1862.
- DAUSSET, J. (1958). [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* *20*, 156–166.
- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 4022–4026.
- Davies, A., Kalb, S., Liang, B., Aldrich, C.J., Lemonnier, F.A., Jiang, H., Cotter, R., and Soloski, M.J. (2003). A peptide from heat shock protein 60 is the dominant peptide bound to Qa-1 in the absence of the MHC class Ia leader sequence peptide Qdm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 5027–5033.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* *334*, 395–402.
- Day, E.B., Guillonneau, C., Gras, S., Gruta, N.L.L., Vignali, D.A.A., Doherty, P.C., Purcell, A.W., Rossjohn, J., and Turner, S.J. (2011). Structural basis for enabling T-cell receptor diversity within biased virus-specific CD8+ T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 9536–9541.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1257–1265.
- DeBruyne, L.A., Magee, J.C., Buelow, R., and Bromberg, J.S. (2000). Gene transfer of immunomodulatory peptides correlates with heme oxygenase-1 induction and enhanced allograft survival. *Transplantation* *69*, 120–128.
- Degauque, N., Lair, D., Dupont, A., Moreau, A., Roussey, G., Moizant, F., Hubert, F.X., Louvet, C., Hill, M., Haspot, F., et al. (2006). Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 3915–3922.
- Degauque, N., Lair, D., Braudeau, C., Haspot, F., Sébille, F., Dupont, A., Merieau, E., Brouard, S., and Souillou, J.-P. (2007). Development of CD25- regulatory T cells following heart transplantation: evidence for transfer of long-term survival. *Eur. J. Immunol.* *37*, 147–156.
- Delfs, M.W., Furukawa, Y., Mitchell, R.N., and Lichtman, A.H. (2001). CD8+ T cell subsets TC1 and TC2 cause different histopathologic forms of murine cardiac allograft rejection. *Transplantation* *71*, 606–610.
- Van Denderen, B., Pêche, H., Gagne, K., Usal, C., Cuturi, M.C., and Souillou, J.P. (2001). Identification of immunodominant donor MHC peptides following rejection and donor strain transfusion-induced tolerance of heart allografts in adult rats. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1333–1339.
- Denning, T.L., Granger, S.W., Granger, S., Mucida, D., Graddy, R., Leclercq, G., Zhang, W., Honey, K., Rasmussen, J.P., Cheroutre, H., et al. (2007). Mouse TCRalpha+CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 4230–4239.
- Denton, A.E., Wesselingh, R., Gras, S., Guillonneau, C., Olson, M.R., Mintern, J.D., Zeng, W., Jackson, D.C., Rossjohn, J., Hodgkin, P.D., et al. (2011). Affinity thresholds for naive CD8+ CTL activation by peptides and engineered influenza A viruses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 5733–5744.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* *2*, 1032–1039.

- Desai, D.D., Harbers, S.O., Flores, M., Colonna, L., Downie, M.P., Bergtold, A., Jung, S., and Clynes, R. (2007). Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 6217–6226.
- Dijke, I.E., Weimar, W., and Baan, C.C. (2008). Regulatory T cells after organ transplantation: where does their action take place? *Hum. Immunol.* *69*, 389–398.
- Dilek, N., Vuillefroy de Silly, R., Blanche, G., and Vanhove, B. (2012). Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front. Immunol.* *3*, 208.
- Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., and Rothstein, D.M. (2011). Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 3645–3656.
- Dodd-o, J.M., Lendermon, E.A., Miller, H.L., Zhong, Q., John, E.R., Jungraithmayr, W.M., D'Alessio, F.R., and McDyer, J.F. (2011). CD154 Blockade Abrogates Allospecific Responses and Enhances CD4+ Regulatory T-Cells in Mouse Orthotopic Lung Transplant. *Am. J. Transplant.* *11*, 1815–1824.
- Domínguez, P.M., and Ardavin, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol. Rev.* *234*, 90–104.
- Du, J.-W., Gu, J.-Y., Liu, J., Cen, X.-N., Zhang, Y., Ou, Y., Chu, B., and Zhu, P. (2007). TCR spectratyping revealed T lymphocytes associated with graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma* *48*, 1618–1627.
- Duquesnoy, R.J. (2011). Antibody-reactive epitope determination with HLA Matchmaker and its clinical applications. *Tissue Antigens* *77*, 525–534.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 6037–6046.
- Eckels, D.D., Gorski, J., Rothbard, J., and Lamb, J.R. (1988). Peptide-mediated modulation of T-cell allorecognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *85*, 8191–8195.
- Edinger, M., and Hoffmann, P. (2011). Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 679–684.
- Ekeruche-Makinde, J., Miles, J.J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Cole, D.K., Dolton, G., Schauenburg, A.J.A., Tan, M.P., Pentier, J.M., Llewellyn-Lacey, S., et al. (2013). Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood* *121*, 1112–1123.
- Ely, L.K., Beddoe, T., Clements, C.S., Matthews, J.M., Purcell, A.W., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2006). Disparate thermodynamics governing T cell receptor-MHC-I interactions implicate extrinsic factors in guiding MHC restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6641–6646.
- Endharti, A.T., Rifa'i, M., Shi, Z., Fukuoka, Y., Nakahara, Y., Kawamoto, Y., Takeda, K., Isobe, K.-I., and Suzuki, H. (2005). Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 7093–7097.
- Endharti, A.T., Okuno, Y., Shi, Z., Misawa, N., Toyokuni, S., Ito, M., Isobe, K., and Suzuki, H. (2011). CD8+CD122+ regulatory T cells (Tregs) and CD4+ Tregs cooperatively prevent and cure CD4+ cell-induced colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 41–52.
- Erdmann, A.A., Jung, U., Foley, J.E., Toda, Y., and Fowler, D.H. (2004). Co-stimulated/Tc2 cells abrogate murine marrow graft rejection. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *10*, 604–613.

- Ettinger, R.A., Moustakas, A.K., and Lobaton, S.D. (2004). Open reading frame sequencing and structure-based alignment of polypeptides encoded by RT1-Bb, RT1-Ba, RT1-Db, and RT1-Da alleles. *Immunogenetics* 56, 585–596.
- Fábrega, E., López-Hoyos, M., San Segundo, D., Casafont, F., and Pons-Romero, F. (2009). Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 15, 629–633.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 1206–1212.
- Fanchiang, S.S., Cojocaru, R., Othman, M., Khanna, R., Brooks, M.J., Smith, T., Tang, X., Maricic, I., Swaroop, A., and Kumar, V. (2012). Global expression profiling of peripheral Qa-1-restricted CD8 $\alpha\alpha$ +TCR $\alpha\beta$ + regulatory T cells reveals innate-like features: implications for immune-regulatory repertoire. *Hum. Immunol.* 73, 214–222.
- Fangmann, J., Dalchau, R., Sawyer, G.J., Priestley, C.A., and Fabre, J.W. (1992). T cell recognition of donor major histocompatibility complex class I peptides during allograft rejection. *Eur. J. Immunol.* 22, 1525–1530.
- Farkash, E.A., and Colvin, R.B. (2012). Pathology: Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection. *Nat. Rev. Nephrol.* 8, 255–257.
- Feau, S., Garcia, Z., Arens, R., Yagita, H., Borst, J., and Schoenberger, S.P. (2012). The CD4⁺ T-cell help signal is transmitted from APC to CD8⁺ T-cells via CD27-CD70 interactions. *Nat. Commun.* 3, 948.
- Felix, N.J., Donermeyer, D.L., Horvath, S., Walters, J.J., Gross, M.L., Suri, A., and Allen, P.M. (2007). Alloreactive T cells respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes. *Nat. Immunol.* 8, 388–397.
- Feng, D., Bond, C.J., Ely, L.K., Maynard, J., and Garcia, K.C. (2007). Structural evidence for a germline-encoded T cell receptor-major histocompatibility complex interaction –eodon.”*Nat. Immunol.* 8, 975–983.
- Feng, G., Wood, K.J., and Bushell, A. (2008). Interferon-gamma conditioning ex vivo generates CD25+CD62L+Foxp3+ regulatory T cells that prevent allograft rejection: potential avenues for cellular therapy. *Transplantation* 86, 578–589.
- Ferrer, I.R., Wagener, M.E., Song, M., Kirk, A.D., Larsen, C.P., and Ford, M.L. (2011). Antigen-specific induced Foxp3+ regulatory T cells are generated following CD40/CD154 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20701–20706.
- Ferrer, I.R., Liu, D., Pinelli, D.F., Koehn, B.H., Stempora, L.L., and Ford, M.L. (2012). CD40/CD154 Blockade Inhibits Dendritic Cell Expression of Inflammatory Cytokines but Not Costimulatory Molecules. *J. Immunol.* 189, 4387–4395.
- Filatenkov, A.A., Jacovetty, E.L., Fischer, U.B., Curtsinger, J.M., Mescher, M.F., and Ingulli, E. (2005). CD4 T cell-dependent conditioning of dendritic cells to produce IL-12 results in CD8-mediated graft rejection and avoidance of tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6909–6917.
- Fillatreau, S., Gray, D., and Anderton, S.M. (2008). Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 391–397.
- Fleischhauer, K., Kernan, N.A., O’Reilly, R.J., Dupont, B., and Yang, S.Y. (1990). Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N. Engl. J. Med.* 323, 1818–1822.
- Fleming, B.D., and Mosser, D.M. (2011). Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur. J. Immunol.* 41, 2498–2502.

- Föhse, L., Suffner, J., Suhre, K., Wahl, B., Lindner, C., Lee, C.-W., Schmitz, S., Haas, J.D., Lamprecht, S., Koenecke, C., et al. (2011). High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 3101–3113.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *6*, 1142–1151.
- Fournié, G.J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D., Bernard, I., Subra, J.F., Pelletier, L., Druet, P., et al. (2001). Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunol. Rev.* *184*, 145–160.
- Fowell, D., and Mason, D. (1993). Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4⁺ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J. Exp. Med.* *177*, 627–636.
- Fowler, D.H., and Gress, R.E. (1998). CD8⁺ T cells of Tc2 phenotype mediate a GVL effect and prevent marrow rejection. *Vox Sang.* *74 Suppl 2*, 331–340.
- Foy, T.M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J.E., and Noelle, R.J. (1996). Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 591–617.
- Francis, R.S., Feng, G., Tha-In, T., Lyons, I.S., Wood, K.J., and Bushell, A. (2011). Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 726–738.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *206*, 3015–3029.
- Fu, F., Li, Y., Qian, S., Lu, L., Chambers, F., Starzl, T.E., Fung, J.J., and Thomson, A.W. (1996). Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II⁺, CD80dim, CD86⁻) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* *62*, 659–665.
- Fuleihan, R., Ramesh, N., Horner, A., Ahern, D., Belshaw, P.J., Alberg, D.G., Stamenkovic, I., Harmon, W., and Geha, R.S. (1994). Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* *93*, 1315–1320.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med.* *200*, 1039–1049.
- Gallo, V., Giardino, G., Capalbo, D., Palamaro, L., Romano, R., Santamaria, F., Maio, F., Salerno, M., Vajro, P., and Pignata, C. (2013). Alterations of the autoimmune regulator transcription factor and failure of central tolerance: APECED as a model. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *9*, 43–51.
- Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E., and Wiley, D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* *384*, 134–141.
- Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L., and Wilson, I.A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* *274*, 209–219.
- Garcia, K.C., Degano, M., Pease, L.R., Huang, M., Peterson, P.A., Teyton, L., and Wilson, I.A. (1998). Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* *279*, 1166–1172.

- Garrod, K.R., Liu, F.-C., Forrest, L.E., Parker, I., Kang, S.-M., and Cahalan, M.D. (2010). NK Cell Patrolling and Elimination of Donor-Derived Dendritic Cells Favor Indirect Alloreactivity. *J. Immunol.* *184*, 2329–2336.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., and Jenkins, M.K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* *281*, 96–99.
- Gauchat, J.F., Henchoz, S., Fattah, D., Mazzei, G., Aubry, J.P., Jomotte, T., Dash, L., Page, K., Solari, R., and Aldebert, D. (1995). CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* *25*, 863–865.
- Gavanescu, I., Kessler, B., Ploegh, H., Benoist, C., and Mathis, D. (2007). Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4583–4587.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723–737.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* *21*, 903–914.
- Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R., and Lieberhaber, S.A. (1972). Suppressor T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *108*, 586–590.
- Gilliet, M., and Liu, Y.-J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *195*, 695–704.
- Goldman, M., Le Moine, A., Braun, M., Flamand, V., and Abramowicz, D. (2001). A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends Immunol.* *22*, 247–251.
- Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* *402*, 255–262.
- Golshayan, D., Jiang, S., Tsang, J., Garin, M.I., Mottet, C., and Lechler, R.I. (2007). In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* *109*, 827–835.
- Golshayan, D., Wyss, J.-C., Abulker, C.W., Schaefer, S.C., Lechler, R.I., Lehr, H.-A., and Pascual, M. (2009). Transplantation tolerance induced by regulatory T cells: in vivo mechanisms and sites of action. *Int. Immunopharmacol.* *9*, 683–688.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 1783–1786.
- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., and Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nat. Immunol.* *11*, 681–688.
- Gotot, J., Gottschalk, C., Leopold, S., Knolle, P.A., Yagita, H., Kurts, C., and Ludwig-Portugall, I. (2012). Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 10468–10473.
- Gottschalk, R.A., Corse, E., and Allison, J.P. (2010). TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J. Exp. Med.* *207*, 1701–1711.
- Graca, L., Honey, K., Adams, E., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2000). Cutting Edge: Anti-CD154 Therapeutic Antibodies Induce Infectious Transplantation Tolerance. *J. Immunol.* *165*, 4783–4786.
- Graca, L., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2002a). Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J. Exp. Med.* *195*, 1641–1646.

- Graca, L., Thompson, S., Lin, C.-Y., Adams, E., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2002b). Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 5558–5565.
- Grammer, A.C., Bergman, M.C., Miura, Y., Fujita, K., Davis, L.S., and Lipsky, P.E. (1995). The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 4996–5010.
- Gras, S., Saulquin, X., Reiser, J.-B., Debeaupuis, E., Echasserieau, K., Kissenpfennig, A., Legoux, F., Chouquet, A., Le Gorrec, M., Machillot, P., et al. (2009). Structural bases for the affinity-driven selection of a public TCR against a dominant human cytomegalovirus epitope. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 430–437.
- Gras, S., Kjer-Nielsen, L., Chen, Z., Rossjohn, J., and McCluskey, J. (2011). The structural bases of direct T-cell allorecognition: implications for T-cell-mediated transplant rejection. *Immunol. Cell Biol.* *89*, 388–395.
- Gras, S., Burrows, S.R., Turner, S.J., Sewell, A.K., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2012). A structural voyage toward an understanding of the MHC-I-restricted immune response: lessons learned and much to be learned. *Immunol. Rev.* *250*, 61–81.
- Greenwald, R.J., Boussiotis, V.A., Liorbach, R.B., Abbas, A.K., and Sharpe, A.H. (2001). CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* *14*, 145–155.
- Griesemer, A.D., Sorenson, E.C., and Hardy, M.A. (2010). The role of the thymus in tolerance. *Transplantation* *90*, 465–474.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* *104*, 2840–2848.
- La Gruta, N.L., Thomas, P.G., Webb, A.I., Dunstone, M.A., Cukalac, T., Doherty, P.C., Purcell, A.W., Rossjohn, J., and Turner, S.J. (2008). Epitope-specific TCRbeta repertoire diversity imparts no functional advantage on the CD8+ T cell response to cognate viral peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 2034–2039.
- Guillonnet, C., Louvet, C., Renaudin, K., Heslan, J.-M., Heslan, M., Tesson, L., Vignes, C., Guillot, C., Choi, Y., Turka, L.A., et al. (2004). The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 1619–1629.
- Guillonnet, C., Aubry, V., Renaudin, K., Séveno, C., Usal, C., Tezuka, K., and Anegon, I. (2005). Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation* *80*, 546–554.
- Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffolleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007a). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* *117*, 1096–1106.
- Guillonnet, C., Séveno, C., Dugast, A.-S., Li, X.-L., Renaudin, K., Haspot, F., Usal, C., Veziere, J., Anegon, I., and Vanhove, B. (2007b). Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 8164–8171.
- Guillonnet, C., Picarda, E., and Anegon, I. (2010). CD8+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.*
- Guillot, C., Guillonnet, C., Mathieu, P., Gerdes, C.A., Ménoret, S., Braudeau, C., Tesson, L., Renaudin, K., Castro, M.G., Löwenstein, P.R., et al. (2002). Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 1600–1609.
- Guy, C.S., and Vignali, D.A.A. (2009). Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunol. Rev.* *232*, 7–21.

- Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2715–2729.
- Halverson, D.C., Schwartz, G.N., Carter, C., Gress, R.E., and Fowler, D.H. (1997). In vitro generation of allospecific human CD8⁺ T cells of Tc1 and Tc2 phenotype. *Blood* *90*, 2089–2096.
- Hamad, A.R., O'Herrin, S.M., Lebowitz, M.S., Srikrishnan, A., Bieler, J., Schneck, J., and Pardoll, D. (1998). Potent T cell activation with dimeric peptide-major histocompatibility complex class II ligand: the role of CD4 coreceptor. *J. Exp. Med.* *188*, 1633–1640.
- Hamano, K., Rawsthorne, M.A., Bushell, A.R., Morris, P.J., and Wood, K.J. (1996). Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor microchimerism is essential for maintenance of tolerance to alloantigen in vivo in anti-CD4 treated recipients. *Transplantation* *62*, 856–860.
- Han, G., Shao, H., Peng, Y., Zhang, P., Ke, Y., Kaplan, H.J., and Sun, D. (2007). Suppressor role of rat CD8⁺CD45RClow T cells in experimental autoimmune uveitis (EAU). *J. Neuroimmunol.* *183*, 81–88.
- Hancock, W.W., Sayegh, M.H., Zheng, X.G., Peach, R., Linsley, P.S., and Turka, L.A. (1996). Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13967–13972.
- Hara, M., Kingsley, C.I., Niimi, M., Read, S., Turvey, S.E., Bushell, A.R., Morris, P.J., Powrie, F., and Wood, K.J. (2001). IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 3789–3796.
- Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N.H., Carlson, M.R., Li, S.-H., Simpson, P.M., Chatila, T.A., and Williams, C.B. (2009). A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 3461–3468.
- Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.-H., Relland, L.M., et al. (2011). A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* *35*, 109–122.
- Haririan, A., Kiangkitiwan, B., Kukuruga, D., Cooper, M., Hurley, H., Drachenberg, C., and Klassen, D. (2009). The impact of c4d pattern and donor-specific antibody on graft survival in recipients requiring indication renal allograft biopsy. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *9*, 2758–2767.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* *6*, 1123–1132.
- Hashimoto, D., Chow, A., Greter, M., Saenger, Y., Kwan, W.-H., Leboeuf, M., Ginhoux, F., Ochando, J.C., Kunisaki, Y., van Rooijen, N., et al. (2011). Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Exp. Med.* *208*, 1069–1082.
- He, C., and Heeger, P.S. (2004). CD8 T cells can reject major histocompatibility complex class I-deficient skin allografts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *4*, 698–704.
- Heath, W.R., Carbone, F.R., Bertolino, P., Kelly, J., Cose, S., and Miller, J.F. (1995). Expression of two T cell receptor alpha chains on the surface of normal murine T cells. *Eur. J. Immunol.* *25*, 1617–1623.
- Heemskerk, M.B.A., Roelen, D.L., Dankers, M.K.A., van Rood, J.J., Claas, F.H.J., Doxiadis, I.I.N., and Oudshoorn, M. (2005). Allogeneic MHC class I molecules with numerous sequence differences do not elicit a CTL response. *Hum. Immunol.* *66*, 969–976.
- Heemskerk, M.B.A., Cornelissen, J.J., Roelen, D.L., van Rood, J.J., Claas, F.H.J., Doxiadis, I.I.N., and Oudshoorn, M. (2007). Highly diverged MHC class I mismatches are acceptable for haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* *40*, 193–200.
- Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M., and Merad, M. (2010). Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol. Rev.* *234*, 55–75.

- Hermiston, M.L., Xu, Z., and Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 107–137.
- Herrera, O.B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M.J., Marelli-Berg, F.M., and Lechler, R.I. (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 4828–4837.
- Hester, J., Schiopu, A., Nadig, S.N., and Wood, K.J. (2012). Low-dose rapamycin treatment increases the ability of human regulatory T cells to inhibit transplant arteriosclerosis in vivo. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 2008–2016.
- Hidalgo, L.G., Sis, B., Sellares, J., Campbell, P.M., Mengel, M., Einecke, G., Chang, J., and Halloran, P.F. (2010). NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *10*, 1812–1822.
- Hiemstra, H.S., van Veelen, P.A., Willemsen, S.J., Benckhuijsen, W.E., Geluk, A., de Vries, R.R., Roep, B.O., and Drijfhout, J.W. (1999). Quantitative determination of TCR cross-reactivity using peptide libraries and protein databases. *Eur. J. Immunol.* *29*, 2385–2391.
- Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J., and Marrack, P. (2002). Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* *16*, 759–767.
- Hill, M., Thebault, P., Segovia, M., Louvet, C., Bériou, G., Tilly, G., Merieau, E., Anegon, I., Chiffolleau, E., and Cuturi, M.-C. (2011). Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *11*, 2036–2045.
- Hinterberger, M., Aichinger, M., Prazeres da Costa, O., Voehringer, D., Hoffmann, R., and Klein, L. (2010). Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat. Immunol.* *11*, 512–519.
- Hirohashi, T., Chase, C.M., Della Pelle, P., Sebastian, D., Alessandrini, A., Madsen, J.C., Russell, P.S., and Colvin, R.B. (2012). A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 313–321.
- Ho, J., Kurtz, C.C., Naganuma, M., Ernst, P.B., Cominelli, F., and Rivera-Nieves, J. (2008). A CD8+/CD103high T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 2573–2580.
- Hogquist, K.A., and Bevan, M.J. (1996). The nature of the peptide/MHC ligand involved in positive selection. *Semin. Immunol.* *8*, 63–68.
- Hollenbaugh, D., Mischel-Petty, N., Edwards, C.P., Simon, J.C., Denfeld, R.W., Kiener, P.A., and Aruffo, A. (1995). Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* *182*, 33–40.
- Honey, K., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (1999). CD40 Ligand Blockade Induces CD4+ T Cell Tolerance and Linked Suppression. *J. Immunol.* *163*, 4805–4810.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* *299*, 1057–1061.
- Hornick, P.I., Mason, P.D., Yacoub, M.H., Rose, M.L., Batchelor, R., and Lechler, R.I. (1998). Assessment of the Contribution That Direct Allorecognition Makes to the Progression of Chronic Cardiac Transplant Rejection in Humans. *Circulation* *97*, 1257–1263.
- Hornick, P.I., Mason, P.D., Baker, R.J., Hernandez-Fuentes, M., Frasca, L., Lombardi, G., Taylor, K., Weng, L., Rose, M.L., Yacoub, M.H., et al. (2000). Significant Frequencies of T Cells With Indirect Anti-Donor Specificity in Heart Graft Recipients With Chronic Rejection. *Circulation* *101*, 2405–2410.

- Housset, D., and Malissen, B. (2003). What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity? *Trends Immunol.* *24*, 429–437.
- Hoves, S., Krause, S.W., Schütz, C., Halbritter, D., Schölmerich, J., Herfarth, H., and Fleck, M. (2006). Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 2691–2698.
- Hsieh, C.-S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* *21*, 267–277.
- Hsieh, C.-S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* *7*, 401–410.
- Hsieh, C.-S., Lee, H.-M., and Lio, C.-W.J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 157–167.
- Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* *21*, 503–513.
- Huang, X., Moore, D.J., Mohiuddin, M., Lian, M.-M., Kim, J.I., Sonawane, S., Wang, J., Gu, Y., Yeh, H., Markmann, J.F., et al. (2008). Inhibition of ICAM-1/LFA-1 interactions prevents B-cell-dependent anti-CD45RB-induced transplantation tolerance. *Transplantation* *85*, 675–680.
- Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hünig, T., Mittrücker, H.-W., Brüstle, A., Kamradt, T., et al. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1716–1725.
- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Jr, Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., et al. (2011). Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* *34*, 554–565.
- Hubert, F.-X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, M., and Josien, R. (2004). Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 7485–7494.
- Hume, D.M., Merrill, J.P., Miller, B.F., and Thorn, G.W. (1955). EXPERIENCES WITH RENAL HOMOTRANSPLANTATION IN THE HUMAN: REPORT OF NINE CASES I. *J. Clin. Invest.* *34*, 327–382.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *Embo J.* *30*, 3481–3500.
- Hutchinson, J.A., Riquelme, P., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Miqueu, P., Zuhayra, M., Oberg, H.H., Pascher, A., Lützen, U., Janssen, U., et al. (2011a). Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 2072–2078.
- Hutchinson, J.A., Riquelme, P., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Miqueu, P., Zuhayra, M., Oberg, H.H., Pascher, A., Lützen, U., Janssen, U., et al. (2011b). Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 2072–2078.
- Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Del Papa, B., Zei, T., Ostini, R.I., Cecchini, D., et al. (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* *117*, 3921–3928.
- Illigens, B.M., Yamada, A., Anosova, N., Dong, V.M., Sayegh, M.H., and Benichou, G. (2009). Dual effects of the alloresponse by Th1 and Th2 cells on acute and chronic rejection of allotransplants. *Eur. J. Immunol.* *39*, 3000–3009.

- Inwald, D.P., McDowall, A., Peters, M.J., Callard, R.E., and Klein, N.J. (2003). CD40 Is Constitutively Expressed on Platelets and Provides a Novel Mechanism for Platelet Activation. *Circ. Res.* *92*, 1041–1048.
- Issa, F., and Wood, K.J. (2012). Translating tolerogenic therapies to the clinic - where do we stand? *Front. Immunol.* *3*, 254.
- Issa, F., Hester, J., Goto, R., Nadig, S.N., Goodacre, T.E., and Wood, K. (2010). Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation* *90*, 1321–1327.
- Ito, A., Shimura, H., Nitahara, A., Tomiyama, K., Ito, M., Kanekura, T., Okumura, K., Yagita, H., and Kawai, K. (2008). NK cells contribute to the skin graft rejection promoted by CD4+ T cells activated through the indirect allorecognition pathway. *Int. Immunol.* *20*, 1343–1349.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.-H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* *204*, 105–115.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 5317–5326.
- Iwakoshi, N.N., Mordes, J.P., Markees, T.G., Phillips, N.E., Rossini, A.A., and Greiner, D.L. (2000). Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 512–521.
- Iyer, S., Woo, J., Cornejo, M.C., Gao, L., McCoubrey, W., Maines, M., and Buelow, R. (1998). Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84(E → V) binding protein. Isolation of heme oxygenase-1. *J. Biol. Chem.* *273*, 2692–2697.
- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* *165*, 302–319.
- Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J.A., Connolly, J., Banchereau, J., and Mellman, I. (2007). Disruption of E-Cadherin-Mediated Adhesion Induces a Functionally Distinct Pathway of Dendritic Cell Maturation. *Immunity* *27*, 610–624.
- Jiang, H., Ware, R., Stall, A., Flaherty, L., Chess, L., and Pernis, B. (1995). Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity* *2*, 185–194.
- Jiang, H., Kashleva, H., Xu, L.X., Forman, J., Flaherty, L., Pernis, B., Braunstein, N.S., and Chess, L. (1998a). T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 4533–4537.
- Jiang, H., Canfield, S.M., Gallagher, M.P., Jiang, H.H., Jiang, Y., Zheng, Z., and Chess, L. (2010). HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.* *120*, 3641–3650.
- Jiang, S., Tugulea, S., Pennesi, G., Liu, Z., Mulder, A., Lederman, S., Harris, P., Cortesini, R., and Suciu-Foca, N. (1998b). Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum. Immunol.* *59*, 690–699.
- Jiang, S., Tsang, J., Game, D.S., Stevenson, S., Lombardi, G., and Lechler, R.I. (2006). Generation and expansion of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation* *82*, 1738–1743.

- Joffre, O., Santolaria, T., Calise, D., Al Saati, T., Hudrisier, D., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2008). Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* *14*, 88–92.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 557–569.
- Jones, N.D., Maurik, A.V., Hara, M., Spriewald, B.M., Witzke, O., Morris, P.J., and Wood, K.J. (2000). CD40-CD40 Ligand-Independent Activation of CD8+ T Cells Can Trigger Allograft Rejection. *J. Immunol.* *165*, 1111–1118.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A.H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* *192*, 1213–1222.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* *193*, 1285–1294.
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Hohenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* *2*, 301–306.
- Josefowicz, S.Z., and Rudensky, A. (2009). Control of Regulatory T Cell Lineage Commitment and Maintenance. *Immunity* *30*, 616–625.
- Josien, R., Pannetier, C., Douillard, P., Cantarovich, D., Menoret, S., Bugeon, L., Kourilsky, P., Soulillou, J.P., and Cuturi, M.C. (1995). Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats. *Transplantation* *60*, 1131–1139.
- Josien, R., Heslan, M., Brouard, S., Soulillou, J.P., and Cuturi, M.C. (1998). Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* *92*, 4539–4544.
- Ju, S.T., Cui, H., Panka, D.J., Ettinger, R., and Marshak-Rothstein, A. (1994). Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4185–4189.
- Kang, H.-K., Liu, M., and Datta, S.K. (2007). Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 7849–7858.
- Karczewski, J., Karczewski, M., and Wiktorowicz, K. (2010). Possible defect of T suppressor cell subpopulation in patients with kidney acute rejection. *Transplant. Proc.* *42*, 4538–4539.
- Karim, M., Feng, G., Wood, K.J., and Bushell, A.R. (2005). CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood* *105*, 4871–4877.
- Kawai, T., Cosimi, A.B., Colvin, R.B., Powelson, J., Eason, J., Kozłowski, T., Sykes, M., Monroy, R., Tanaka, M., and Sachs, D.H. (1995). Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* *59*, 256–262.
- Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R.B., Sachs, D.H., and Cosimi, A.B. (2000). Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat. Med.* *6*, 114–114.
- Kawai, T., Cosimi, A.B., Spitzer, T.R., Tolkoff-Rubin, N., Suthanthiran, M., Saidman, S.L., Shaffer, J., Preffer, F.I., Ding, R., Sharma, V., et al. (2008). HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N. Engl. J. Med.* *358*, 353–361.

- Kedzierska, K., La Gruta, N.L., Stambas, J., Turner, S.J., and Doherty, P.C. (2008). Tracking phenotypically and functionally distinct T cell subsets via T cell repertoire diversity. *Mol. Immunol.* *45*, 607–618.
- Kenyon, N.S., Fernandez, L.A., Lehmann, R., Masetti, M., Ranuncoli, A., Chatzipetrou, M., Iaria, G., Han, D., Wagner, J.L., Ruiz, P., et al. (1999a). Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD154. *Diabetes* *48*, 1473–1481.
- Kenyon, N.S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J.L., Kirk, A.D., Harlan, D.M., Burkly, L.C., and Ricordi, C. (1999b). Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 8132–8137.
- Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R., and Wood, K.J. (2002). CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 1080–1086.
- Kirk, A.D., Harlan, D.M., Armstrong, N.N., Davis, T.A., Dong, Y., Gray, G.S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J.H., Jr, and Knechtle, S.J. (1997). CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 8789–8794.
- Kirk, A.D., Burkly, L.C., Batty, D.S., Baumgartner, R.E., Berning, J.D., Buchanan, K., Fechner, J.H., Germond, R.L., Kampen, R.L., Patterson, N.B., et al. (1999). Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat. Med.* *5*, 686–693.
- Kisielewicz, A., Schaier, M., Schmitt, E., Hug, F., Haensch, G.M., Meuer, S., Zeier, M., Sohn, C., and Steinborn, A. (2010). A distinct subset of HLA-DR+ regulatory T cells is involved in the induction of preterm labor during pregnancy and in the induction of organ rejection after transplantation. *Clin. Immunol.* *137*, 209–220.
- Knoechel, B., Lohr, J., Zhu, S., Wong, L., Hu, D., Ausubel, L., and Abbas, A.K. (2006). Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 6473–6483.
- Koch, S.D., Uss, E., van Lier, R.A.W., and ten Berge, I.J.M. (2008). Alloantigen-induced regulatory CD8+CD103+ T cells. *Hum. Immunol.* *69*, 737–744.
- König, R., Shen, X., and Germain, R.N. (1995). Involvement of both major histocompatibility complex class II alpha and beta chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerization in T cell activation. *J. Exp. Med.* *182*, 779–787.
- Koopmann, J.O., Post, M., Neefjes, J.J., Hämmerling, G.J., and Momburg, F. (1996). Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* *26*, 1720–1728.
- Kooten, C. van, and Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* *67*, 2–17.
- Van Kooten, C., and Banchereau, J. (1997). Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 330–337.
- Korecka-Polak, A., Duszota, A., Wierzbicki, P., Niemczyk, M., Bocian, K., Kłosowska, D., Paczek, L., Górski, A., and Korczak-Kowalska, G. (2011). Human peripheral blood CD8+ CD28- T cells of renal allograft recipients do not express FOXP3 protein. *Transplant. Proc.* *43*, 2917–2921.
- Koyama, I., Kawai, T., Andrews, D., Boskovic, S., Nadazdin, O., Wee, S.L., Sogawa, H., Wu, D.-L., Smith, R.N., Colvin, R.B., et al. (2004). Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in nonhuman primates. *Transplantation* *77*, 460–462.
- Kreisel, D., Krupnick, A.S., Gelman, A.E., Engels, F.H., Popma, S.H., Krasinskas, A.M., Balsara, K.R., Szeto, W.Y., Turka, L.A., and Rosengard, B.R. (2002). Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: An alternative mechanism of allorecognition. *Nat. Med.* *8*, 233–239.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* *6*, 1219–1227.

- Kuhns, M.S., and Badgandi, H.B. (2012). Piecing together the family portrait of TCR-CD3 complexes. *Immunol. Rev.* 250, 120–143.
- Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., et al. (2005). Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 1862–1870.
- Kwan, J., and Killeen, N. (2004). CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 3999–4007.
- Lai, H.-Y., Chou, T.-Y., Tzeng, C.-H., and Lee, O.K.-S. (2012). Cytokine profiles in various graft-versus-host disease target organs following hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Transplant.* 21, 2033–2045.
- Land, W.G. (2005). Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transplant. Saudi Arab.* 16, 520–539.
- Land, W.G. (2012a). Emerging role of innate immunity in organ transplantation: part I: evolution of innate immunity and oxidative allograft injury. *Transplant. Rev. Orlando Fla* 26, 60–72.
- Land, W.G. (2012b). Emerging role of innate immunity in organ transplantation part II: potential of damage-associated molecular patterns to generate immunostimulatory dendritic cells. *Transplant. Rev. Orlando Fla* 26, 73–87.
- Larsen, C.P., Austyn, J.M., and Morris, P.J. (1990). The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized organ allografts. Recent findings on the migration and function of dendritic leukocytes after transplantation. *Ann. Surg.* 212, 308–315; discussion 316–317.
- Larsen, C.P., Alexander, D.Z., Hollenbaugh, D., Elwood, E.T., Ritchie, S.C., Aruffo, A., Hendrix, R., and Pearson, T.C. (1996a). CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* 61, 4–9.
- Larsen, C.P., Elwood, E.T., Alexander, D.Z., Ritchie, S.C., Hendrix, R., Tucker-Burden, C., Cho, H.R., Aruffo, A., Hollenbaugh, D., Linsley, P.S., et al. (1996b). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381, 434–438.
- Lathrop, S.K., Santacruz, N.A., Pham, D., Luo, J., and Hsieh, C.-S. (2008). Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. *J. Exp. Med.* 205, 3105–3117.
- Laugel, B., van den Berg, H.A., Gostick, E., Cole, D.K., Wooldridge, L., Boulter, J., Milicic, A., Price, D.A., and Sewell, A.K. (2007). Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties. *J. Biol. Chem.* 282, 23799–23810.
- Leavenworth, J.W., Tang, X., Kim, H.-J., Wang, X., and Cantor, H. (2013). Amelioration of arthritis through mobilization of peptide-specific CD8⁺ regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 123, 1382–1389.
- Lechler, R.I., Heaton, T., Barber, L., Bal, V., Batchelor, J.R., and Lombardi, G. (1992). Molecular mimicry by major histocompatibility complex molecules and peptides accounts for some alloresponses. *Immunol. Lett.* 34, 63–69.
- Lee, H.M., and Hsieh, C.-S. (2009). Rare development of Foxp3⁺ thymocytes in the CD4⁺CD8⁺ subset. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 2261–2266.
- Lee, H.-M., Bautista, J.L., Scott-Browne, J., Mohan, J.F., and Hsieh, C.-S. (2012). A broad range of self-reactivity drives thymic regulatory T cell selection to limit responses to self. *Immunity* 37, 475–486.
- Lee, R.S., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., Winn, H.J., and Auchincloss, H. (1994). Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 179, 865–872.

- Lee, Y.-H., Ishida, Y., Rifa'i, M., Shi, Z., Isobe, K., and Suzuki, H. (2008). Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 825–832.
- Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Bodmer, J., Müller, W., Bontrop, R., Lemaître, M., Malik, A., Barbié, V., and Chaume, D. (1999). IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* *27*, 209–212.
- Lemaître, P.H., Vokaer, B., Charbonnier, L.-M., Iwakura, Y., Estenne, M., Goldman, M., Leo, O., Rimmelin, M., and Le Moine, A. (2013a). IL-17A Mediates Early Post-Transplant Lesions after Heterotopic Trachea Allotransplantation in Mice. *Plos One* *8*, e70236.
- Lemaître, P.H., Vokaer, B., Charbonnier, L.-M., Iwakura, Y., Field, K.A., Estenne, M., Goldman, M., Leo, O., Rimmelin, M., and Le Moine, A. (2013b). Cyclosporine A drives a Th17- and Th2-mediated posttransplant obliterative airway disease. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *13*, 611–620.
- Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* *353*, 858–861.
- León, B., López-Bravo, M., and Ardaín, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* *26*, 519–531.
- Lerret, N.M., Houlihan, J.L., Kheradmand, T., Pothoven, K.L., Zhang, Z.J., and Luo, X. (2012). Donor-specific CD8+ Foxp3+ T cells protect skin allografts and facilitate induction of conventional CD4+ Foxp3+ regulatory T cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 2335–2347.
- Levings, M.K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., and Roncarolo, M.G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* *105*, 1162–1169.
- Li, F., Atz, M.E., and Reed, E.F. (2009a). Human leukocyte antigen antibodies in chronic transplant vasculopathy—mechanisms and pathways. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 557–562.
- Li, J., Simeoni, E., Fleury, S., Dudler, J., Fiorini, E., Kappenberger, L., von Segesser, L.K., and Vassalli, G. (2006). Gene transfer of soluble interleukin-17 receptor prolongs cardiac allograft survival in a rat model. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* *29*, 779–783.
- Li, X.C., Li, Y., Dodge, I., Wells, A.D., Zheng, X.X., Turka, L.A., and Strom, T.B. (1999a). Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 2500–2507.
- Li, X.C., Rothstein, D.M., and Sayegh, M.H. (2009b). Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. *Immunol. Rev.* *229*, 271–293.
- Li, X.L., Ménoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. (2010). Mechanism and Localization of CD8 Regulatory T Cells in a Heart Transplant Model of Tolerance. *J. Immunol.* *185*, 823–833.
- Li, Y., Li, X.C., Zheng, X.X., Wells, A.D., Turka, L.A., and Strom, T.B. (1999b). Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat. Med.* *5*, 1298–1302.
- Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., Yonekawa, Y., Masuda, K., Ito, A., Ueda, M., Mori, T., Kawamoto, H., Tanaka, Y., et al. (2004). Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *4*, 2118–2125.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 5916–5926.

- Lim, A., Baron, V., Ferradini, L., Bonneville, M., Kourilsky, P., and Pannetier, C. (2002). Combination of MHC-peptide multimer-based T cell sorting with the Immunoscope permits sensitive ex vivo quantitation and follow-up of human CD8⁺ T cell immune responses. *J. Immunol. Methods* *261*, 177–194.
- Lindahl, K.F., and Wilson, D.B. (1977). Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *J. Exp. Med.* *145*, 508–522.
- Liston, A., Nutsch, K.M., Farr, A.G., Lund, J.M., Rasmussen, J.P., Koni, P.A., and Rudensky, A.Y. (2008). Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11903–11908.
- Liu, Y.-J. (2006). A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol.* *27*, 215–221.
- Liu, G., Duan, K., Ma, H., Niu, Z., Peng, J., and Zhao, Y. (2011). An instructive role of donor macrophages in mixed chimeras in the induction of recipient CD4⁽⁺⁾Foxp3⁽⁺⁾ Treg cells. *Immunol. Cell Biol.* *89*, 827–835.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1701–1711.
- Liu, X., Nguyen, P., Liu, W., Cheng, C., Steeves, M., Obenaus, J.C., Ma, J., and Geiger, T.L. (2009). T cell receptor CDR3 sequence but not recognition characteristics distinguish autoreactive effector and Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cells. *Immunity* *31*, 909–920.
- Liu, Y., Chen, N., Chen, G., and You, P. (2007). The protective effect of CD8⁺CD28⁻ T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation. *Transplant. Proc.* *39*, 3396–3403.
- Liu, Y., Lan, Q., Lu, L., Chen, M., Wang, J., Fan, H., Shen, Y., Ryffel, B., Brand, D., Quismorio, F., et al. (2013a). Phenotypic and functional characteristic of a newly identified CD8⁺Foxp3⁻CD103⁺ regulatory T cells. *J. Mol. Cell Biol.*
- Liu, Y.C., Miles, J.J., Neller, M.A., Gostick, E., Price, D.A., Purcell, A.W., McCluskey, J., Burrows, S.R., Rossjohn, J., and Gras, S. (2013b). Highly divergent T-cell receptor binding modes underlie specific recognition of a bulged viral peptide bound to a human leukocyte antigen class I molecule. *J. Biol. Chem.* *288*, 15442–15454.
- Liu, Z., Colovai, A.I., Tugulea, S., Reed, E.F., Fisher, P.E., Mancini, D., Rose, E.A., Cortesini, R., Michler, R.E., and Suciu-Foca, N. (1996). Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J. Clin. Invest.* *98*, 1150–1157.
- Liu, Z., Tugulea, S., Cortesini, R., and Suciu-Foca, N. (1998). Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8⁺CD28⁻ T cells. *Int. Immunol.* *10*, 775–783.
- Liu, Z., Fan, H., and Jiang, S. (2013c). CD4⁺ T-cell subsets in transplantation. *Immunol. Rev.* *252*, 183–191.
- Lodhi, S.A., Lamb, K.E., and Meier-Kriesche, H.U. (2011). Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *11*, 1226–1235.
- Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, J.R., and Lechler, R.I. (1989). Allorecognition of DR1 by T cells from a DR4/DRw13 responder mimics self-restricted recognition of endogenous peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 4190–4194.
- Lombardi, G., Barber, L., Sidhu, S., Batchelor, J.R., and Lechler, R.I. (1991). The specificity of alloreactive T cells is determined by MHC polymorphisms which contact the T cell receptor and which influence peptide binding. *Int. Immunol.* *3*, 769–775.
- Lowe, M., Badell, I.R., Thompson, P., Martin, B., Leopardi, F., Strobert, E., Price, A.A., Abdulkerim, H.S., Wang, R., Iwakoshi, N.N., et al. (2012). A novel monoclonal antibody to CD40 prolongs islet allograft survival. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 2079–2087.

- Lu, L., and Cantor, H. (2008). Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol.* *5*, 401–406.
- Lu, L., McCaslin, D., Starzl, T.E., and Thomson, A.W. (1995). Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* *60*, 1539–1545.
- Lu, L., Kim, H.-J., Werneck, M.B.F., and Cantor, H. (2008). Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19420–19425.
- Lu, L., Yu, Y., Li, G., Pu, L., Zhang, F., Zheng, S., and Wang, X. (2009). CD8(+)CD103(+) regulatory T cells in spontaneous tolerance of liver allografts. *Int. Immunopharmacol.* *9*, 546–548.
- Ludewig, B., Henn, V., Schröder, J.M., Graf, D., and Kroczeck, R.A. (1996). Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *26*, 3137–3143.
- Lutz, M.B. (2012). Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Front. Immunol.* *3*, 123.
- Lutz, M.B., Suri, R.M., Niimi, M., Ogilvie, A.L., Kukutsch, N.A., Rössner, S., Schuler, G., and Austyn, J.M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1813–1822.
- Macdonald, W.A., Chen, Z., Gras, S., Archbold, J.K., Tynan, F.E., Clements, C.S., Bharadwaj, M., Kjer-Nielsen, L., Saunders, P.M., Wilce, M.C.J., et al. (2009). T cell allorecognition via molecular mimicry. *Immunity* *31*, 897–908.
- Mach, F., Schönbeck, U., Sukhova, G.K., Bourcier, T., Bonnefoy, J.Y., Pober, J.S., and Libby, P. (1997). Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1931–1936.
- Madden, D.R., Garboczi, D.N., and Wiley, D.C. (1993). The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* *75*, 693–708.
- Maganto-García, E., Bu, D.-X., Tarrío, M.L., Alcaide, P., Newton, G., Griffin, G.K., Croce, K.J., Luscinskas, F.W., Lichtman, A.H., and Grabie, N. (2011). Foxp3+-inducible regulatory T cells suppress endothelial activation and leukocyte recruitment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 3521–3529.
- Magnani, C.F., Alberigo, G., Bacchetta, R., Serafini, G., Andreani, M., Roncarolo, M.G., and Gregori, S. (2011). Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1652–1662.
- Maldonado, R.A., and von Andrian, U.H. (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.* *108*, 111–165.
- Malherbe, L., Hausl, C., Teyton, L., and McHeyzer-Williams, M.G. (2004). Clonal selection of helper T cells is determined by an affinity threshold with no further skewing of TCR binding properties. *Immunity* *21*, 669–679.
- Manavalan, J.S., Rossi, P.C., Vlad, G., Piazza, F., Yarilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., and Suci-Foca, N. (2003). High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl. Immunol.* *11*, 245–258.
- Manavalan, J.S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A.J., Vlad, G., Colombo, P.C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2004). Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int. Immunol.* *16*, 1055–1068.

- Manicassamy, S., and Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol. Rev.* *241*, 206–227.
- Mannon, R.B. (2012). Macrophages: contributors to allograft dysfunction, repair, or innocent bystanders? *Curr. Opin. Organ Transplant.* *17*, 20–25.
- Mariuzza, R.A. (2013). Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. *Front. T Cell Biol.* *4*, 206.
- Marrack, P., Scott-Browne, J.P., Dai, S., Gapin, L., and Kappler, J.W. (2008). Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 171–203.
- Martínez-Llordella, M., Puig-Pey, I., Orlando, G., Ramoni, M., Tisone, G., Rimola, A., Lerut, J., Latinne, D., Margarit, C., Bilbao, I., et al. (2007). Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *7*, 309–319.
- Martín-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbí, A.L., and Toribio, M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood*.
- Mason, D. (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today* *19*, 395–404.
- Masunaga, T., Yamashita, K., Sakihama, H., Hashimoto, T., Hua, N., Imai, A., Inobe, M., Miyazaki, T., Todo, S., and Uede, T. (2005). Dimeric but not monomeric soluble CD40 prolongs allograft survival and generates regulatory T cells that inhibit CTL function. *Transplantation* *80*, 1614–1622.
- Matzinger, P., and Bevan, M.J. (1977). Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell. Immunol.* *29*, 1–5.
- Maupin-Furlow, J. (2012). Proteasomes and protein conjugation across domains of life. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 100–111.
- Mauri, C., and Blair, P.A. (2010). Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat. Rev. Rheumatol.* *6*, 636–643.
- Maurik, A. van, Herber, M., Wood, K.J., and Jones, N.D. (2002). Cutting Edge: CD4+CD25+ Alloantigen-Specific Immunoregulatory Cells That Can Prevent CD8+ T Cell-Mediated Graft Rejection: Implications for Anti-CD154 Immunotherapy. *J. Immunol.* *169*, 5401–5404.
- McMurchy, A.N., Bushell, A., Levings, M.K., and Wood, K.J. (2011). Moving to tolerance: Clinical application of T regulatory cells. *Semin. Immunol.* *23*, 304–313.
- Meier-Kriesche, H.-U., Schold, J.D., and Kaplan, B. (2004). Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *4*, 1289–1295.
- Meijers, R., Lai, C.-C., Yang, Y., Liu, J., Zhong, W., Wang, J., and Reinherz, E.L. (2005). Crystal Structures of Murine MHC Class I H-2 Db and Kb Molecules in Complex with CTL Epitopes from Influenza A Virus: Implications for TCR Repertoire Selection and Immunodominance. *J. Mol. Biol.* *345*, 1099–1110.
- Mellor, A.L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P.A., Iwashima, M., and Munn, D.H. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 1652–1655.
- Mellor, A.L., Chandler, P., Baban, B., Hansen, A.M., Marshall, B., Pihkala, J., Waldmann, H., Cobbold, S., Adams, E., and Munn, D.H. (2004). Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int. Immunol.* *16*, 1391–1401.

- Mempel, T.R., Pittet, M.J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H., and von Andrian, U.H. (2006). Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 25, 129–141.
- Ménager-Marcq, I., Pomié, C., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2006). CD8+CD28- regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 131, 1775–1785.
- Mendiratta, S.K., Kovalik, J.P., Hong, S., Singh, N., Martin, W.D., and Van Kaer, L. (1999). Peptide dependency of alloreactive CD4+ T cell responses. *Int. Immunol.* 11, 351–360.
- Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 935–947.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.
- MERRILL, J.P., MURRAY, J.E., HARRISON, J.H., and GUILD, W.R. (1956). Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J. Am. Med. Assoc.* 160, 277–282.
- Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., and Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16, 417–428.
- MICHON, L., HAMBURGER, J., OECONOMOS, N., DELINOTTE, P., RICHET, G., VAYSSE, J., and ANTOINE, B. (1953). [An attempted kidney transplantation in man: medical and biological aspects]. *Presse Médicale* 61, 1419–1423.
- Miles, J.J., Elhassen, D., Borg, N.A., Silins, S.L., Tynan, F.E., Burrows, J.M., Purcell, A.W., Kjer-Nielsen, L., Rossjohn, J., Burrows, S.R., et al. (2005). CTL recognition of a bulged viral peptide involves biased TCR selection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 3826–3834.
- Miles, J.J., Borg, N.A., Brennan, R.M., Tynan, F.E., Kjer-Nielsen, L., Silins, S.L., Bell, M.J., Burrows, J.M., McCluskey, J., Rossjohn, J., et al. (2006). TCR alpha genes direct MHC restriction in the potent human T cell response to a class I-bound viral epitope. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 6804–6814.
- Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jovic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. (2012). Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13, 888–899.
- Miqueu, P., Guillet, M., Degauque, N., Doré, J.-C., Soulillou, J.-P., and Brouard, S. (2007). Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases. *Mol. Immunol.* 44, 1057–1064.
- Miqueu, P., Degauque, N., Guillet, M., Giral, M., Ruiz, C., Pallier, A., Braudeau, C., Roussey-Kesler, G., Ashton-Chess, J., Doré, J.-C., et al. (2010). Analysis of the peripheral T-cell repertoire in kidney transplant patients. *Eur. J. Immunol.* 40, 3280–3290.
- Monk, N.J., Hargreaves, R.E.G., Marsh, J.E., Farrar, C.A., Sacks, S.H., Millrain, M., Simpson, E., Dyson, J., and Jurcevic, S. (2003). Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat. Med.* 9, 1275–1280.
- Moon, J.J., Chu, H.H., Hataye, J., Pagán, A.J., Pepper, M., McLachlan, J.B., Zell, T., and Jenkins, M.K. (2009). Tracking epitope-specific T cells. *Nat. Protoc.* 4, 565–581.
- Moraes-Vieira, P.M.M., Takenaka, M.C.S., Silva, H.M., Monteiro, S.M., Agena, F., Lemos, F., Saitovitch, D., Kalil, J., and Coelho, V. (2012). GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 142, 117–126.

- Morgan, M.E., van Bilsen, J.H.M., Bakker, A.M., Heemskerk, B., Schilham, M.W., Hartgers, F.C., Elferink, B.G., van der Zanden, L., de Vries, R.R.P., Huizinga, T.W.J., et al. (2005). Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* *66*, 13–20.
- Morris, P.J. (2004). Transplantation — A Medical Miracle of the 20th Century. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2678–2680.
- Moseman, E.A., Liang, X., Dawson, A.J., Panoskaltis-Mortari, A., Krieg, A.M., Liu, Y.-J., Blazar, B.R., and Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 4433–4442.
- Müllbacher, A., Hill, A.B., Blanden, R.V., Cowden, W.B., King, N.J., and Hla, R.T. (1991). Alloreactive cytotoxic T cells recognize MHC class I antigen without peptide specificity. *J. Immunol.* *147*, 1765–1772.
- Murphy, B., Kim, K.S., Buelow, R., Sayegh, M.H., and Hancock, W.W. (1997). Synthetic MHC class I peptide prolongs cardiac survival and attenuates transplant arteriosclerosis in the Lewis-->Fischer 344 model of chronic allograft rejection. *Transplantation* *64*, 14–19.
- Murphy, B., Magee, C.C., Alexander, S.I., Waaga, A.M., Snoeck, H.W., Vella, J.P., Carpenter, C.B., and Sayegh, M.H. (1999). Inhibition of allorecognition by a human class II MHC-derived peptide through the induction of apoptosis. *J. Clin. Invest.* *103*, 859–867.
- Murphy, B., Yu, J., Jiao, Q., Lin, M., Chitnis, T., and Sayegh, M.H. (2003). A novel mechanism for the immunomodulatory functions of class II MHC-derived peptides. *J. Am. Soc. Nephrol. Jasn* *14*, 1053–1065.
- Murray, J.E., Merrill, J.P., Harrison, J.H., Wilson, R.E., and Dammin, G.J. (1963). Prolonged Survival of Human-Kidney Homografts by Immunosuppressive Drug Therapy. *N. Engl. J. Med.* *268*, 1315–1323.
- Nace, G., Evankovich, J., Eid, R., and Tsung, A. (2012). Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *J. Innate Immun.* *4*, 6–15.
- Nadig, S.N., Wieckiewicz, J., Wu, D.C., Warnecke, G., Zhang, W., Luo, S., Schiopu, A., Taggart, D.P., and Wood, K.J. (2010). In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nat. Med.* *16*, 809–813.
- Naesens, M., and Sarwal, M.M. (2010). Harnessing the diversity of the human T-cell repertoire: A monitoring tool for transplantation tolerance? *Eur. J. Immunol.* *40*, 2986–2989.
- Nafady-Hego, H., Li, Y., Ohe, H., Zhao, X., Satoda, N., Sakaguchi, S., Wood, K., Uemoto, S., and Koshiba, T. (2010). The generation of donor-specific CD4+CD25++CD45RA+ naive regulatory T cells in operationally tolerant patients after pediatric living-donor liver transplantation. *Transplantation* *90*, 1547–1555.
- Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O’Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* *7*, 663–671.
- Nakano, H., Lin, K.L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D.N., Kakiuchi, T., and Gunn, M.D. (2009). Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* *10*, 394–402.
- Neudoerfl, C., Mueller, B.J., Blume, C., Daemen, K., Stevanovic-Meyer, M., Keil, J., Lehner, F., Haller, H., and Falk, C.S. (2013). The Peripheral NK Cell Repertoire after Kidney Transplantation is Modulated by Different Immunosuppressive Drugs. *Front. Immunol.* *4*, 46.
- Newell, K.A., Asare, A., Kirk, A.D., Gisler, T.D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W.J., Marks, W.H., Sanz, I., Lechler, R.I., et al. (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* *120*, 1836–1847.
- Nguyen, P., Liu, W., Ma, J., Manirarora, J.N., Liu, X., Cheng, C., and Geiger, T.L. (2010). Discrete TCR repertoires and CDR3 features distinguish effector and Foxp3+ regulatory T lymphocytes in myelin

- oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 3895–3904.
- Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K., and Sakaguchi, S. (2004). Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* *16*, 1189–1201.
- Nocera, A., Tagliamacco, A., De Palma, R., Del Galdo, F., Ferrante, A., Fontana, I., Barocci, S., Ginevri, F., Rolla, D., Ravetti, J.L., et al. (2004). Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts. *Clin. Transplant.* *18*, 564–570.
- Nomura, M., Yamashita, K., Murakami, M., Takehara, M., Echizenya, H., Sunahara, M., Kitagawa, N., Fujita, M., Furukawa, H., Uede, T., et al. (2002). Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD40lg gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation* *73*, 1403–1410.
- Noorchashm, H., Reed, A.J., Rostami, S.Y., Mozaffari, R., Zekavat, G., Koeberlein, B., Caton, A.J., and Najj, A. (2006). B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 7715–7722.
- Obata, F., Yoshida, K., Ohkubo, M., Ikeda, Y., Taoka, Y., Takeuchi, Y., Shinohara, N., Endo, T., and Baba, S. (2005). Contribution of CD4+ and CD8+ T cells and interferon-gamma to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. *Transpl. Immunol.* *14*, 21–25.
- Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., et al. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* *7*, 652–662.
- Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of “tolerance” and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* *65*, 305–317.
- Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B.S., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J. Exp. Med.* *206*, 549–559.
- Okuno, Y., Murakoshi, A., Negita, M., Akane, K., Kojima, S., and Suzuki, H. (2013). CD8+ CD122+ regulatory T cells contain clonally expanded cells with identical CDR3 sequences of the T-cell receptor β -chain. *Immunology* *139*, 309–317.
- Opelz, G., and Döhler, B. (2004). Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *4*, 222–230.
- Ordóñez, L., Bernard, I., L’faqihi-Olive, F.-E., Tervaert, J.W.C., Damoiseaux, J., and Saoudi, A. (2009). CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *Plos One* *4*, e5287.
- Ordóñez, L., Bernard, I., Chabod, M., Augusto, J.-F., Lauwers-Cances, V., Cristini, C., Cuturi, M.-C., Subra, J.-F., and Saoudi, A. (2013). A Higher Risk of Acute Rejection of Human Kidney Allografts Can Be Predicted from the Level of CD45RC Expressed by the Recipients’ CD8 T Cells. *Plos One* *8*, e69791.
- Ouabed, A., Hubert, F.-X., Chabannes, D., Gautreau, L., Heslan, M., and Josien, R. (2008). Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 5862–5870.
- Oura, T., Yamashita, K., Suzuki, T., Fukumori, D., Watanabe, M., Hirokata, G., Wakayama, K., Taniguchi, M., Shimamura, T., Miura, T., et al. (2012). Long-term hepatic allograft acceptance based on CD40 blockade by ASKP1240 in nonhuman primates. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 1740–1754.

- Pabón, M.A., Navarro, C.E., Martín, R., Rodríguez, M., Martín, I., Gaitán, L., Gómez, A., and Lozano, E. (2011). Minor histocompatibility antigens as risk factor for poor prognosis in kidney transplantation. *Transplant. Proc.* *43*, 3319–3323.
- Pacholczyk, R., and Kern, J. (2008). The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology* *125*, 450–458.
- Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2006). Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity* *25*, 249–259.
- Pacholczyk, R., Kern, J., Singh, N., Iwashima, M., Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2007). Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunity* *27*, 493–504.
- Page, E.K., Dar, W.A., and Knechtle, S.J. (2012). Tolerogenic therapies in transplantation. *Front. Immunol.* *3*.
- Paiva, R.S., Lino, A.C., Bergman, M.-L., Caramalho, Í., Sousa, A.E., Zelenay, S., and Demengeot, J. (2013). Recent thymic emigrants are the preferential precursors of regulatory T cells differentiated in the periphery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 6494–6499.
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettré, S., Lozano, J.J., et al. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* *78*, 503–513.
- Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bucciato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.* *12*, 870–878.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1353–1362.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zöller, M., and Kourilsky, P. (1993). The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 4319–4323.
- Panoskaltis-Mortari, A., Taylor, P.A., Riddle, M.J., Shlomchik, M.A., and Blazar, B.R. (2008). In situ identification of allospecific B cells using pentamers. *Blood* *111*, 3904–3905.
- Panoutsakopoulou, V., Huster, K.M., McCarty, N., Feinberg, E., Wang, R., Wucherpfennig, K.W., and Cantor, H. (2004). Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *J. Clin. Invest.* *113*, 1218–1224.
- Parcina, M., Schiller, M., Gierschke, A., Heeg, K., and Bekeredjian-Ding, I. (2009). PDC expressing CD36, CD61 and IL-10 may contribute to propagation of immune tolerance. *Autoimmunity* *42*, 353–355.
- Pascual, J., Pérez-Sáez, M.J., Mir, M., and Crespo, M. (2012). Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management. *Transplant. Rev. Orlando Fla* *26*, 280–290.
- Pasquet, L., Douet, J.-Y., Sparwasser, T., Romagnoli, P., and Meerwijk, J.P.M. van (2013). Long-term prevention of chronic allograft rejection by regulatory T-cell immunotherapy involves host Foxp3-expressing T cells. *Blood* *121*, 4303–4310.
- Peiser, M., Becht, A., and Wanner, R. (2007). Antibody blocking of MHC II on human activated regulatory T cells abrogates their suppressive potential. *Allergy* *62*, 773–780.
- Peng, X., Kasran, A., Warmerdam, P.A., de Boer, M., and Ceuppens, J.L. (1996). Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur. J. Immunol.* *26*, 1621–1627.
- Perniola, R. (2012). Expression of the autoimmune regulator gene and its relevance to the mechanisms of central and peripheral tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 207403.

- Piazza, A., Poggi, E., Borrelli, L., Servetti, S., Monaco, P.I., Buonomo, O., Valeri, M., Torlone, N., Adorno, D., and Casciani, C.U. (2001). Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* *71*, 1106–1112.
- Picarda, E., Anegón, I., and Guillonéau, C. (2011). T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy* *3*, 35–37.
- Picca, C.C., Larkin, J., 3rd, Boesteanu, A., Lerman, M.A., Rankin, A.L., and Caton, A.J. (2006). Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol. Rev.* *212*, 74–85.
- Pinchuk, L.M., Klaus, S.J., Magaletti, D.M., Pinchuk, G.V., Norsen, J.P., and Clark, E.A. (1996). Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 4363–4370.
- Plesa, G., Zheng, L., Medvec, A., Wilson, C.B., Robles-Oteiza, C., Liddy, N., Bennett, A.D., Gavarret, J., Vuidepot, A., Zhao, Y., et al. (2012). TCR affinity and specificity requirements for human regulatory T-cell function. *Blood* *119*, 3420–3430.
- Pomié, C., Ménager-Marcq, I., and van Meerwijk, J.P.M. (2008). Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum. Immunol.* *69*, 708–714.
- Pomié, C., Vicente, R., Vuddamalay, Y., Lundgren, B.A., van der Hoek, M., Enault, G., Kagan, J., Fazilleau, N., Scott, H.S., Romagnoli, P., et al. (2011). Autoimmune regulator (AIRE)-deficient CD8+CD28^{low} regulatory T lymphocytes fail to control experimental colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 12437–12442.
- Pons, J.A., Revilla-Nuin, B., Baroja-Mazo, A., Ramírez, P., Martínez-Alarcón, L., Sánchez-Bueno, F., Robles, R., Rios, A., Aparicio, P., and Parrilla, P. (2008). FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation* *86*, 1370–1378.
- Powis, S.J., Young, L.L., Joly, E., Barker, P.J., Richardson, L., Brandt, R.P., Melief, C.J., Howard, J.C., and Butcher, G.W. (1996). The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* *4*, 159–165.
- Pratschke, J., Weiss, S., Neuhaus, P., and Pascher, A. (2008). Review of nonimmunological causes for deteriorated graft function and graft loss after transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *21*, 512–522.
- Preston, E.H., Xu, H., Dhanireddy, K.K., Pearl, J.P., Leopardi, F.V., Starost, M.F., Hale, D.A., and Kirk, A.D. (2005). IDEC-131 (anti-CD154), sirolimus and donor-specific transfusion facilitate operational tolerance in non-human primates. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *5*, 1032–1041.
- Price, D.A., West, S.M., Betts, M.R., Ruff, L.E., Brenchley, J.M., Ambrozak, D.R., Edghill-Smith, Y., Kuroda, M.J., Bogdan, D., Kunstman, K., et al. (2004). T cell receptor recognition motifs govern immune escape patterns in acute SIV infection. *Immunity* *21*, 793–803.
- Probst-Kepper, M., Hecht, H.-J., Herrmann, H., Janke, V., Ocklenburg, F., Klempnauer, J., van den Eynde, B.J., and Weiss, S. (2004). Conformational restraints and flexibility of 14-meric peptides in complex with HLA-B*3501. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 5610–5616.
- Qian, L., Qian, C., Chen, Y., Bai, Y., Bao, Y., Lu, L., and Cao, X. (2012). Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi}FcγIIb^{hi} regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood* *120*, 581–591.
- Qin, S., Cobbold, S.P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J., and Waldmann, H. (1993). “Infectious” transplantation tolerance. *Science* *259*, 974–977.
- Quezada, S.A., Bennett, K., Blazar, B.R., Rudensky, A.Y., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 771–779.

- Raimondi, G., Sumpter, T.L., Matta, B.M., Pillai, M., Corbitt, N., Vodovotz, Y., Wang, Z., and Thomson, A.W. (2010). Mammalian target of rapamycin inhibition and alloantigen-specific regulatory T cells synergize to promote long-term graft survival in immunocompetent recipients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 624–636.
- Ramsey, H., Pilat, N., Hock, K., Klaus, C., Unger, L., Schwarz, C., Baranyi, U., Gattringer, M., Schwaiger, E., Wrba, F., et al. (2013). Anti-LFA-1 or rapamycin overcome costimulation blockade-resistant rejection in sensitized bone marrow recipients. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *26*, 206–218.
- Rehman, K.K., Bertera, S., Trucco, M., Gambotto, A., and Robbins, P.D. (2007). Immunomodulation by adenoviral-mediated SCD40-Ig gene therapy for mouse allogeneic islet transplantation. *Transplantation* *84*, 301–307.
- Reiser, J.B., Darnault, C., Guimezanes, A., Grégoire, C., Mosser, T., Schmitt-Verhulst, A.M., Fontecilla-Camps, J.C., Malissen, B., Housset, D., and Mazza, G. (2000). Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule. *Nat. Immunol.* *1*, 291–297.
- Reiser, J.B., Grégoire, C., Darnault, C., Mosser, T., Guimezanes, A., Schmitt-Verhulst, A.M., Fontecilla-Camps, J.C., Mazza, G., Malissen, B., and Housset, D. (2002). A T cell receptor CDR3beta loop undergoes conformational changes of unprecedented magnitude upon binding to a peptide/MHC class I complex. *Immunity* *16*, 345–354.
- Reiser, J.-B., Darnault, C., Grégoire, C., Mosser, T., Mazza, G., Kearney, A., van der Merwe, P.A., Fontecilla-Camps, J.C., Housset, D., and Malissen, B. (2003). CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. *Nat. Immunol.* *4*, 241–247.
- Relland, L.M., Williams, J.B., Relland, G.N., Haribhai, D., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Gorski, J., and Williams, C.B. (2012). The TCR repertoires of regulatory and conventional T cells specific for the same foreign antigen are distinct. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 3566–3574.
- Renner, P., Popp, F.C., Eggenhofer, E., Slowik, P., Piso, P., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., and Dahlke, M.H. (2010). Antigen-specific recognition is critical for the function of regulatory CD8(+)CD28(-) T cells. *Transpl. Immunol.* *22*, 144–149.
- Riberdy, J.M., Newcomb, J.R., Surman, M.J., Barbosa, J.A., and Cresswell, P. (1992). HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* *360*, 474–477.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* *393*, 474–478.
- Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I., and Suzuki, H. (2004). Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J. Exp. Med.* *200*, 1123–1134.
- Rifa'i, M., Shi, Z., Zhang, S.-Y., Lee, Y.H., Shiku, H., Isobe, K.-I., and Suzuki, H. (2008). CD8+CD122+ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I-alpha/betaTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *Int. Immunol.* *20*, 937–947.
- Rissoan, M.-C., Duhon, T., Bridon, J.-M., Bendriss-Vermare, N., Péronne, C., de Saint Vis, B., Brière, F., and Bates, E.E.M. (2002). Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *100*, 3295–3303.
- Rizzo, L.V., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., and Caspi, R.R. (1995). Regulation of the interaction between Th1 and Th2 T cell clones to provide help for antibody production in vivo. *Eur. J. Immunol.* *25*, 708–716.
- Robb, R.J., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Wilson, Y.A., Raffelt, N.C., Olver, S.D., Varelias, A., Alexander, K.A., Teal, B.E., Sparwasser, T., et al. (2012). Identification and expansion of highly suppressive CD8+FoxP3+ regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *119*, 5898–5908.
- Robinson, M.A. (1989). Allelic sequence variations in the hypervariable region of a T-cell receptor beta chain: correlation with restriction fragment length polymorphism in human families and populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 9422–9426.

- Robinson, J., Halliwell, J.A., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., and Marsh, S.G.E. (2013). The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* *41*, D1222–1227.
- Röcken, M., Urban, J.F., and Shevach, E.M. (1992). Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* *359*, 79–82.
- Rodríguez-Palmero, M., Hara, T., Thumbs, A., and Hünig, T. (1999). Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* *29*, 3914–3924.
- Rodríguez-Palmero, M., Franch, A., Castell, M., Pelegrí, C., Pérez-Cano, F.J., Kleinschnitz, C., Stoll, G., Hünig, T., and Castellote, C. (2006). Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody. *J. Rheumatol.* *33*, 110–118.
- Rogers, N. m., Isenberg, J. s., and Thomson, A. w. (2013). Plasmacytoid Dendritic Cells: No Longer an Enigma and Now Key to Transplant Tolerance? *Am. J. Transplant.* *13*, 1125–1133.
- Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2010). Thymic selection and lineage commitment of CD4(+)Foxp3(+) regulatory T lymphocytes. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *92*, 251–277.
- Romagnoli, P., Hudrisier, D., and van Meerwijk, J.P.M. (2002). Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 1644–1648.
- Romagnoli, P., Dooley, J., Enault, G., Vicente, R., Malissen, B., Liston, A., and van Meerwijk, J.P.M. (2012). The thymic niche does not limit development of the naturally diverse population of mouse regulatory T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 3831–3837.
- Romagnoli, P.A., Premenko-Lanier, M.F., Loria, G.D., and Altman, J.D. (2013). CD8 T cell memory recall is enhanced by novel direct interactions with CD4 T cells enabled by MHC class II transferred from APCs. *Plos One* *8*, e56999.
- Van Rompaey, N., and Le Moine, A. (2011). Myeloid-derived suppressor cells: characterization and expansion in models of endotoxemia and transplantation. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* *677*, 169–180.
- Roncarolo, M.-G., and Battaglia, M. (2007). Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 585–598.
- De la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2480–2488.
- Rowshani, A.T., and Vereyken, E.J.F. (2012). The role of macrophage lineage cells in kidney graft rejection and survival. *Transplantation* *94*, 309–318.
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., Jr, et al. (2008). Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* *28*, 546–558.
- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 419–466.
- Rutella, S., Danese, S., and Leone, G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* *108*, 1435–1440.
- Sachs, D.H., Sykes, M., Kawai, T., and Cosimi, A.B. (2011). Immuno-intervention for the induction of transplantation tolerance through mixed chimerism. *Semin. Immunol.* *23*, 165–173.
- Sad, S., Marcotte, R., and Mosmann, T.R. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* *2*, 271–279.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* *5*, 103–114.

- Safinia, N., Leech, J., Hernandez-Fuentes, M., Lechler, R., and Lombardi, G. (2013). Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy. *Clin. Exp. Immunol.* *172*, 158–168.
- Sagoo, P., and Lombardi, G. (2012). Relevance of regulatory T cell promotion of donor-specific tolerance in solid organ transplantation. *Front. Immunol. Toler.* *3*, 184.
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D.A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., et al. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* *120*, 1848–1861.
- Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F.O., Lechler, R.I., and Lombardi, G. (2011). Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* *3*, 83ra42.
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* *266*, 1208–1212.
- Saitoh, O., Abiru, N., Nakahara, M., and Nagayama, Y. (2007). CD8+CD122+ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model. *Endocrinology* *148*, 6040–6046.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 531–562.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 1151–1164.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* *12*, 431–440.
- Salvadori, M., and Bertoni, E. (2012). Renal transplant allocation criteria, desensitization strategies and immunosuppressive therapy in retransplant renal patients. *J. Nephrol.* *25*, 890–899.
- Samsonov, D., Geehan, C., Woda, C.B., and Briscoe, D.M. (2012). Differential activation of human T cells to allogeneic endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts in vitro. *Transplant. Res.* *1*, 4.
- Sánchez-Fueyo, A., Sandner, S., Habicht, A., Mariat, C., Kenny, J., Degauque, N., Zheng, X.X., Strom, T.B., Turka, L.A., and Sayegh, M.H. (2006). Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 329–334.
- Sánchez-Fueyo, A., Domenig, C.M., Mariat, C., Alexopoulos, S., Zheng, X.X., and Strom, T.B. (2007). Influence of direct and indirect allorecognition pathways on CD4+CD25+ regulatory T-cell function in transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *20*, 534–541.
- Sarukhan, A., Garcia, C., Lanoue, A., and von Boehmer, H. (1998). Allelic inclusion of T cell receptor alpha genes poses an autoimmune hazard due to low-level expression of autospecific receptors. *Immunity* *8*, 563–570.
- Schaier, M., Seissler, N., Schmitt, E., Meuer, S., Hug, F., Zeier, M., and Steinborn, A. (2012). DRhigh+CD45RA–Tregs Potentially Affect the Suppressive Activity of the Total Treg Pool in Renal Transplant Patients. *Plos One* *7*, e34208.
- Schaier, M., Seissler, N., Becker, L.E., Schaefer, S.M., Schmitt, E., Meuer, S., Hug, F., Sommerer, C., Waldherr, R., Zeier, M., et al. (2013). The extent of HLA-DR expression on HLA-DR(+) Tregs allows the identification of patients with clinically relevant borderline rejection. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *26*, 290–299.
- Schliker, U. a[latin sharp, Streit, M., and Sawitzki, B. (2012). Tregs: application for solid-organ transplantation. [Miscellaneous Article]. *Curr. Opin. Organ Transplant.* Febr. 2012 *17*, 34–41.

- Schmitt, E.G., and Williams, C.B. (2013). Generation and function of induced regulatory T cells. *Front. Immunol.* *4*, 152.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* *23*, 479–490.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998a). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* *393*, 480–483.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998b). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* *393*, 480–483.
- Schölz, C., and Tampé, R. (2009). The peptide-loading complex--antigen translocation and MHC class I loading. *Biol. Chem.* *390*, 783–794.
- Schwartz, R.H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* *248*, 1349–1356.
- Scott-Browne, J.P., White, J., Kappler, J.W., Gapin, L., and Marrack, P. (2009). Germline-encoded amino acids in the alphabeta T-cell receptor control thymic selection. *Nature* *458*, 1043–1046.
- Scotto, L., Naiyer, A.J., Galluzzo, S., Rossi, P., Manavalan, J.S., Kim-Schulze, S., Fang, J., Favera, R.D., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2004). Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells. *Hum. Immunol.* *65*, 1297–1306.
- Scully, R., Qin, S., Cobbold, S., and Waldmann, H. (1994). Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *24*, 2383–2392.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* *209*, 653–660.
- Seissler, N., Schmitt, E., Hug, F., Sommerer, C., Zeier, M., Schaier, M., and Steinborn, A. (2012). Methylprednisolone treatment increases the proportion of the highly suppressive HLA-DR+Treg-cells in transplanted patients. *Transpl. Immunol.* *27*, 157–161.
- Sellarés, J., Reeve, J., Loupy, A., Mengel, M., Sis, B., Skene, A., de Freitas, D.G., Kreepala, C., Hidalgo, L.G., Famulski, K.S., et al. (2013). Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *13*, 971–983.
- Selvaggi, G., Ricordi, C., Podack, E.R., and Inverardi, L. (1996). The role of the perforin and Fas pathways of cytotoxicity in skin graft rejection. *Transplantation* *62*, 1912–1915.
- Sempowski, G.D., Rozenblit, J., Smith, T.J., and Phipps, R.P. (1998). Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production. *Am. J. Physiol.* *274*, C707–714.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003). TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity* *19*, 59–70.
- Sewell, A.K. (2012). Why must T cells be cross-reactive? *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 669–677.
- Shan, J., Guo, Y., Luo, L., Lu, J., Li, C., Zhang, C., Huang, Y., Feng, L., Wu, W., Long, D., et al. (2011). Do CD4+ Foxp3+ Treg cells correlate with transplant outcomes: a systematic review on recipients of solid organ transplantation. *Cell. Immunol.* *270*, 5–12.
- Shevach, E.M. (2011). The resurrection of T cell-mediated suppression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 3805–3807.

- Shi, Z., Rifa'i, M., Lee, Y.H., Shiku, H., Isobe, K.-I., and Suzuki, H. (2008). Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8+CD122+ regulatory T cells. *Immunology* 124, 121–128.
- Shi, Z., Okuno, Y., Rifa'i, M., Endharti, A.T., Akane, K., Isobe, K.-I., and Suzuki, H. (2009). Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *Eur. J. Immunol.* 39, 2106–2119.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3, 135–142.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., et al. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380, 630–633.
- Shirwan, H., Barwari, L., Fuss, I., Makowka, L., and Cramer, D.V. (1995). Structure and repertoire usage of rat TCR alpha-chain genes in T cells infiltrating heart allografts. *J. Immunol.* 154, 1964–1972.
- Shortman, K., and Heath, W.R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234, 18–31.
- Sidhu, S., Deacock, S., Bal, V., Batchelor, J.R., Lombardi, G., and Lechler, R.I. (1992). Human T cells cannot act as autonomous antigen-presenting cells, but induce tolerance in antigen-specific and alloreactive responder cells. *J. Exp. Med.* 176, 875–880.
- Sidiropoulos, P.I., and Boumpas, D.T. (2004). Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 13, 391–397.
- Sireci, G., Barera, A., Macaluso, P., Di Sano, C., Bonanno, C.T., Pio La Manna, M., Di Liberto, D., Dieli, F., and Salerno, A. (2009). A continuous infusion of a minor histocompatibility antigen-immunodominant peptide induces a delay of male skin graft rejection. *Immunobiology* 214, 703–711.
- Sis, B., Campbell, P.M., Mueller, T., Hunter, C., Cockfield, S.M., Cruz, J., Meng, C., Wishart, D., Solez, K., and Halloran, P.F. (2007). Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 1743–1752.
- Sis, B., Jhangri, G.S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B., and Halloran, P.F. (2009). Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 2312–2323.
- Sis, B., Jhangri, G.S., Riopel, J., Chang, J., de Freitas, D.G., Hidalgo, L., Mengel, M., Matas, A., and Halloran, P.F. (2012). A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 1168–1179.
- Sloan-Lancaster, J., Steinberg, T.H., and Allen, P.M. (1996). Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands. *J. Exp. Med.* 184, 1525–1530.
- Smith, T.R.F., and Kumar, V. (2008). Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol.* 29, 337–342.
- Smits, H.H., de Jong, E.C., Schuitemaker, J.H.N., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., Kapsenberg, M.L., and Wierenga, E.A. (2002). Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 ligation favors human Th1 development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 1710–1716.
- Solez, K., and Racusen, L.C. (2013). The Banff classification revisited. *Kidney Int.* 83, 201–206.
- Solez, K., Colvin, R.B., Racusen, L.C., Sis, B., Halloran, P.F., Birk, P.E., Campbell, P.M., Cascalho, M., Collins, A.B., Demetris, A.J., et al. (2007). Banff '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy (—CAN"). *Am. J. Transplant.* 7, 518–526.

- Solez, K., Colvin, R.B., Racusen, L.C., Haas, M., Sis, B., Mengel, M., Halloran, P.F., Baldwin, W., Banfi, G., Collins, A.B., et al. (2008). Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 8, 753–760.
- Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 581–592.
- Speir, J.A., Stevens, J., Joly, E., Butcher, G.W., and Wilson, I.A. (2001). Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa. *Immunity* 14, 81–92.
- Stanford, R.E., Ahmed, S., Hodson, M., Banner, N.R., and Rose, M.L. (2003). A Role for Indirect Allorecognition in Lung Transplant Recipients with Obliterative Bronchiolitis. *Am. J. Transplant.* 3, 736–742.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139–176.
- Steele, D.J., Laufer, T.M., Smiley, S.T., Ando, Y., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., and Auchincloss, H. (1996). Two levels of help for B cell alloantibody production. *J. Exp. Med.* 183, 699–703.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142–1162.
- Stevens, J., Wiesmüller, K.H., Walden, P., and Joly, E. (1998a). Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries. *Eur. J. Immunol.* 28, 1272–1279.
- Stevens, J., Wiesmüller, K.H., Barker, P.J., Walden, P., Butcher, G.W., and Joly, E. (1998b). Efficient generation of major histocompatibility complex class I-peptide complexes using synthetic peptide libraries. *J. Biol. Chem.* 273, 2874–2884.
- Subra, J.F., Cautain, B., Xystrakis, E., Mas, M., Lagrange, D., van der Heijden, H., van de Gaar, M.J., Druet, P., Fournié, G.J., Saoudi, A., et al. (2001). The balance between CD45RChigh and CD45RClow CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 2944–2952.
- Suchin, E.J., Langmuir, P.B., Palmer, E., Sayegh, M.H., Wells, A.D., and Turka, L.A. (2001). Quantifying the Frequency of Alloreactive T Cells In Vivo: New Answers to an Old Question. *J. Immunol.* 166, 973–981.
- Sumitran-Holgersson, S. (2008). Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 607–613.
- Sun, J., Leahy, D.J., and Kavathas, P.B. (1995). Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domains of MHC class I. *J. Exp. Med.* 182, 1275–1280.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 100, 655–669.
- Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C., and Fathman, C.G. (2002). The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 2461–2465.
- Szymczak-Workman, A.L., Workman, C.J., and Vignali, D.A.A. (2009). Cutting edge: regulatory T cells do not require stimulation through their TCR to suppress. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 5188–5192.
- Taflin, C., Nochy, D., Hill, G., Frouget, T., Rioux, N., Vérine, J., Bruneval, P., and Glotz, D. (2010). Regulatory T Cells in Kidney Allograft Infiltrates Correlate With Initial Inflammation and Graft Function: Transplantation 89, 194–199.

- Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.* *6*, 152–162.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* *10*, 1969–1980.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* *192*, 303–310.
- Takeda, A., Otsuka, Y., Horike, K., Inaguma, D., Hiramitsu, T., Yamamoto, T., Nanmoku, K., Goto, N., Watarai, Y., Uchida, K., et al. (2012). Significance of C4d deposition in antibody-mediated rejection. *Clin. Transplant.* *26 Suppl 24*, 43–48.
- Talmage, D.W., Dart, G., Radovich, J., and Lafferty, K.J. (1976). Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science* *191*, 385–388.
- Tan, C., and Gery, I. (2012). The unique features of Th9 cells and their products. *Crit. Rev. Immunol.* *32*, 1–10.
- Tang, J.L., Subbotin, V.M., Antonysamy, M.A., Troutt, A.B., Rao, A.S., and Thomson, A.W. (2001). Interleukin-17 antagonism inhibits acute but not chronic vascular rejection. *Transplantation* *72*, 348–350.
- Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* *199*, 1455–1465.
- Tang, Q., Adams, J.Y., Tooley, A.J., Bi, M., Fife, B.T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R.M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2006a). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.* *7*, 83–92.
- Tang, X., Maricic, I., Purohit, N., Bakamjian, B., Reed-Loisel, L.M., Beeston, T., Jensen, P., and Kumar, V. (2006b). Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8 α α ⁺TCR α β ⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 7645–7655.
- Tang, X., Maricic, I., and Kumar, V. (2007). Anti-TCR antibody treatment activates a novel population of nonintestinal CD8 α α ⁺ TCR α β ⁺ regulatory T cells and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 6043–6050.
- Tarbell, K.V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., and Steinman, R.M. (2004). CD25⁺ CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* *199*, 1467–1477.
- Le Texier, L., Thebault, P., Lavault, A., Usal, C., Merieau, E., Quillard, T., Charreau, B., Souillou, J.P., Cuturi, M.C., Brouard, S., et al. (2011). Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *11*, 429–438.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* *188*, 287–296.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3433–3441.
- Thorstenson, K.M., and Khoruts, A. (2001). Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25⁺CD4⁺ T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 188–195.

- Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J.C., John, S., and Taams, L.S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19446–19451.
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* *3*, 541–547.
- Tokita, D., Mazariegos, G.V., Zahorchak, A.F., Chien, N., Abe, M., Raimondi, G., and Thomson, A.W. (2008). High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation* *85*, 369–377.
- Tonegawa, S. (1993). The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1987. Somatic generation of immune diversity. *Scand. J. Immunol.* *38*, 303–319.
- Torres-Aguilar, H., Aguilar-Ruiz, S.R., González-Pérez, G., Munguía, R., Bajaña, S., Meraz-Ríos, M.A., and Sánchez-Torres, C. (2010). Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 1765–1775.
- Van der Touw, W., Burrell, B., Lal, G., and Bromberg, J.S. (2012). NK Cells are Required for Costimulatory Blockade Induced Tolerance to Vascularized Allografts. *Transplant. J.* *94*, 575–584.
- Toyokawa, H., Nakao, A., Bailey, R.J., Nalesnik, M.A., Kaizu, T., Lemoine, J.L., Ikeda, A., Tomiyama, K., Papworth, G.D., Huang, L., et al. (2008). Relative contribution of direct and indirect allorecognition in developing tolerance after liver transplantation. *Liver Transpl.* *14*, 346–357.
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* *10*, 864–871.
- Trinité, B., Voisine, C., Yagita, H., and Josien, R. (2000). A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 4202–4208.
- Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszuk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J., and Hellmann, A. (2009). First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *133*, 22–26.
- Tsang, J.Y.S., Chai, J.G., and Lechler, R. (2003). Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood* *101*, 2704–2710.
- Tsang, J.Y.-S., Tanriver, Y., Jiang, S., Xue, S.-A., Ratnasothy, K., Chen, D., Stauss, H.J., Bucy, R.P., Lombardi, G., and Lechler, R. (2008). Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 3619–3628.
- Tsang, J.Y.-S., Tanriver, Y., Jiang, S., Leung, E., Ratnasothy, K., Lombardi, G., and Lechler, R. (2009). Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression. *Transpl. Immunol.* *21*, 203–209.
- Tu, W., Lau, Y.-L., Zheng, J., Liu, Y., Chan, P.-L., Mao, H., Dionis, K., Schneider, P., and Lewis, D.B. (2008). Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood* *112*, 2554–2562.
- Turner, S.J., Kedzierska, K., Komodromou, H., La Gruta, N.L., Dunstone, M.A., Webb, A.I., Webby, R., Walden, H., Xie, W., McCluskey, J., et al. (2005). Lack of prominent peptide-major histocompatibility complex features limits repertoire diversity in virus-specific CD8+ T cell populations. *Nat. Immunol.* *6*, 382–389.
- Turner, S.J., Doherty, P.C., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2006). Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 883–894.

- Turner, S.J., La Gruta, N.L., Kedzierska, K., Thomas, P.G., and Doherty, P.C. (2009). Functional implications of T cell receptor diversity. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 286–290.
- Tynan, F.E., Borg, N.A., Miles, J.J., Beddoe, T., El-Hassen, D., Silins, S.L., van Zuylen, W.J.M., Purcell, A.W., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., et al. (2005a). High resolution structures of highly bulged viral epitopes bound to major histocompatibility complex class I. Implications for T-cell receptor engagement and T-cell immunodominance. *J. Biol. Chem.* *280*, 23900–23909.
- Tynan, F.E., Burrows, S.R., Buckle, A.M., Clements, C.S., Borg, N.A., Miles, J.J., Beddoe, T., Whisstock, J.C., Wilce, M.C., Silins, S.L., et al. (2005b). T cell receptor recognition of a “super-bulged” major histocompatibility complex class I-bound peptide. *Nat. Immunol.* *6*, 1114–1122.
- Tynan, F.E., Reid, H.H., Kjer-Nielsen, L., Miles, J.J., Wilce, M.C.J., Kostenko, L., Borg, N.A., Williamson, N.A., Beddoe, T., Purcell, A.W., et al. (2007). A T cell receptor flattens a bulged antigenic peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule. *Nat. Immunol.* *8*, 268–276.
- Udaka, K., Tsomides, T.J., and Eisen, H.N. (1992). A naturally occurring peptide recognized by alloreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in association with a class I MHC protein. *Cell* *69*, 989–998.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H.D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., and Takahama, Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J. Exp. Med.* *200*, 493–505.
- Uss, E., Rowshani, A.T., Hooibrink, B., Lardy, N.M., van Lier, R.A.W., and ten Berge, I.J.M. (2006). CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 2775–2783.
- Uss, E., Yong, S.-L., Hooibrink, B., van Lier, R.A.W., and ten Berge, I.J.M. (2007). Rapamycin enhances the number of alloantigen-induced human CD103⁺CD8⁺ regulatory T cells in vitro. *Transplantation* *83*, 1098–1106.
- Valujskikh, A., Lantz, O., Celli, S., Matzinger, P., and Heeger, P.S. (2002). Cross-primed CD8⁺ T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway. *Nat. Immunol.* *3*, 844–851.
- Vanaudenaerde, B.M., De Vleeschauwer, S.I., Vos, R., Meyts, I., Bullens, D.M., Reynders, V., Wuyts, W.A., Van Raemdonck, D.E., Dupont, L.J., and Verleden, G.M. (2008). The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *8*, 1911–1920.
- Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 3285–3290.
- Veerapathran, A., Pidala, J., Beato, F., Yu, X.-Z., and Anasetti, C. (2011). Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly. *Blood* *118*, 5671–5680.
- Veerapathran, A., Pidala, J., Beato, F., Betts, B., Kim, J., Turner, J.G., Hellerstein, M.K., Yu, X.-Z., Janssen, W., and Anasetti, C. (2013). Human regulatory T cells against minor histocompatibility antigens: ex vivo expansion for prevention of graft-versus-host disease. *Blood*.
- Vella, J.P., Spadafora-Ferreira, M., Murphy, B., Alexander, S.I., Harmon, W., Carpenter, C.B., and Sayegh, M.H. (1997). Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* *64*, 795–800.
- Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* *143*, 592–605.
- Visekruna, A., Ritter, J., Scholz, T., Campos, L., Guralnik, A., Poncette, L., Raifer, H., Hagner, S., Garn, H., Staudt, V., et al. (2013). Tc9 cells, a new subset of CD8⁺ T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* *43*, 606–618.

- Voisine, C., Hubert, F.-X., Trinité, B., Heslan, M., and Josien, R. (2002). Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 2284–2291.
- Waaga-Gasser, A.M., Grimm, M.R., Lutz, J., Lange, V., Lenhard, S.M., Aviles, B., Kist-van Holthe, J.E., Lebedeva, T., Samsonov, D., Meyer, D., et al. (2009). Regulatory allospecific T cell clones abrogate chronic allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol. Jasn* *20*, 820–830.
- Walker, L.S.K., Chodos, A., Eggena, M., Dooms, H., and Abbas, A.K. (2003). Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J. Exp. Med.* *198*, 249–258.
- Wallet, M.A., Sen, P., Flores, R.R., Wang, Y., Yi, Z., Huang, Y., Mathews, C.E., Earp, H.S., Matsushima, G., Wang, B., et al. (2008). MerTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance. *J. Exp. Med.* *205*, 219–232.
- Wan, Q., Kozhaya, L., Imberg, K., Mercer, F., Zhong, S., Krogsgaard, M., and Unutmaz, D. (2013). Probing the Effector and Suppressive Functions of Human T Cell Subsets Using Antigen-Specific Engineered T Cell Receptors. *Plos One* *8*, e56302.
- Wang, J., Jiang, S., Shi, H., Lin, Y., Wang, J., and Wang, X. (2008). Prolongation of corneal xenotransplant survival by T-cell vaccination-induced T-regulatory cells. *Xenotransplantation* *15*, 164–173.
- Watanabe, N., Wang, Y.-H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.-H., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* *436*, 1181–1185.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* *270*, 985–988.
- Watts, C. (2004). The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat. Immunol.* *5*, 685–692.
- Weber, D.A., Terrell, N.K., Zhang, Y., Strindberg, G., Martin, J., Rudensky, A., and Braunstein, N.S. (1995). Requirement for peptide in alloreactive CD4+ T cell recognition of class II MHC molecules. *J. Immunol.* *154*, 5153–5164.
- Wei, B., Velazquez, P., Turovskaya, O., Spricher, K., Aranda, R., Kronenberg, M., Birnbaumer, L., and Braun, J. (2005). Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2010–2015.
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J. Exp. Med.* *209*, 1723–1742, S1.
- Whitehead, G.S., Wilson, R.H., Nakano, K., Burch, L.H., Nakano, H., and Cook, D.N. (2012). IL-35 production by inducible costimulator (ICOS)-positive regulatory T cells reverses established IL-17-dependent allergic airways disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 207–215.e1–5.
- Williams, G.M., Hume, D.M., Hudson, R.P., Morris, P.J., Kano, K., and Milgrom, F. (1968). Hyperacute Renal-Homograft Rejection in Man. *N. Engl. J. Med.* *279*, 611–618.
- Wing, J.B., and Sakaguchi, S. (2011). TCR diversity and Treg cells, sometimes more is more. *Eur. J. Immunol.* *41*, 3097–3100.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* *322*, 271–275.

- Womer, K.L., Magee, C.C., Najafian, N., Vella, J.P., Milford, E.L., Sayegh, M.H., and Carpenter, C.B. (2008). A pilot study on the immunological effects of oral administration of donor major histocompatibility complex class II peptides in renal transplant recipients. *Clin. Transplant.* *22*, 754–759.
- Wong, J., Obst, R., Correia-Neves, M., Losyev, G., Mathis, D., and Benoist, C. (2007a). Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 7032–7041.
- Wong, J., Mathis, D., and Benoist, C. (2007b). TCR-based lineage tracing: no evidence for conversion of conventional into regulatory T cells in response to a natural self-antigen in pancreatic islets. *J. Exp. Med.* *204*, 2039–2045.
- Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 417–430.
- Wooldridge, L., Hutchinson, S.L., Choi, E.M., Lissina, A., Jones, E., Mirza, F., Dunbar, P.R., Price, D.A., Cerundolo, V., and Sewell, A.K. (2003). Anti-CD8 antibodies can inhibit or enhance peptide-MHC class I (pMHCI) multimer binding: this is paralleled by their effects on CTL activation and occurs in the absence of an interaction between pMHCI and CD8 on the cell surface. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 6650–6660.
- Wooldridge, L., Scriba, T.J., Milicic, A., Laugel, B., Gostick, E., Price, D.A., Phillips, R.E., and Sewell, A.K. (2006). Anti-coreceptor antibodies profoundly affect staining with peptide-MHC class I and class II tetramers. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1847–1855.
- Wooldridge, L., Lissina, A., Cole, D.K., van den Berg, H.A., Price, D.A., and Sewell, A.K. (2009). Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. *Immunology* *126*, 147–164.
- Wooldridge, L., Ekeruche-Makinde, J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Miles, J.J., Tan, M.P., Dolton, G., Clement, M., Llewellyn-Lacey, S., Price, D.A., et al. (2012). A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J. Biol. Chem.* *287*, 1168–1177.
- Worth, A., Thrasher, A.J., and Gaspar, H.B. (2006). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br. J. Haematol.* *133*, 124–140.
- Wright, J.A., Hood, L., and Concannon, P. (1991). Human T-cell receptor V alpha gene polymorphism. *Hum. Immunol.* *32*, 277–283.
- Xu, H., Montgomery, S.P., Preston, E.H., Tadaki, D.K., Hale, D.A., Harlan, D.M., and Kirk, A.D. (2003). Studies investigating pretransplant donor-specific blood transfusion, rapamycin, and the CD154-specific antibody IDEC-131 in a nonhuman primate model of skin allotransplantation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 2776–2782.
- Xystrakis, E., Cavailles, P., Dejean, A.S., Cautain, B., Colacios, C., Lagrange, D., van de Gaar, M.-J., Bernard, I., Gonzalez-Dunia, D., Damoiseaux, J., et al. (2004a). Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 3140–3147.
- Xystrakis, E., Bernard, I., Dejean, A.S., Alsaati, T., Druet, P., and Saoudi, A. (2004b). Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *Eur. J. Immunol.* *34*, 408–417.
- Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. (2004c). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* *104*, 3294–3301.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* *209*, 1713–1722, S1–19.

- Yamashita, K., Ollinger, R., McDaid, J., Sakahama, H., Wang, H., Tyagi, S., Csizmadia, E., Smith, N.R., Soares, M.P., and Bach, F.H. (2006). Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 776–778.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Tsubata, T., and Tedder, T.F. (2009). The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 7459–7472.
- Yang, M., Rui, K., Wang, S., and Lu, L. (2013). Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell. Mol. Immunol.* *10*, 122–132.
- Yin, H., Li, X.-Y., Jin, X.-B., Zhang, B.-B., Gong, Q., Yang, H., Zheng, F., Gong, F.-L., and Zhu, J.-Y. (2010). IL-33 prolongs murine cardiac allograft survival through induction of TH2-type immune deviation. *Transplantation* *89*, 1189–1197.
- Yokosuka, T., Takase, K., Suzuki, M., Nakagawa, Y., Taki, S., Takahashi, H., Fujisawa, T., Arase, H., and Saito, T. (2002). Predominant role of T cell receptor (TCR)-alpha chain in forming preimmune TCR repertoire revealed by clonal TCR reconstitution system. *J. Exp. Med.* *195*, 991–1001.
- Yu, Y., Zitzner, J.R., Houlihan, J., Herrera, N., Xu, L., Miller, J., Mathew, J.M., Tambur, A.R., and Luo, X. (2011). Common gamma chain cytokines promote rapid in vitro expansion of allo-specific human CD8+ suppressor T cells. *Plos One* *6*, e28948.
- Yuan, X., Paez-Cortez, J., Schmitt-Knosalla, I., D’Addio, F., Mfarrej, B., Donnarumma, M., Habicht, A., Clarkson, M.R., Iacomini, J., Glimcher, L.H., et al. (2008). A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J. Exp. Med.* *205*, 3133–3144.
- Zang, W., and Murphy, B. (2005). Peptide-mediated immunosuppression. *Am. J. Ther.* *12*, 592–599.
- Zehn, D., Lee, S.Y., and Bevan, M.J. (2009). Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* *458*, 211–214.
- Zeng, L., Sullivan, L.C., Vivian, J.P., Walpole, N.G., Harpur, C.M., Rossjohn, J., Clements, C.S., and Brooks, A.G. (2012). A structural basis for antigen presentation by the MHC class Ib molecule, Qa-1b. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 302–310.
- Zhai, Y., Meng, L., Gao, F., Busuttil, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002). Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 4667–4673.
- Zhai, Y., Meng, L., Gao, F., Wang, Y., Busuttil, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2006). CD4+ T Regulatory Cell Induction and Function in Transplant Recipients after CD154 Blockade Is TLR4 Independent. *J. Immunol.* *176*, 5988–5994.
- Zhang, Q., and Reed, E.F. (2010). Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 682–688.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* *89*, 587–596.
- Zheng, J., Liu, Y., Liu, Y., Liu, M., Xiang, Z., Lam, K.-T., Lewis, D.B., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2013). Human CD8+ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. *Sci. Transl. Med.* *5*, 168ra9.
- Zimmerer, J.M., Horne, P.H., Fiessinger, L.A., Fisher, M.G., Pham, T.A., Saklayan, S.L., and Bumgardner, G.L. (2012). Cytotoxic effector function of CD4-independent, CD8(+) T cells is mediated by TNF- α /TNFR. *Transplantation* *94*, 1103–1110.
- Zuklys, S., Balciunaite, G., Agarwal, A., Fasler-Kan, E., Palmer, E., and Holländer, G.A. (2000). Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-

polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *165*, 1976–1983.

ANNEXES

Article II

La Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin induit la survie à long terme de l'allogreffe par l'induction de lymphocytes B régulateurs

Severine Bézie, Elodie Picarda, Laurent Tesson, Karine Renaudin, Justine Durand, Emmanuel Mérieau, Elise Chiffolleau, Carole Guillonneau, Lise Caron and Ignacio Anegon.

Article en révision dans *American Journal of Transplantation*.

Titre original : Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin induces longterm allograft survival through regulatory B cells.

American Journal of Transplantation

American Journal of
Transplantation**Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin induces long-term allograft survival through regulatory B cells.**

Journal:	<i>American Journal of Transplantation</i>
Manuscript ID:	AJT-O-13-01075
Wiley - Manuscript type:	O - Original Article
Date Submitted by the Author:	19-Aug-2013
Complete List of Authors:	Bézie, Séverine; INSERM U1064, Picarda, Elodie Tesson, Laurent Renaudin, Karine Durand, Justine Meriau, Emmanuel Chiffolleau, Elise Guillonneau, Carole Caron, Lise Anegon, Ignacio
Keywords:	regulatory lymphocytes, cytokines, tolerance, transplantation

SCHOLARONE™
Manuscripts

ScholarOne support: (434) 964 4100

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibronectin induces long-term
allograft survival through regulatory B cells.**

Séverine Bézie*, Elodie Picarda*, Laurent Tesson*, Karine Renaudin‡, Justine Durand*,

Emmanuel Meriau*, Elise Chiffolleau*, Carole Guillonneau*, Lise Caron*§, Ignacio

Anegon*§

*INSERM UMR 1064-ITUN, 30, boulevard Jean Monnet, 44093, Centre Hospitalier

Universitaire de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

‡Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Faculté de Médecine, 1, rue Gaston Veil

44035 Nantes Cedex 1 France

§ both senior and corresponding authors. INSERM 1064, 30 Boulevard Jean Monnet,

44093 Nantes, Cedex 1, France. • Ignacio.Anegon@inserm.fr. Fax: 33240087411.

Telephone: 33240087415

Running title: FGL2 induces allograft survival via B cells

Keywords. Regulatory cells, cytokines, tolerance, transplantation.

Abbreviations : **AAV**, adenovirus-associated virus ; **Ab**, antibody ; **BMDC**, bone marrow derived DC; **CFSE**, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester ; **DC**, dendritic cell ; **EDTA**, ethylenediamine tetraacetic acid ; **FACS**, fluorescence activated cell sorter ; **GFP**, green fluorescent protein ; **IDO**, indoleamine 2,3 dioxygenase ; **IFN**, interferon; **MLR**,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

mixed lymphocyte reaction ; **PCR**, polymerase chain reaction ; **pDC**, plasmacytoid DC ;

Th, T helper [cell] (Th1, Th2) ; **Treg**, regulatory T cell.

IN SUBMISSION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin has been previously described as being produced by CD4⁺ Tregs. In a rat model of heart transplantation tolerance dependent on CD8⁺ Tregs, we recently showed that these cells over-express FGL2. In the present manuscript we show that *in vivo*, over-expression of FGL2 through gene transfer without any further treatment resulted in inhibition of allograft rejection. Adoptive cell transfer of splenocytes from FGL2-treated rats with long-term survival (> 100 days) inhibited acute and chronic rejection in a donor-specific and transferable tolerance manner, since iterative adoptive transfer up to a sixth consecutive recipient resulted in transplantation tolerance. Adoptive cell transfer also efficiently inhibited anti-donor antibody production. Analysis of all possible cell populations among splenocytes revealed that B lymphocytes were sufficient for this adoptive cell tolerance. These B cells were also capable of inhibiting the proliferation of CD4⁺ T cells in response to allogeneic stimuli. This is the first description of regulatory B cells generated by FGL2 and capable of inducing transferable and dominant tolerance.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Different types of T cells, B cells and DCs have immunosuppressive properties (1–3). Understanding the generation and function of these cells could help to find new specific immunosuppressive strategies to avoid long-term exposure to broad spectrum immunosuppressive treatments.

In a model of cardiac allotransplantation in rats, we have previously shown that blocking CD40-CD40L by treatment with CD40Ig induces long-term graft survival (4) through generation of alloantigen-specific CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells (CD8⁺ Tregs) (5). CD40Ig is composed by the extracellular portion of CD40 fused to the Fc portion of an immunoglobulin (4). CD40Ig is produced in vivo following gene transfer with an adenoviral vector encoding for CD40Ig (AdCD40Ig) into the cardiac graft (4,5). Suppressive CD8⁺CD45RC^{low} Tregs with the same phenotype are also found in humans (6). Other phenotypic markers of subpopulations of rat CD8⁺CD45RC^{low} Tregs are MHC II, CD62L and CD28 whereas they were mostly Foxp3⁻, CD122⁻, CD11c⁻, CD103⁻ (5). Rat CD8⁺ Tregs were capable of transferring transplantation tolerance through IFN γ production, which induces IDO in different cell types (5). Nevertheless, other mechanisms are also active and in general little is known about the mechanisms and molecules involved in the function of these or other CD8⁺ Tregs (7).

Transcriptomic comparison of CD8⁺ Tregs from rats treated with CD40Ig vs. naïve rats, revealed fibrinogen-like protein 2/fibroleukin (FGL2) over-expression (8). Some studies have shown that cell membrane-associated FGL2 has a prothrombinase activity involved in acute graft rejection expressed by the graft (9,10). In contrast, several studies have also shown that soluble FGL2 has immunosuppressive functions, such as that mediated by

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (11–13). FGL2 protein administration prolongs skin allograft survival (14). In the rat, we have shown that FGL2 is involved in CD8⁺ Treg suppression of *in vitro* CD4⁺ T cell responses (8). Nevertheless, the significance of FGL2 in this rat cardiac allograft survival *in vivo* and in a more general way in allotransplantation remains to be determined.

In this work we show that *in vivo* FGL2 expression through gene transfer results in inhibition of allograft rejection and generation of regulatory B cells (Bregs) capable of iterative transfer of allograft tolerance.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Cardiac transplantation models.

Heart allotransplantation was performed between MHC incompatible male LEW.1W (donors, haplotype RT1u) and LEW.1A (recipients, haplotype RT1a) rats as previously described (5). Briefly, LEW.1W hearts were grafted in the abdomen of LEW.1A recipients. Third-party grafts were from the Brown-Norway strain (haplotype RT1n). Information on gene transfer with AdCD40Ig in the supplementary section.

Quantitative RT-PCR. Described in the supplementary section.

Monoclonal antibodies and flow cytometry. Described in the supplementary section.

Generation of a polyclonal rat FGL2 antibody. Described in the supplementary section.

AAV generation and gene transfer. Described in the supplementary section.

Mixed lymphocyte reaction. Naïve Lewis 1A CD4⁺CD25⁻ T cells, Lewis 1W cDCs and pDC, as well as AdCD40Ig-treated Lewis 1A CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were sorted as previously described (5,8) (**gating strategies in supplementary data 1A**). MLR conditions described in the supplementary section.

Proliferation of CFSE-labelled CD4⁺CD25⁻ T cells was analyzed by flow cytometry 6 days later, by gating on TCR⁺CD4⁺ cells (R7/3-APC, OX35-PECY7) among live cells (DAPI negative) (**supplementary data 1B**).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Donor specific alloantibody quantification. Described in the supplementary section.

Adoptive cell transfer.

Spleens were digested by collagenase D for 15 minutes at 37°C, stopped with 400 µl of 0.1 mM EDTA, and red cells were lysed. Splenocytes were sorted as previously described (5,8) (and as outlined in supplementary data 1A) by FACS Aria (BD Biosciences, Mountain View, CA) by gating on TCRαβ-APC (R7/3) and TCRγδ-FITC (V65), CD8⁺CD45RC^{low} T cells (OX8, OX22), pDC (85C7), or CD45RA-biotin-Streptavidin-PE-Cy7 (OX33) positive cells. The purity of the sorted populations was greater than 99%. Total splenocytes (10⁸ cells) and FACS Aria-sorted CD45RA⁺ B cells or T cells (equivalent numbers of B or T cells obtained each from 10⁸ splenocytes from the same donor), CD8⁺CD45RC^{low} (5.10⁶ cells), or pDC (1.10⁶ cells) were adoptively transferred *i.v.* the day before transplantation into naïve LEW-1A recipients that had received 4.5 Gy of whole-body irradiation the same day.

B CD45RA⁺ cell differentiation.

CD45RA⁺ cells from naïve Lewis 1A spleens were sorted by FACS Aria and incubated for 24h at 37°C with or without FGL2-GST recombinant protein and 1µg/ml CpG ODN 2006.

Statistical analysis.

The One-Way ANOVA Kruskal Wallis test and Dunn's post-tests were used for analysis of coculture experiments, the Mann Whitney test for PCR analysis, the Two-Way ANOVA test and Bonferroni post tests were used for donor-specific antibody analysis and splenocyte phenotype characterization, and the Mantel Cox test was used to analyze survival curves.

RESULTS**FGL2 involvement in AdCD40Ig-mediated long-term cardiac graft survival and in MLR cultures.**

Blocking CD40-CD40L interactions with CD40Ig by gene transfer with AdCD40Ig results in long term cardiac allograft survival through the generation of CD8⁺ Tregs (4,5). These CD8⁺ Tregs suppressed CD4⁺ allogeneic responses *in vitro* at least partially through the production of FGL2 (8). To confirm the *in vivo* involvement of FGL2 in CD8⁺ Treg-mediated suppression, we studied FGL2 expression in the cardiac graft, where CD8⁺ Tregs are recruited and exert their effects (8). During the first days following transplantation, a significant increase in *Fgl2* transcript was detected in the graft of AdCD40Ig-treated versus Add1324-treated rejecting and non-grafted naïve rats, which returned to baseline levels in long-term surviving grafts (> 120 d) (**Fig. 1A**). These kinetics correlated with the accumulation of CD8⁺ Tregs in the cardiac graft during the first week followed by their migration towards the spleen during the first month, as previously described (8). In contrast, *Fgl2* transcript levels in the spleen were comparable in all groups of animals (**data not shown**).

FGL2 production can be induced by IFN γ -stimulation (15,16) and CD8⁺ Tregs produce IFN γ (5). To study the relationship between these two molecules, we analyzed FGL2 production by CD8⁺ Tregs cocultured with CD4⁺ T cells and allogeneic pDCs, with or without an anti-IFN γ -blocking Ab. CD8⁺ Tregs were isolated by cell sorting as previously described (8,17) and analyzed for FGL2 expression (**supplementary figure 1A and B**). pDCs were used because we found that CD8⁺ Tregs were activated optimally by pDCs and vs. myeloid DCs (8). The percentage of CD8⁺ Tregs expressing FGL2 in the

1
2
3 presence of IFN γ -blocking mAb vs. control cultures was decreased 60% (**Fig. 1B**). This
4
5 argues in favor of an IFN γ -dependent FGL2-induction pathway in CD8⁺ Tregs.

6
7 To further explore the role of FGL2, we produced a polyclonal Ab against rat FGL2 that,
8
9 when included in the allogeneic MLR, significantly abrogated CD8⁺ Treg-mediated
10
11 suppression of CD4⁺ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs whereas it had
12
13 no effect on CD4⁺ T cell proliferation in the absence of CD8⁺ Tregs (**Fig. 1C**).

14
15 To confirm the suppressive functions of FGL2 in an MLR, we cocultured effector
16
17 CD4⁺CD25⁺Tcells as responder cells, with allogeneic pDCs as stimulator cells, in the
18
19 presence of a range of recombinant human FGL2 concentrations. Analysis of CFSE-
20
21 labeled CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation showed a dose-dependent inhibition of
22
23 proliferation by human FGL2 (**Fig. 1D**) at relatively high concentrations but since FGL2
24
25 was of human origin, affinity for rat FGL2 receptors could be not optimal. CD8⁺ Tregs
26
27 were used as a positive control for suppression of CD4⁺ cells and showed higher
28
29 suppression than for FGL2 (**Fig. 1D**) that could be due to optimal rat FGL2-mediated
30
31 suppression and to the production by CD8⁺ Treg of other suppressive factors.

32
33 FGL2 has been described to deliver inhibitory signals to bone marrow-derived myeloid
34
35 DCs by binding to Fc γ RIIB (14,18). Using an anti-rat Fc γ RIIB mAb we observed, by
36
37 both FACS (**Fig. 1E**) and confocal analysis (**data not shown**), that rat pDCs express
38
39 Fc γ RIIB. Unfortunately, rat knockout for Fc γ RIIB are not available.

40
41 When FGL2 was incubated with pDCs or CD4⁺ responder T cells 1h prior to a MLR and
42
43 washed, or with both cell types during the MLR, we observed inhibition of CD4⁺ T cell
44
45 proliferation only when FGL2 was present during the MLR (**Fig. 1F**). These results
46
47 indicate that the suppressive effect of FGL2 on CD4⁺ T cells requires the presence of
48
49 pDCs during the whole MLR assay and not just a short pulse previous to the assay.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Thus, FGL2 produced by CD8⁺ Tregs suppressed allogeneic CD4⁺ responses in vitro and
4
5 suggested that FGL2 could have tolerogenic effects in vivo that could mediate the long-
6
7 term allograft survival by CD8⁺ Tregs.
8
9

10 11 12 **FGL2 induces long-term cardiac graft survival.**

13
14 To test whether FGL2 could induce long-term cardiac allograft survival, we used an
15
16 AAV recombinant vector encoding for the cDNA of rat FGL2 (AAV-FGL2) to
17
18 overexpress FGL2 in vivo. We first confirmed the expression of the FGL2-recombinant
19
20 plasmid (pFGL2), used afterwards to generate AAV-FGL2. FGL2 secretion in cell
21
22 supernatants from transfected cells was detected by western blot using the anti-rat FGL2
23
24 antibody and by FACS (**supplementary data 2 A, B, and C**). FGL2 expression was then
25
26 confirmed in AAV-FGL2 transduced cells by quantitative RT-PCR and FACS analysis
27
28 (**supplementary data 2 D and E**).
29
30
31

32
33 To analyze the tolerogenic effect of FGL2 *in vivo*, untreated allograft recipients received
34
35 AAV-FGL2 either by intravenous injection 30 days before the cardiac allograft, since we
36
37 and others have shown maximal expression levels of sequences vectorized by AAV
38
39 vectors around this time point with long lasting expression thereafter (19,20).
40
41 Quantification of serum FGL2 was not possible despite considerable efforts since the
42
43 commercially available monoclonal antibody against human and rat FGL2 and the rabbit
44
45 anti-rat FGL2 antibody we developed were not suitable for a sensitive FGL2 detection in
46
47 serum (only detecting > 110 µg/ml, data not shown). Intravenous injection of AAV-FGL2
48
49 resulted in a significant prolongation of graft survival vs. untreated, non-coding AAV-
50
51 treated or AAV-GFP-treated recipients, with 38% of animals presenting long-term (>100
52
53 days) surviving grafts (**Fig. 2**). FGL2 has been shown to moderately prolong allograft
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 survival in mice (14) but our results indicate that it can also generate tolerogenic
4
5 mechanisms robust enough to induce long-term allograft survival.
6
7
8
9

10
11 **FGL2 induces splenic tolerogenic cells capable of transferable and dominant**
12 **allogeneic graft acceptance.**
13

14
15 To determine whether FGL2 over-expression resulted in the generation of a tolerogenic
16 cell population, splenocytes from AAV-FGL2-treated rats with long-term surviving
17 allografts were transferred to minimally irradiated recipients, the day before the
18 transplant. This resulted in long-term graft survival for all recipient animals, contrary to
19 those that received cells from non-treated rats (Fig. 3). Moreover, splenocytes from these
20 adoptively transferred tolerant recipients were again capable of transferring tolerance for
21 at least six cycles of splenocyte transfer resulting in long-term graft survival between
22 66% and 100% of grafted hearts, respectively (Fig. 3). Adoptive transfer of long-term
23 allograft survival was donor-specific since hearts of Brown-Norway third-party origin
24 were rejected. Thus, splenocytes from FGL2-treated rats contained a cell population
25 capable of inducing transferable and dominant tolerance in a donor-specific manner.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **Alloantibody levels and tissue graft analysis**
46

47 We further analyze the immune mechanisms underlying long-term allograft survival by
48 FGL2 treatment and transfer of tolerogenic splenocytes. Alloantibody levels of the IgG1,
49 IgG2a and IgG2b isotypes were all drastically reduced in AAV-FGL2-treated recipients
50 with long-term surviving grafts vs. AAVGFP-treated rats controls and also vs. animals
51 that rejected their grafts in less than 30 days (Fig. 4). Recipients with adoptively
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 transferred splenocytes showed a further decrease in alloantibody levels, including IgG1,
3 IgG2a or IgG2b, resulting in levels significantly lower than those of AAV-FGL2-treated
4 rats and comparable to those of naïve animals (**Fig. 4**). This indicates that FGL2
5 treatment and the tolerogenic cells generated by FGL2 globally inhibited anti-donor
6 immune responses without a preferential Th1 or Th2 switch (IgG2b or IgG2a and IgG1,
7 respectively) (21).
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 **FGL2 induces regulatory B cells**

21 In order to identify the cell populations involved in transferable and dominant tolerance,
22 we first analyzed the phenotype of FGL2-treated and transferred splenocytes vs.
23 splenocytes from naïve animals. No statistically significant changes were seen among
24 CD4⁺ T, CD8⁺ T, CD8⁺CD45RC^{low} T, CD8⁺CD45RC^{high} T, CD45RA⁺ B cells, or pDCs
25 (supplementary data 3A). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells were also comparable
26 (supplementary data 3B).
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 We then purified different spleen cell populations and performed adoptive transfer.
37 Transfer of TCR⁺ or CD8⁺CD45RC^{low} T as well as pDCs did not delay acute rejection
38 (median 20 days) (**Fig. 5 A**). In view of these results, we analyzed the tolerogenic
39 potential of B cells *in vivo*. B cells represent 40% of splenocytes and some populations of
40 regulatory B cells have been recently identified in mice and humans (2). We did not
41 observe any increase in the number of CD45RA⁺ B cells in spleens from recipients with
42 long term graft survival treated with FGL2-AAV (**supplementary figure 3A**).
43 Nevertheless, a phenotypic analysis of graft cells isolated from splenocyte-transferred
44 recipients highlighted an infiltration by CD45RA⁺ B cells 100 days post transplantation
45 (**data not shown**). CD45RA⁺ B cells from adoptively transferred rats with long-term
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

surviving grafts were sorted by FACS Aria (**supplementary data 3C and D**) and transferred to naïve rats one day before transplantation. This resulted in a long-term graft survival whereas CD45RA⁺ B cells from naïve non-transplanted rats did not have an effect (**Fig. 5 A**). This supports the involvement of B cells in this transferable and dominant tolerance phenomenon initiated by FGL2 treatment.

The suppressive properties of B cells from splenocyte-transferred tolerating rats were also tested *in vitro*. In MLR experiments, CD45RA⁺ B cells isolated from rats with long-term surviving grafts inhibited CD4⁺ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs or anti-CD3-induced proliferation, unlike CD45RA⁺ B cells from naïve rats (**Fig. 5 B and C**).

We phenotypically characterized the CD45RA⁺ B cells that were used for adoptive transfers. CD45RA⁺ cells had a decrease in the proportion of follicular B cells (IgM⁺IgD⁺) due to an increase in transitional T1 population (IgM⁺IgD⁻) but also in istotype-switched cells (IgM⁻IgD⁻) (**Fig. 5 D**). These CD45RA⁺ B cells expressed FcγRIIB, suggesting a possible responsiveness to FGL2 (**Fig 5 E**). The few studies reporting FGL2 interaction with B cells described apoptosis induction (14,18). We incubated naïve B cells in the absence or presence of CpG as an activator of B cells and in the presence or absence of FGL2 protein for 24 hours and observed no apoptosis or modification in phenotype (**supplementary data 4A**).

We further analyzed the phenotype of the tolerogenic CD45RA⁺ cells *in vivo*. Following the transfer of tolerogenic CD45RA⁺ cells, a large proportion (31.5 %) of cells observed within the grafts were CD45RA⁺ whereas CD45RA⁺ cells were barely detectable in syngeneic grafts (**Fig. 5 F**). Whereas tolerogenic B cells were rather immature before injection, the CD45RA⁺ cells infiltrating the graft expressed a more mature phenotype in

1
2
3 B-cell transferred recipients, since 60.1 ± 11.2 % of graft $CD45RA^+$ cells had switched
4 from an IgM and IgD isotype to other isotypes ($CD45RA^+IgM^+IgD^-$) vs. 8.6 ± 0.8 % in
5 the spleen. Consequently, only 13.6 ± 6.4 % of $CD45RA^+$ cells showed a follicular
6 maturation status ($CD45RA^+IgM^{high}IgD^{low}$) in the graft vs. 55.8 ± 2.6 % in the spleen
7 (**Fig. 5 G**). Correlating with these results, CD24, a marker of transitional immature B
8 cells, was less expressed by $CD45RA^+$ graft infiltrating cells as compared with splenic B
9 cells from the spleens of both adoptively-transferred recipients and control naïve
10 splenocytes, whereas the maturation marker CD27 tended to be increased in the graft
11 cells, albeit without significance, and CD5 was roughly comparable (**Fig. 5 H**). The
12 percentage of $CD45RA^+$ B cells from naïve or B-cell transferred tolerant recipients
13 expressing FGL2 or IL-10 were comparable (**Fig. 5 H**), as well as IL10, IFN γ and TNF α
14 secretion in MLR supernatant (**supplementary data 4B**).

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 Altogether, these results support the view of FGL2 as being a tolerogenic molecule that
34 favors the emergence of regulatory B cells.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

In this manuscript we describe, for the first time, the capacity of FGL2 to induce long-term allograft survival through active cellular tolerogenic mechanisms. This tolerogenic effect was mainly mediated by Bregs but included actions on pDCs and on CD4⁺ T cells (integrated view of this model in Fig. 6).

FGL2 has a dual prothrombinase and immunoregulatory activity, depending on its expression at the cell membrane or as a secretory molecule, respectively. FGL2 prothrombinase activity has been postulated to directly convert prothrombin to thrombin (22,23). The cell membrane expression of FGL2 by cells of affected organs favors fibrin deposition in cardiac allografts (9) and xenografts (10,24), viral hepatitis (25) and arthritis (26). FGL2 also exists as a secretory molecule with immunoregulatory activity (14,18,27). In transplantation, administration of soluble FGL2 was shown to double skin allograft survival but did not result in long-term survival (14). Recently, FGL2 together with Foxp3 and killer cell lectin-like receptor G1, were shown to be over-expressed in models of liver and cardiac transplantation tolerance (28). Mice deficient in FGL2 develop autoimmune glomerulonephritis (18). FGL2 has been shown to be expressed by mouse CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (11,12) and CD8⁺ $\alpha\alpha$ suppressive intraepithelial T cells (29). FGL2 was also found to inhibit LPS-induced maturation of mouse myeloid BMDCs (27). Contrary to these results, FGL2-deficient mice rejected cardiac and skin allografts with identical timing to controls and also showed normal immune responses to microorganisms inducing a type 1 response (16).

Increased *Fgl2* mRNA expression during the first days following transplantation in the grafts of AdCD40Ig-treated rats correlates with graft infiltration by FGL2-overexpressing CD8⁺ Tregs (8). Since not all animals treated with AAV-FGL2 developed long-term surviving grafts, it is likely that the gene transfer system used is not optimal and that

1
2 therefore other gene transfer vectors or direct protein administrations should be used.

3
4 This would also demand to develop an ELISA method to quantify FGL2 in serum.

5
6
7
8 Bregs have been described in autoimmunity, cancer and transplantation (30). In
9
10 transplantation, Bregs have been described in a mouse model treated with anti-CD45RB
11
12 alone (31) or in combination with anti-TIM-1 antibody (32) and in a rat model treated
13
14 with an analogue of the immunosuppressor deoxyspergualin (33). The possibility of Bregs
15
16 has been suggested in spontaneously tolerant kidney transplant patients (34,35). Although
17
18 Bregs have been shown to transfer transplant tolerance (32,33), we show here the
19
20 capacity of Bregs to induce repeated transferable and dominant tolerance. This
21
22 phenomenon is similar to infectious tolerance, usually through induction of tolerogenic
23
24 DCs that will tolerize new naïve T cells (36) and until now described for CD4⁺ (37) and
25
26 CD8⁺ Tregs (5). Bregs mediate their effects by a variety of mechanisms, including IL-10
27
28 TGFbeta and FasL (30) and are generated by a variety of stimulation protocols and this
29
30 variability may explain the differences in phenotype and suppressive mechanisms exerted
31
32 by Bregs (30). Bregs from autoimmune models express markers of marginal zone and
33
34 transitional 2 precursors (30,38). Other models, such as *Salmonella* infection, have shown
35
36 a mature phenotype (39). Some transplantation models have described Bregs as mature
37
38 cells that are blocked in their differentiation (33,40). In general, Bregs do not display a
39
40 phenotype of naïve follicular B cells (IgM⁺IgD⁺). Due to the lack of antibodies against
41
42 useful markers (like CD1, CD21, CD23, CD38, CD138 and IL-10) to define the
43
44 maturation of B cells in the rat, it is not possible to directly compare rat B cells with their
45
46 human or mouse counterparts. Nevertheless, the available markers showed that in our
47
48 model, B cells among splenocytes capable of transferring long-term allograft survival
49
50 showed significantly fewer naïve follicular B cells with a concomitant increase in both
51
52 transitional and isotype-switched B cells. In B cell-transferred recipients, the B cells in
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 the graft had a higher proportion of isotype-switched cells vs. the spleen and a lower
4
5 proportion of transitional CD24⁺ cells. The proportion of CD5⁺ Bregs was not higher than
6
7 in controls but differently to mice, the rat does not have CD5⁺ B1a cells (41). In our
8
9 model, Bregs accumulated in the graft and displayed a mature phenotype. Only a few
10
11 previous studies have detected Bregs at the site of inflammation in various models,
12
13 mainly those of lupus and autoimmune colitis in mice (42,43).
14
15

16
17 FcγRIIB is one of the receptors of FGL2, albeit the existence of others is not excluded
18
19 (14,18). FcγRIIB was reported as a marker of tolerance in patients with a Breg signature
20
21 (34,35). Moreover, a very recent manuscript described Bregs that have, as a prominent
22
23 feature, high expression of FcγRIIB (44). Since both pDCs and B cells express FcγRIIB,
24
25 the emergence of Bregs by FGL2 could have been the consequence of an indirect effect
26
27 on B cells through pDCs and/or a direct effect on B cells (**Fig. 6**). Our present results
28
29 showing that FGL2 inhibited CD4⁺ effector cells in the presence of pDCs as well as the
30
31 transferable and dominant tolerance and previous reports on the effect of FGL2 on
32
33 myeloid DCs (14,18,27) suggest that at least pDCs may act upstream on the induction of
34
35 Bregs by FGL2.
36
37
38

39
40 The mechanisms by which mouse or human Bregs inhibit T cell responses include the
41
42 generation of CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs (45–47) or other types of Tregs (42), as well as a direct
43
44 effect on CD4⁺ T cells (**Fig. 6**) and our results suggest that CD8⁺ Treg may induce Bregs.
45
46 More experiments are needed to prove whether the Bregs in our model are actively
47
48 regulating through their action on DCs that in turn tolerize CD4⁺ T cells or directly
49
50 inhibiting CD4⁺ cells. Both mechanisms seem plausible since FGL2 not only inhibited
51
52 MLRs (in the presence of pDCs and CD4⁺ cells) and generated transferable and dominant
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

tolerance, but also inhibited proliferation of CD4⁺ T cells stimulated by anti-CD3 in the absence of pDCs.

CD40 signaling has been shown to be important for Breg development (30,31). It is therefore possible that in our original model of allograft tolerance induced by blockade of CD40 signaling through treatment with CD40Ig, the emergence of CD8⁺ Tregs producing FGL2 was promoted (8) but not of Bregs (4). In CD40Ig-treated recipients, FGL2 likely promoted allograft tolerance through inhibition of CD4⁺ T cells. In FGL2-treated recipients in the presence of intact CD40 signaling, the immunoregulatory effects of FGL2 were likely both, inhibition of CD4⁺ T cells and promotion of Bregs.

The role of BCR signaling in Breg generation has been suggested in some studies but has not yet been formally proven (30). Lost of Breg function with conserved antibody production has been described in a mouse EAE model (48). Analogously, Breg function in the anti-CD45RB transplantation tolerance model in mice was independent of antibody production (31). Our results showing donor-specific suppression suggest that BCR recognition of donor antigens could be involved. Since alloantibody production was inhibited, it is possible that signaling through the BCR was modified by FGL2-mediated of FcγRIIB with decrease alloantibody production and simultaneous production of immunosuppressive molecules.

In our model, CD8⁺ Tregs were a source of FGL2 but since CD4⁺ Tregs also produce FGL2 (11), it is possible that Bregs may be induced in other models of transplantation tolerance through FGL2. The induction of Bregs by FGL2 is a new tolerogenic mechanism that underlines the emergence of Bregs as a tolerogenic cell population and has the potential to be used in the clinics either as a marker or as an inducer of tolerance.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments. This work was supported by a research fellowship from the French Transplantation Society and the Fondation Progreffe (to S. B.) as well as a grant from the Roche Organ Transplantation Research Foundation (to I.A.).

Disclosure. The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the American Journal of Transplantation

IN SUBMISSION

FIGURE LEGENDS**Figure 1. Analysis of FGL2 expression in vivo and analysis of its effects in MLR cultures.**

A) Increased *Fgl2* mRNA expression in grafts of AdCD40Ig-treated recipients. Grafts from AdCD40Ig-treated recipients were collected at day 5 (AdCD40Ig-D5 n=3) and day 120 (AdCD40Ig-D120 n=20) after transplantation and analyzed by quantitative RT-PCR, compared with grafts from Add1324-treated recipients (n=6) and non-treated-recipients (n=8) 5-days after transplantation, syngeneic grafts at day >120 (n=3), and hearts from naïve non grafted animals (n=8). Housekeeping gene: HPRT and reference: pool of 24 animals. Mann Whitney test *p* value *<0.1, **<0.01, ***<0.001.

B) The percentage CD8⁺ Tregs expressing FGL2 was analyzed by cytofluorimetry in CD8⁺ Tregs co-cultured with CD4⁺CD25⁻ T cells (50,000 cells/well) and allogeneic pDCs (12,500 cells/well) with a neutralizing anti-IFN γ mAb (DB1, black line) or isotype control (filled gray) (50 μ g/ml, n=7) at day 6 of culture, and normalized to isotype control. (Gating strategies to isolate CD8⁺CD45RC^{low} Tregs and analyze FGL2 expression in **supplementary data 1A and B**). Wilcoxon test *p*= 0.015. **C)** A rabbit anti-rat FGL2 Ab (100 μ g/ml) abrogates CD8⁺ Treg-mediated suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs (same culture conditions as above). Data are representative of 3 independent experiments performed in triplicate. **D)** Proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells in the presence of different concentrations of recombinant FGL2-GST was evaluated by CFSE dilution by gating first on DAPI⁺ live cells and then on TCR⁺CD4⁺ cells (**supplementary data 1B**). CD8⁺ Tregs from AdCD40Ig-treated rats (Tregs) were used as a positive control for suppression and the negative control was purified rat IgG at 10 μ g/ml. (n= 4, * *p*=0.01 and ****p*=0.0002). **E)** The FGL2-receptor

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fc γ RIIB was detected on permeabilized splenic pDCs by FACS (left; grey histogram isotype control and white histogram with anti-Fc γ RIIB MAb). F) pDC or CD4⁺T cells were incubated with FGL2-GST protein for 2 hours before being added to fresh CD4⁺T cells or pDC, respectively (left and middle histograms). Proliferation was also evaluated when FGL2 protein was added to the MLR with pDC and CD4⁺ T cells (right histograms). (n=6, Two-Way ANOVA, Bonferroni post test **p<0.01)

Figure 2. Over-expression of FGL2 *in vivo* prolongs cardiac graft survival

Cardiac graft recipients received intravenously 7.7×10^7 pi/rat of AAV-FGL2 (\blacktriangle n=8), AAV-GFP (\bullet n=5) or non coding AAV (\blacktriangledown n=5) and received a transplant 30 days later. Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. Log-rank (Mantel-Cox) test * $p < 0.05$ for AAV-FGL2 vs. controls.

Figure 3. Adoptive transfer of splenocytes from AAVFGL2-treated rats with long-term surviving grafts transfer donor alloantigen-specific long-term graft survival in an iterative way.

Splenocytes from tolerant AAV-FGL2-treated recipients were intravenously injected into minimally irradiated recipients (LEW.1A) the day before heart allotransplantation (LEW.1W). Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. Adoptive transfer of total splenocytes (10^8 cells) from rats with long-term surviving grafts (≥ 120 days) from AAV-FGL2-treated rats were adoptively transferred (1st-transferred, n=5), and then total splenocytes (10^8 cells) were iteratively transferred to 2nd- (n=6), 3rd (n=4), 4th (n=3), 5th (n=3) and 6th (n=3) LEW.1A recipients receiving LEW.1W hearts. Third-party grafts were from Brown-Norway origin (n=3). Splenocytes

1
2
3 from naïve non-transplanted rats did not inhibit acute rejection (n=5) and non-transferred
4 recipients also showed acute rejection (n=6). (Log-rank (Mantel-Cox) Test *p* value
5 ***<0.0001).
6
7
8
9

10
11
12
13 **Figure 4. AAV-FGL2 and adoptive transfer of splenocytes suppressed alloantibody**
14 **production.**
15

16
17
18 Sera were collected from naïve rats, or at the moment of rejection from rats treated with
19 AAV-GFP or AAV-FGL2 (rejecting at < 30 days or > 120 days after transplantation) or
20 receiving adoptive transfers (> 120 days after transplantation). Levels of donor-specific
21 IgG1, IgG2a, and IgG2b antibodies were evaluated by cytofluorimetry and normalized to
22 serum from naïve rats (MFI / MFI syngeneic). Two way Anova, Bonferroni post test *p*
23 value * <0.5 ; ** <0.01 ; ***<0.001.
24
25
26
27
28
29
30
31

32
33
34
35
36 **Figure 5. Adoptive transfer of B cells transfers tolerance.**
37

38 **A)** Graft recipients received different spleen cell populations as explained in legend of
39 figure 5. B cells (CD45RA⁺, n=3), T cells (TCR⁺, n=4), CD8⁺ Tregs (CD8⁺CD45RC^{low},
40 n=2), pDCs (mAb 85C7⁺ n=3) from the same splenocyte-transferred tolerant rats were
41 sorted by FACS Aria (**sorting strategy displayed in supplementary data 3C and D**)
42 and adoptively transferred to minimally irradiated recipients the day before the transplant.
43 Log-rank (Mantel-Cox) Test *p* <0.05* CD45RA⁺ from tolerant animals vs. CD45RA⁺
44 cells from naïve rats (n=2) and all other groups. **B)** Part of the transferred tolerogenic
45 CD45RA⁺ B cells were tested for inhibition of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ T cell
46 proliferation in response to allogeneic LEW.1W cDCs, or pDCs (stimulator/effector ratio
47 of 1:4) or anti-CD3 at day 6 of culture. Naïve CD45RA⁺ B cells n=3, tolerogenic
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 CD45RA⁺ B cells n=4. **C)** Representative histogram of one proliferation assay of
4 CD4⁺CD25⁻ T cells with allogeneic pDCs and CD45RA⁺ B cells from naïve (filled gray)
5 or splenocyte-transferred tolerant rats (black line). **D)** CD45RA⁺ B cells from the spleen
6 of adoptively transferred long-term recipients were analyzed for maturation (IgD, IgM
7 labeling) by FACS, compared with control rats (n=3) (follicular transferred vs. control, *p*
8 * <0.05) **E)** and for the Fc γ RIIB expression marker (representative histogram, n=4). **F)**
9 Grafts from tolerogenic B cell-transferred recipients (n=3) were analyzed for CD45RA⁺
10 cells presence as compared with syngeneic grafts. **G)** Graft-infiltrating and splenic
11 CD45RA⁺ cells from CD45RA⁺ B cell-transferred recipients were characterized for
12 maturation (IgD, IgM labeling) (isotype switched transferred vs. controls *p* *** <0.001
13 and follicular transferred vs. controls ***p* <0.01) and **H)** CD45RA⁺ B cells from
14 CD45RA⁺ B cell-transferred recipients were characterized for CD5, CD24, CD27, FGL2
15 and IL-10 expression markers by FACS in splenocytes and grafts from adoptively
16 transferred long-term recipients (> 100 d) and naïve control splenocytes. Two-Way
17 ANOVA with Bonferroni post-tests *p* * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 .

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39 **Figure 6. Integrated view of the actions of FGL2 in CD8⁺ Treg suppression of**
40 **allogeneic immune responses.**

41
42 Interpretation of data presented in this manuscript (plain arrows) and working hypothesis
43 (dotted arrows) for the effects of FGL2 produced by CD8⁺ Tregs or generated by gene
44 transfer. FGL2 binds to Fc γ RIIB receptors in pDCs and potentially in B cells and either
45 cell type inhibit CD4⁺ T cell alloproliferation and B cell production of alloantibodies.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Picarda E, Anegon I, Guillonneau C. T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy*. 2011;3:35-37.
2. Mauri C, Ehrenstein MR. The « short » history of regulatory B cells. *Trends Immunol*. 2008;29:34-40.
3. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev*. 2011;241:206-227.
4. Guillot C, Guillonneau C, Mathieu P, Gerdes CA, Ménoret S, Braudeau C, et al. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40lg results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol*. 2002;168:1600-1609.
5. Guillonneau C, Hill M, Hubert F-X, Chiffolleau E, Hervé C, Li X-L, et al. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*. 2007;117:1096-1106.
6. Ordonez L, Bernard I, L'faqihi-Olive F-E, Tervaert JWC, Damoiseaux J, Saoudi A. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS ONE*. 2009;4:e5287.
7. Guillonneau C, Picarda E, Anegon I. CD8+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010
8. Li XL, Ménoret S, Bezie S, Caron L, Chabannes D, Hill M, et al. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol*. 2010;185:823-833.
9. Ning Q, Sun Y, Han M, Zhang L, Zhu C, Zhang W, et al. Role of fibrinogen-like protein 2 prothrombinase/fibrinogen in experimental and human allograft rejection. *J Immunol*. 2005;174:7403-7411.
10. Ghanekar A, Mendicino M, Liu H, He W, Liu M, Zhong R, et al. Endothelial induction of fgl2 contributes to thrombosis during acute vascular xenograft rejection. *J Immunol*. 2004;172:5693-5701.
11. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2005;6:1142-1151.
12. Shalev I, Wong KM, Foerster K, Zhu Y, Chan C, Maknojia A, et al. The novel CD4+CD25+ regulatory T cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis. *Hepatology*. 2009;49:387-397.
13. Foerster K, Helmy A, Zhu Y, Khattar R, Adeyi OA, Wong KM, et al. The novel immunoregulatory molecule FGL2: a potential biomarker for severity of chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2010;53:608-615.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

14. Liu H, Shalev I, Manuel J, He W, Leung E, Crookshank J, et al. The FGL2-FcγRIIB pathway: a novel mechanism leading to immunosuppression. *Eur J Immunol.* 2008;38:3114-3126.
15. Liu M, Mendicino M, Ning Q, Ghanekar A, He W, McGilvray I, et al. Cytokine-induced hepatic apoptosis is dependent on FGL2/fibroleukin: the role of Sp1/Sp3 and STAT1/PU.1 composite cis elements. *J Immunol.* 2006;176:7028-7038.
16. Hancock WW, Szaba FM, Berggren KN, Parent MA, Mullarky IK, Pearl J, et al. Intact type 1 immunity and immune-associated coagulative responses in mice lacking IFN gamma-inducible fibrinogen-like protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:3005-3010.
17. Ménoret S, Guillonneau C, Bezié S, Caron L, Anegón I, Li X-L. Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T regulatory cells. *Methods Mol Biol.* 2011;677:63-83.
18. Shalev I, Liu H, Kosciak C, Bartczak A, Javadi M, Wong KM, et al. Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J Immunol.* 2008;180:249-260.
19. Toromanoff A, Chérel Y, Guilbaud M, Penaud-Budloo M, Snyder RO, Haskins ME, et al. Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther.* 2008;16:1291-1299.
20. Le Guiner C, Stieger K, Snyder RO, Rolling F, Moullier P. Immune responses to gene product of inducible promoters. *Curr Gene Ther.* 2007;7:334-346.
21. Brüggemann M, Teale C, Clark M, Bindon C, Waldmann H. A matched set of rat/mouse chimeric antibodies. Identification and biological properties of rat H chain constant regions mu, gamma 1, gamma 2a, gamma 2b, gamma 2c, epsilon, and alpha. *J Immunol.* 1989;142:3145-3150.
22. Schwartz BS, Levy GA, Fair DS, Edgington TS. Murine lymphoid procoagulant activity induced by bacterial lipopolysaccharide and immune complexes is a monocyte prothrombinase. *J Exp Med.* 1982;155:1464-1479.
23. Chan CWY, Chan MWC, Liu M, Fung L, Cole EH, Leibowitz JL, et al. Kinetic analysis of a unique direct prothrombinase, fgl2, and identification of a serine residue critical for the prothrombinase activity. *J Immunol.* 2002;168:5170-5177.
24. Mendicino M, Liu M, Ghanekar A, He W, Kosciak C, Shalev I, et al. Targeted deletion of Fgl-2/fibroleukin in the donor modulates immunologic response and acute vascular rejection in cardiac xenografts. *Circulation.* 2005;112:248-256.
25. Marsden PA, Ning Q, Fung LS, Luo X, Chen Y, Mendicino M, et al. The Fgl2/fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis. *J Clin Invest.* 2003;112:58-66.
26. Melnyk MC, Shalev I, Zhang J, Bartczak A, Gorczynski RM, Selzner N, et al. The prothrombinase activity of FGL2 contributes to the pathogenesis of experimental arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2011;40:269-278.

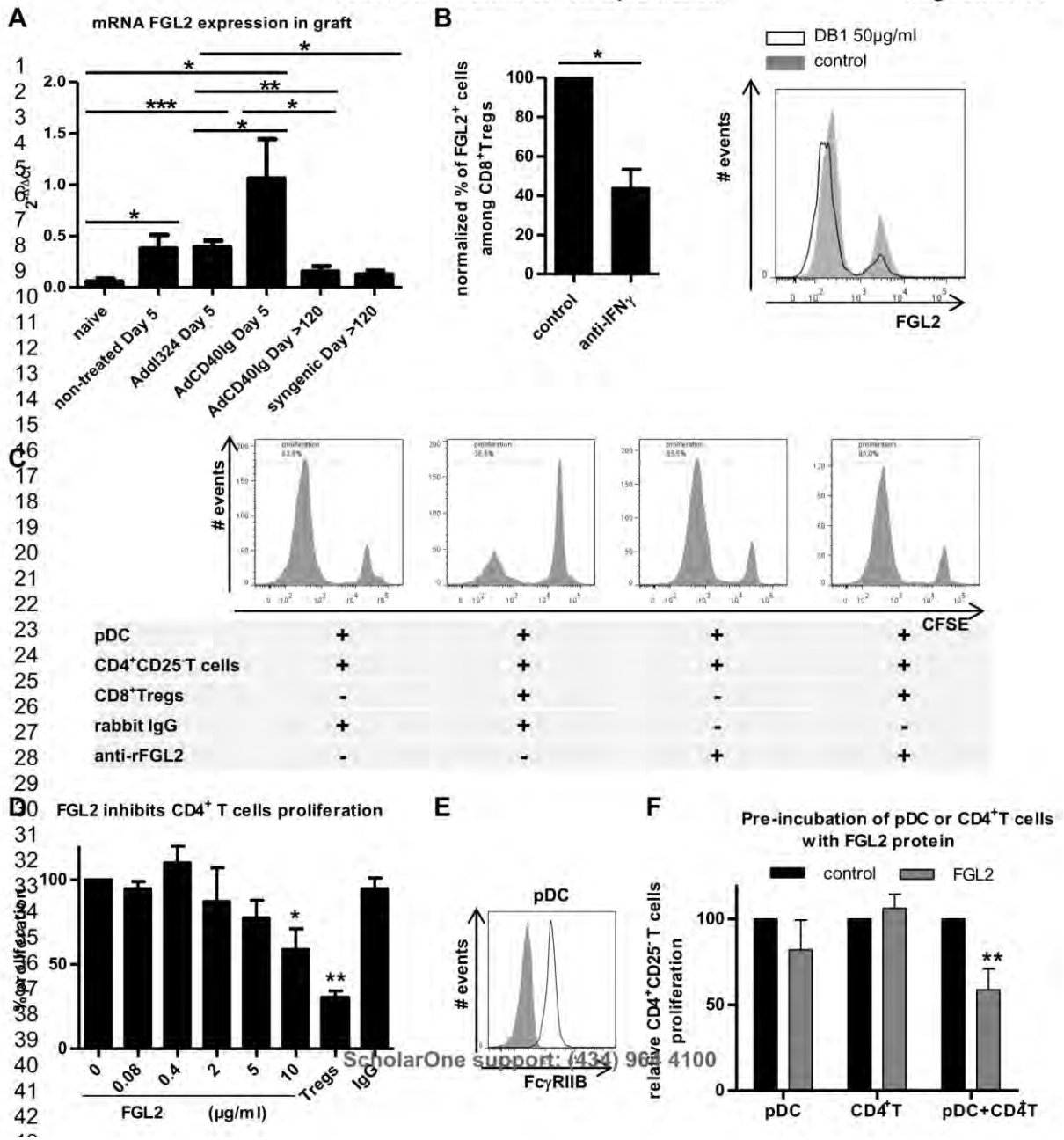
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

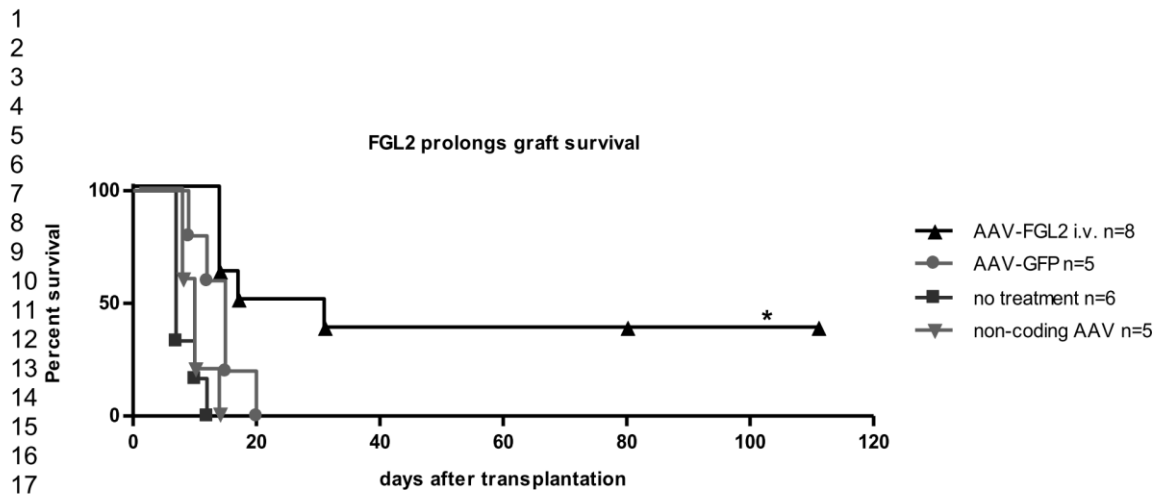
27. Chan CWY, Kay LS, Khadaroo RG, Chan MWC, Lakatoo S, Young KJ, et al. Soluble fibrinogen-like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:4036-4044.
28. Xie L, Ichimaru N, Morita M, Chen J, Zhu P, Wang J, et al. Identification of a novel biomarker gene set with sensitivity and specificity for distinguishing between allograft rejection and tolerance. *Liver Transpl.* 2012;18:444-454.
29. Denning TL, Granger SW, Granger S, Mucida D, Graddy R, Leclercq G, et al. Mouse TCRalpha+CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J Immunol.* 2007;178:4230-4239.
30. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-241.
31. Deng S, Moore DJ, Huang X, Lian M-M, Mohiuddin M, Velededeoglu E, et al. Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes. *J Immunol.* 2007;178:6028-6032.
32. Lee KM, Kim JJ, Stott R, Soohoo J, O'Connor MR, Yeh H, et al. Anti-CD45RB/Anti-TIM-1-Induced Tolerance Requires Regulatory B Cells. *Am J Transplant.* 2012;12:2072-2078.
33. Le Texier L, Thebault P, Lavault A, Usal C, Merieau E, Quillard T, et al. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant.* 2011;11:429-438.
34. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010;120:1836-1847.
35. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010;120:1848-1861.
36. Kendal AR, Waldmann H. Infectious tolerance: therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 2010;22:560-565.
37. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, et al. « Infectious » transplantation tolerance. *Science.* 1993;259:974-977.
38. Yanaba K, Bouaziz J-D, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 2008;28:639-650.
39. Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, et al. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity.* 2010;33:777-790.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

40. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M, Degauque N, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 2010;78:503-513.
41. Vermeer LA, de Boer NK, Bucci C, Bos NA, Kroese FG, Alberti S. MRC OX19 recognizes the rat CD5 surface glycoprotein, but does not provide evidence for a population of CD5bright B cells. *Eur J Immunol.* 1994;24:585-592.
42. Wei B, Velazquez P, Turovskaya O, Spricher K, Aranda R, Kronenberg M, et al. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:2010-2015.
43. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 2009;182:3492-3502.
44. Qian L, Qian C, Chen Y, Bai Y, Bao Y, Lu L, et al. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcyllbhi regulatory B cells through IFN- β and CD40L. *Blood.* 2012;120:581-591.
45. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;178:3447-3456.
46. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol.* 2011;186:5569-5579.
47. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:1114-1124.e8.
48. Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity.* 2011;34:703-714.

Figure 1 S. Bézie et al.
American Journal of Transplantation

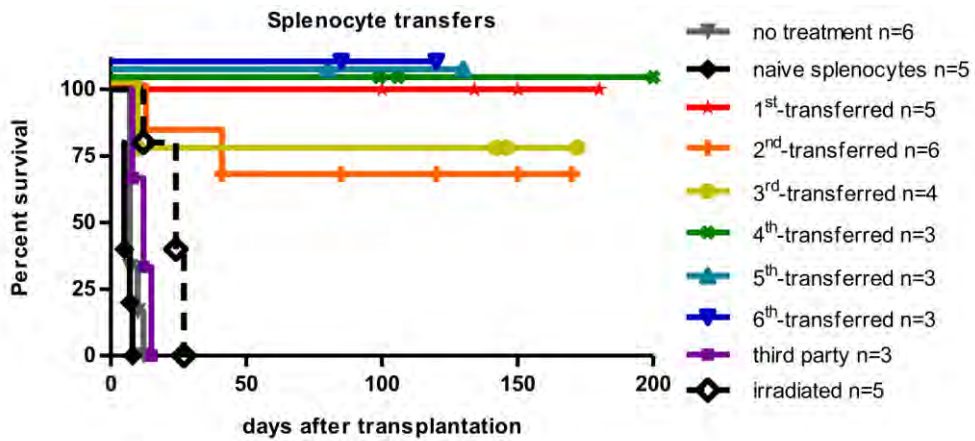




ScholarOne support: (434) 964 4100

American Journal of Transplantation
Figure 3. S. Bézie et al.

Page 30 of 44



ScholarOne support: (434) 964 4100

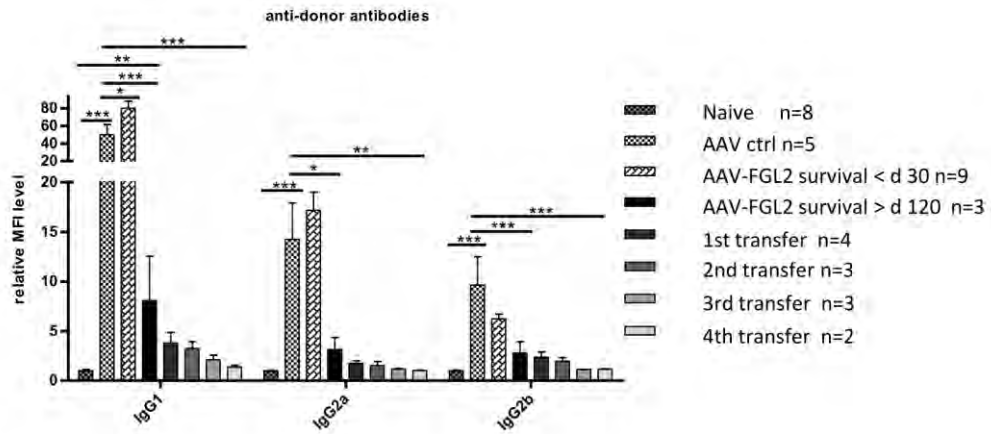
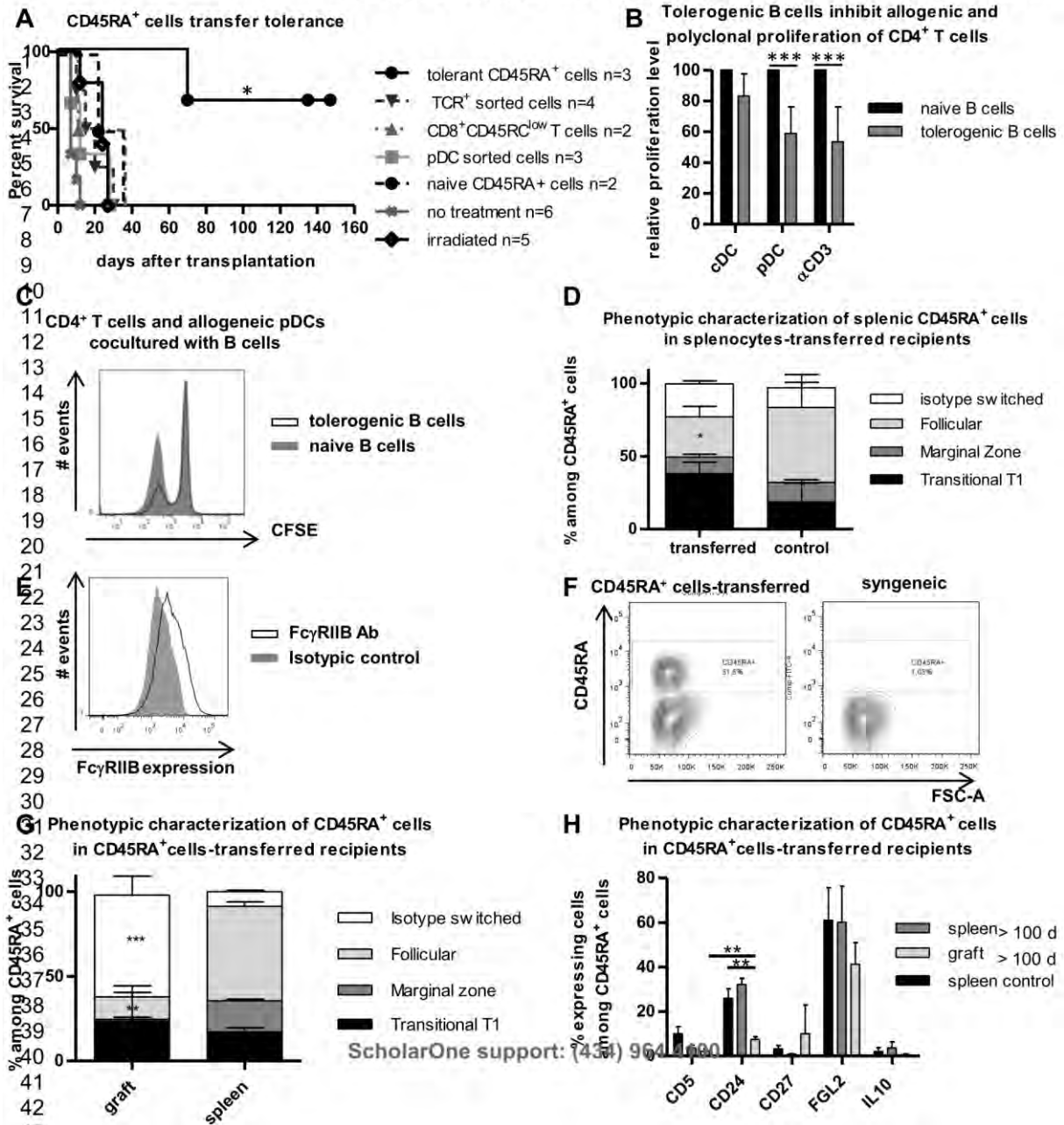
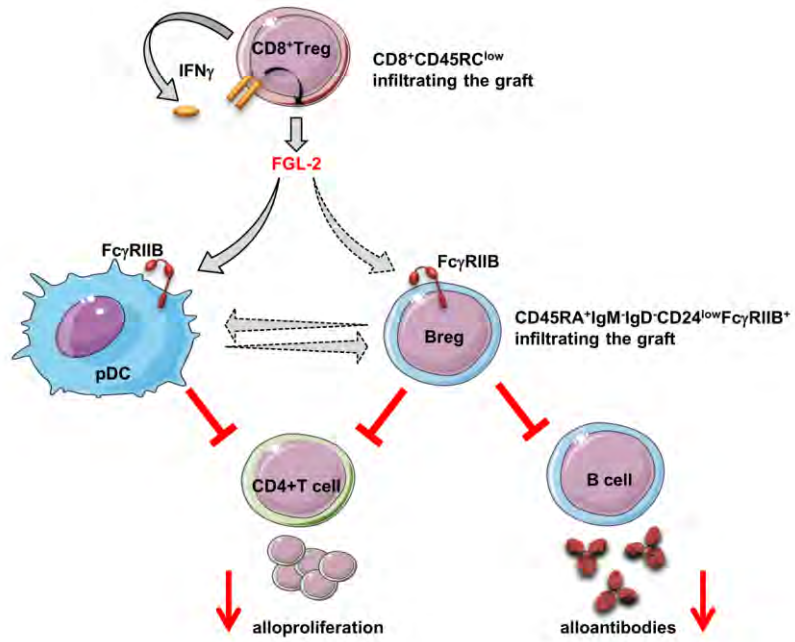


Figure 5. S. Bézie et al.
American Journal of Transplantation

American Journal of Transplantation
Figure 6. S. Bézie et al.

ScholarOne support: (434) 964 4100

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS.**Cardiac transplantation models.**

The adenovirus AdCD40Ig coding for the extracellular portion of mouse CD40 fused to the coding sequences of the constant domains of human IgG1 and the non-coding vector Add1324 have been described previously (1). 2.10^{10} adenovirus infectious particles were slowly injected in three points into the graft ventricular walls. Cardiac graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. The experiments were approved by the regional ethical committee for animal experimentation.

Quantitative RT-PCR.

The isolation and retrotranscription of mRNA as well as the quantification of specific mRNA levels using SYBR green technology after normalization to HPRT values have been described (2). The sequence of primer pairs for rat *Fgl2* were

5'-CAAGAACACAACCAGCCAAATCC-3' (forward) and

5'-CCCAGCCAAAATTCTCGTTCAA-3' (reverse).

Monoclonal antibodies and flow cytometry.

The antibodies used for the detection of T cells (R7/3), CD4⁺ T cells (OX35), CD8⁺ T cells (OX8), CD8⁺CD45RC^{low} T cells (OX8, OX22), pDCs (85C7) (3) and CD45RA⁺ cells (OX33) were obtained, with the exception of 85C7, from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). All biotin-labeled mAbs were visualized using Streptavidin-PE-Cy7 or Streptavidin-Alexa405 (BD Biosciences). FGL-2 was detected using a polyclonal antibody produced in house (see below for details). FcγRIIB was detected on permeabilized cells using a rabbit anti-FcγRIIB mAb (Eptomics, Burlingame, California) directed against the intracellular portion of the molecule. IFNγ was blocked with mAb DB1 (hybridoma DB1,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

IgG1, kindly provided by P.H. Van der Meisle, Rijswijk, The Netherlands). Antibodies against IgD, IgM, CD80 (3H5), CD86 (24F), RT1B (OX6), CD27 (LG 3A10), CD24 (His50), CD5 (OX19) and CD11b (MRC OX42) expression markers were used to characterize the CD45RA⁺ cell phenotype. A Canto II cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) was used to measure fluorescence and data were analyzed using FLOWJO software (Tree Star, Inc. USA). Cells were first gated by their morphology and dead cells excluded by selecting DAPI viable cells.

Generation of a polyclonal rat FGL2 antibody. Rabbits were immunized against two rat FGL2-specific peptidic sequences CKLQADEHPDPGGN and CYKFSFKKAKMMIRPKSFKP (PolyPeptide Laboratories, France). Low homology was only found with rat ASH2, and LZTS2 genes (66 and 63 %, respectively). Rat FGL2 antibodies were purified from serum with a peptide-coupled NHS-HiTrap column. Albumin contamination was removed with protein A columns. Eluat purity was checked by Silver-Nitrate coloration. Anti-FGL2 reactivity was tested against both rat FGL2 peptides used for Ab production by ELISA. The human-recombinant FGL2 protein (Abnova) was tested by western blot and the rat FGL2 protein expressed in cells transfected by a plasmid encoding FGL2 (pIFGL2 see below) was tested by FACS. FGL2 blocking activity was tested in coculture tests, using the antibodies at 100 µg/ml, as previously described (4).

Mixed lymphocyte reaction.

5.10^4 CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, and 12500 pDC were cultured per well (4). The suppressive activity of B cells was tested by adding CD45RA⁺ FACS-sorted B cells at a 1:1 ratio with CD4⁺CD25⁻ T cells. Human recombinant FGL2-GST protein was added to CD4⁺ T cells and pDC from 0.4 to 10µg/ml for analysis of suppressive activity. Rabbit anti-rat FGL2 antibodies or control immunoglobulins were tested for blocking activity at 100µg/ml.

AAV generation and gene transfer.

The rat FGL2 and control GFP plasmids were constructed by positioning the respective complete cDNA sequences downstream of a RSV promoter and the Igκ signal peptide for FGL2. The control non-coding AAV vector contained the RSV promoter with no cDNA. The FGL2 and GFP plasmids were first tested in HEK293T cells transfected with lipofectamine reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA). GFP expression was observed 24h later. Cells and supernatants were analyzed for FGL2 expression 48h after transfection, by FACS and western blot to confirm FGL2 expression detection. The plasmids were then used to produce AAV vectors of serotype 8 (LTG platform, INSERM UMR 1089, Nantes), respectively AAV-FGL2 and AAV-GFP. HEK293T cells were transduced with 10^2 to 10^5 vector genome copies/cell of AAV-FGL2 or AAV-GFP and $5 \cdot 10^3$ for AdLacZ. Twenty-four hours later, since GFP was expressed, cells were harvested and analyzed for FGL2 expression by PCR and by FACS before adenoviral-induced cell apoptosis. Recombinant AAV-FGL2 and AAV-GFP vectors, and non-coding AAV ($5 \cdot 10^8$ infectious particles/kg or $3 \cdot 10^{12}$ vector genomes/kg) were injected *i.v.* (in a volume of 500 μl) in 4-week-old rats, one month before the transplantation. A blood sample was taken for donor-specific alloantibody quantification at day 120 post transplantation.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS.

Supplementary figure 1: Sorting strategy for CD4⁺ proliferation in MLRs. A) CD4⁺T were sorted by FACS Aria by gating on TCR and CD4 positive expression and CD25 negative expression. CD8⁺Tregs were sorted according to CD8⁺ CD45RC^{low} marker expression. pDC were sorted by gating on TCR negative cells, and CD4 and CD45R high

1
2
3 expression. All cells were sorted by gating on DAPI negative live cells. Purity was greater
4
5 than 99%. **B)** Gating strategy to evaluate CFSE-based CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in an
6
7 MLR in the presence of allogeneic pDCs and CD8⁺ Tregs based first on morphology (SSC-
8
9 FSC), exclusion of DAPI by live cells, identification of TCR⁺ CD4⁺ T cells and analysis of
10
11 CFSE. FGL2 expression was analyzed on CD8⁺Tregs by gating on CD4 negative cells.
12
13
14

15 16 **Donor specific alloantibody quantification.**

17
18 Donor spleens were digested by collagenase D, stopped with 400µl of 0.1mM EDTA, and red
19
20 cells were lysed. Serum complement was inactivated by heating prior to incubation with
21
22 donor splenocytes at a 1/8 dilution and revelation with either anti-rat IgG1 (MCA 194,
23
24 Serotec), anti-rat IgG2a (MCA 278, Serotec), or anti-rat IgG2b (MAC195, Serotec) and anti-
25
26 Ms Ig-488 as an isotype control (ref 11029, Serotec). A FACS Canto (BD Biosciences,
27
28 Mountain View, CA) was used to measure fluorescence and data were analyzed using
29
30 FLOWJO software (Tree Star, Inc. USA). Geometric mean fluorescence intensity (MFI) of
31
32 tested sera was divided by the mean MFI values of 5 naive Lewis-1A sera used as controls.
33
34
35
36

37 38 **Supplementary figure 2: Development of a blocking anti-rat FGL2 antibody in** 39 40 **suppression tests**

41
42
43 **A)** Two rat FGL2 (rFGL2) peptide sequences were used to immunize rabbits and to affinity
44
45 purify anti-rFGL2 antibodies from rabbit serum. Western blot analysis using denatured human
46
47 recombinant FGL2-GST protein using anti-rFGL2 and as a control rabbit IgG from a non-
48
49 immunized animal. **B)** HEK293T cells were transfected with FGL2-recombinant or with
50
51 GFP-recombinant plasmid. Cytofluorimetry analysis of rat FGL2 protein expressed in
52
53 HEK293 cells. The left contour plot and black line on histogram show FGL2⁺ cells using the
54
55 novel anti-rFGL2 antibody. The right contour plot and filled grey on histogram show signals
56
57 obtained with control non-immunized rabbit IgG. Data are representative of 3 independent
58
59
60

1
2
3 experiments. **C)** FGL2 protein was detected by western blot in the cell lysate and supernatant
4
5 of transfected cells (n=3). **D)** HEK293T cells were infected or not with FGL2-recombinant
6
7 AAV at MOI 100 and 10000, and analyzed for *fgl2* mRNA expression by quantitative RT-
8
9 PCR; the spleen was used as a positive control (duplicates, n=2), and **E)** FGL2 protein
10
11 expression by FACS (black line : anti FGL2 MAb M02; filled grey: isotype control; n=2).
12
13
14
15
16
17
18

19 **Supplementary figure 3 : Phenotypic characterization of splenocytes, and CD45RA⁺,**
20 **TCR⁺, pDC cells sorting by FACS Aria.**
21
22

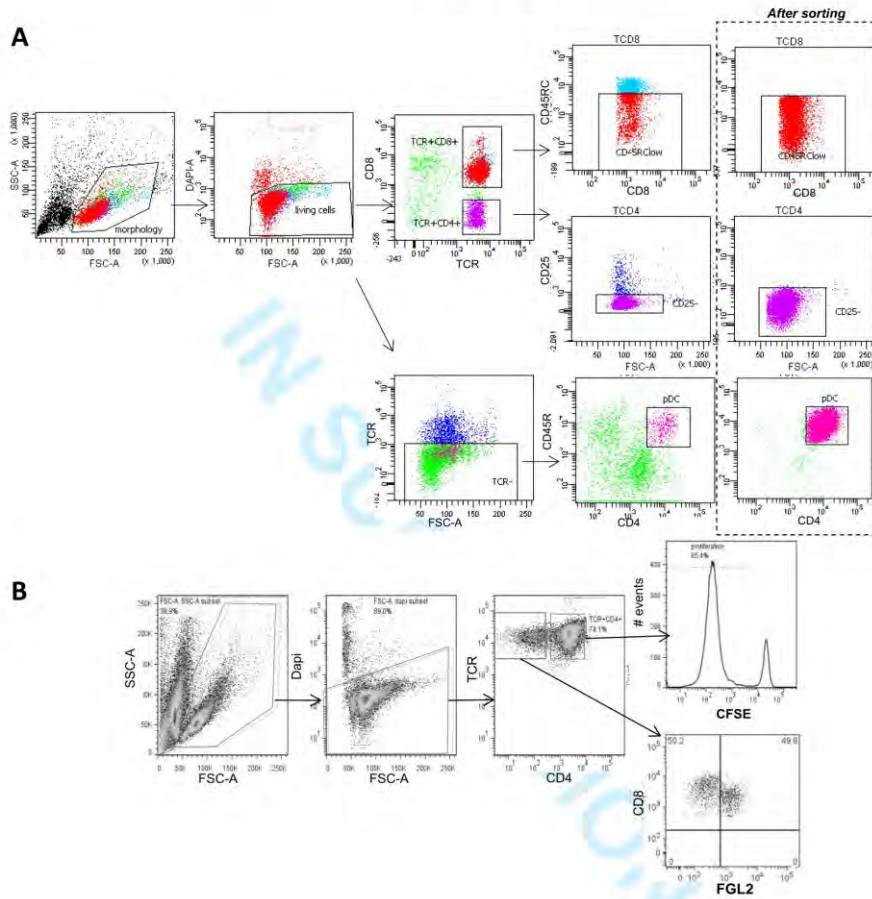
23
24 **A)** Splenocytes were harvested from AAV-FGL2-treated rats with long-term surviving grafts
25
26 (≥ 120 days, n=2), from rats that received a 1st adoptive transfer (1st-transferred n=4), and
27
28 iterative adoptive transfers (2nd transferred, n=3; 3rd transferred, n=3; and 4th transferred,
29
30 n=2) and from non-treated naïve animals (n=11). Splenocytes were counted and analyzed
31
32 using the indicated markers. Results are expressed in absolute numbers of CD4⁺ T, CD8⁺ T,
33
34 CD8⁺CD45RC^{low} T, CD8⁺CD45RC^{high} T, B CD45RA⁺ cells and pDCs recipients. Two-Way
35
36 ANOVA with Bonferroni post-tests p value * <0.05 FGL2-treated recipients vs. non-treated
37
38 naïve animals. **B)** CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T cells were labeled in spleen and graft of splenocytes-
39
40 transferred (n=3) vs naïve rats (n=2). **C)** T cells and pDC were sorted by FACS Aria
41
42 according to TCR expression and 85C7 Ab-binding respectively, and B cells were sorted by
43
44 gating on TCR negative and CD45RA positive expression markers, among DAPI negative
45
46 live cells. **D)** Purity was greater than 99%.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary figure 4: Phenotypic characterization of naïve B cells incubated with FGL2, with or without CPG, and analysis of IL-10, IFN γ and TGF β in the supernatant of B cell suppressive assays.

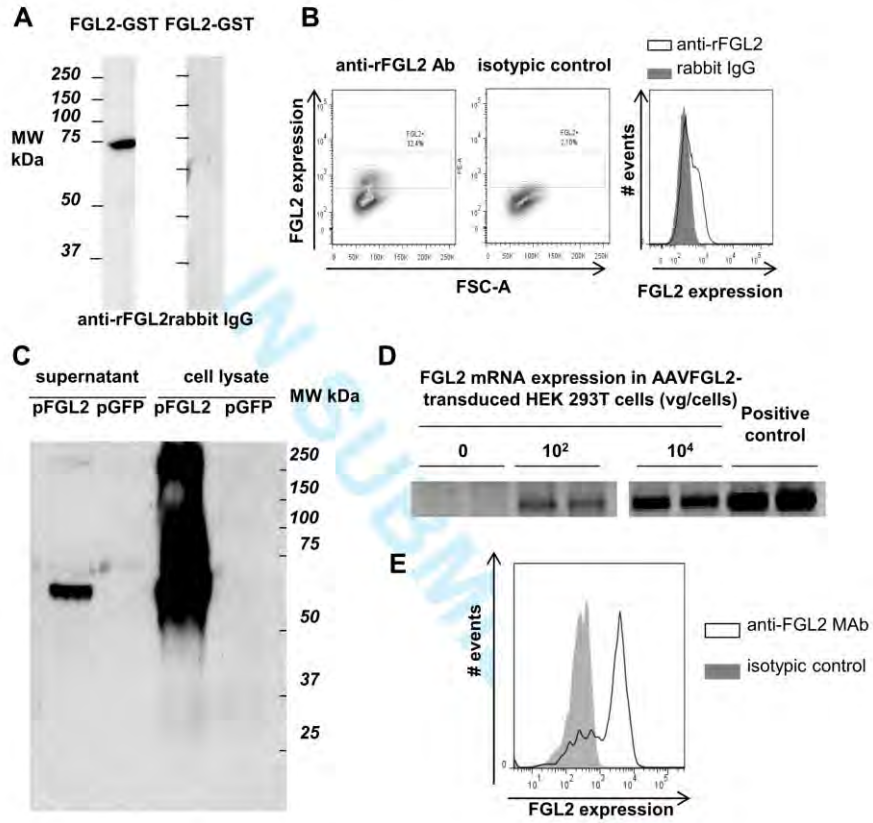
A) B CD45RA⁺ sorted cells from naïve non-treated rats were incubated for 24h with or without 1 μ g/ml CpG to induce a suboptimal maturation and with or without 10 μ g/ml FGL2, and analyzed for expression of CD5, CD24, CD27, CD11b, Fc γ RIIB, CD80, CD86 and RT1B by FACS (n=3), Two-Way ANOVA ***p value <0.001, Bonferroni post-tests. **B)** Mixed lymphocyte reactions between performed using donor pDCs and recipient CD4⁺CD25⁻ T cells in the presence or absence (n=3) of recipient CD45RA⁺ B cells cells from naïve (n=3) or from tolerant animals (n=4). Culture supernatants from day 6 cultures were analyzed by ELISA. The results do not show statistically significant differences (One-Way ANOVA, Kruskal Wallis test).

Supplementary Figure 1. S. Bézie et al.



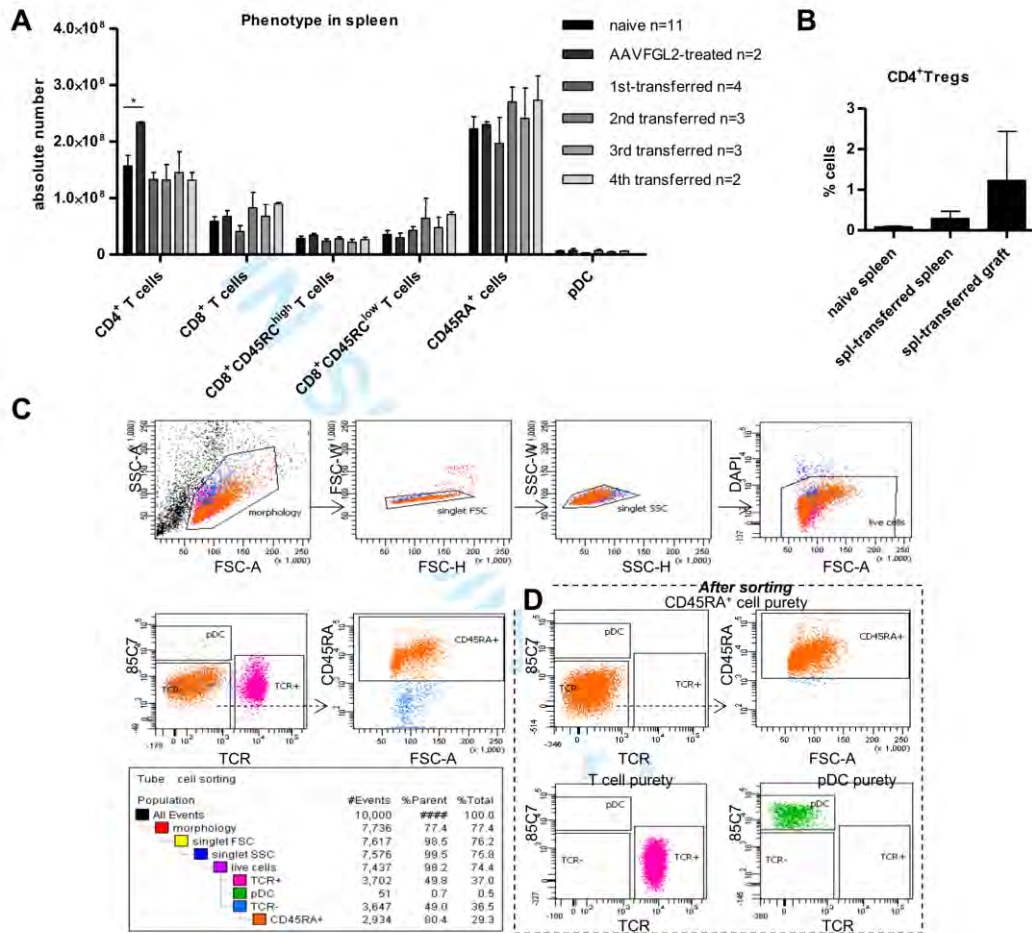
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary Figure 2. S. Bézie et al.



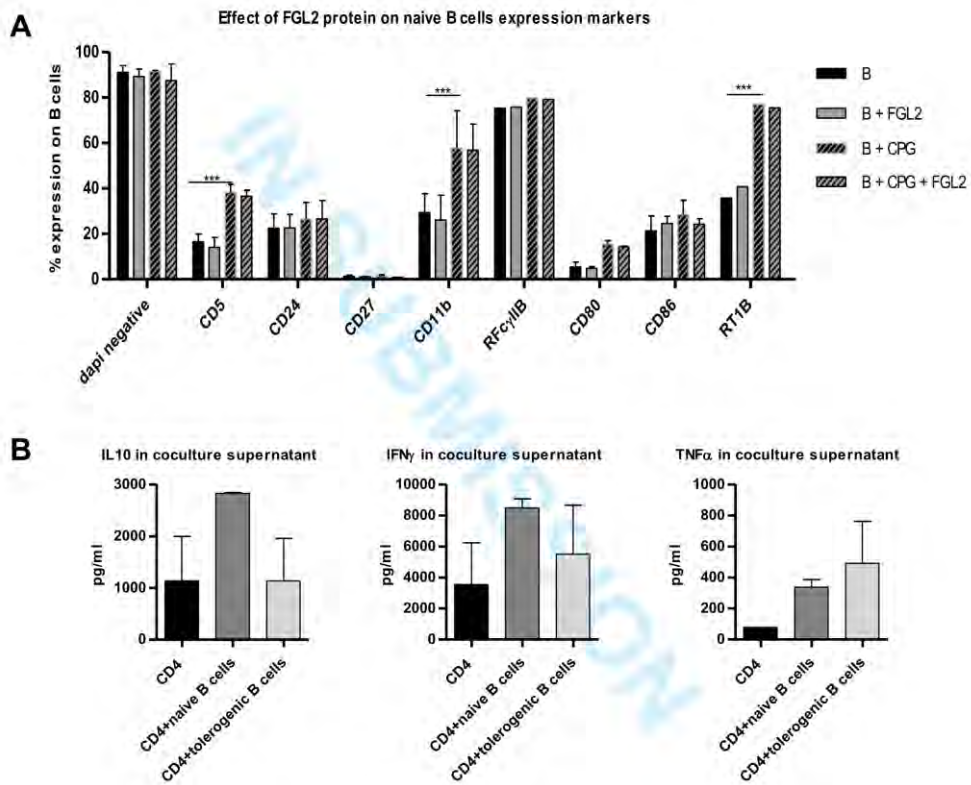
Supplementary Figure 3. S. Bézie et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary Figure 4. S. Bézie et al.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Guillot C, Guillonéau C, Mathieu P, Gerdes CA, Ménoret S, Braudeau C, et al. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40lg results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;168:1600-1609.
2. Guillonéau C, Hill M, Hubert F-X, Chiffolleau E, Hervé C, Li X-L, et al. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*. 2007;117:1096-1106.
3. Anjubault T, Martin J, Hubert F-X, Chauvin C, Heymann D, Josien R. Constitutive expression of TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)/receptor activating NF-κB ligand (RANK)-L by rat plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One*. 2012;7:e33713.
4. Li XL, Ménoret S, Bezie S, Caron L, Chabannes D, Hill M, et al. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;185:823-833.

Article III

La spécificité du TCR des Tregs CD8⁺ en allotransplantation

Elodie Picarda, Ignacio Anegon and Carole Guillonnet.

Article publié dans *Immunotherapy* (2011) 3(4 Suppl. 1), 35–37.

Titre original : T-cell receptor specificity of CD8⁺ Tregs in allotransplantation.



For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

SHORT PAPER

T-cell receptor specificity of CD8⁺ Tregs in allotransplantation

Recent studies in the field of CD8⁺ Tregs have allowed a better identification and characterization of this subset of regulatory cells. Their key role in the regulation of allogeneic responses is now well established. To take full advantage of CD8⁺ Treg cells in future therapeutic applications, a better knowledge is required, particularly concerning the contribution of the T-cell receptor (TCR) in cell function as well as the role and importance of its antigenic specificity. Here, we focused on the CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, which in rats induce an indefinite long-term allograft acceptance. We summarized recent findings on their interaction properties with antigen-presenting cells. Identification of the antigenic targets and TCR repertoire of CD8⁺ Tregs will allow a better understanding of their recognition properties and will highlight the potential of such of specific population in cell-based treatment.

KEYWORDS: antigen specificity CD8 regulatory T cells TCR tolerance transplantation

Regulation of the immune system is necessary to avoid unwanted immunity against self-antigens and to maintain normal immune homeostasis. The majority of autoreactive T cells are deleted in the thymus by negative selection but some cells escape this process and get to the periphery. Several mechanisms then contribute to create a peripheral tolerance, such as anergy, ignorance, clonal deletion or active immunoregulation. One of the major components of peripheral tolerance is the immune suppression performed by Tregs. Poorly studied until now, a revival of interest has been seen recently in CD8⁺ Tregs, also called CD8⁺ suppressor cells. Naturally occurring or experimentally induced CD8⁺ Tregs play a role in various immune responses, such as autoimmunity, tumor immunity, host defense against pathogens, and transplantation – our domain of interest. Despite the use of immunosuppressive agents, chronic rejection of transplants cannot yet be avoided and lead to graft loss. The induction of tolerance to alloantigens therefore represents an attractive alternative to treatment with systemic drugs. In particular, generation of alloantigen-specific CD8⁺ Tregs is of great interest in human cell therapy because of their highly specific suppressive ability and their stronger efficiency in the regulation of the immune response compared with polyclonal populations [1–3].

T-cell receptor diversity

Underlying the antigen specificity, an unanswered question in Treg biology is the exact contribution

of the T-cell receptor and its interaction with a peptide/MHC in the induction, expansion and function of CD8⁺ Tregs. We have a very limited knowledge of the impact of diversity in a selected TCR repertoire on the quality of immune response. Structurally diverse TCRs are generated by somatic recombination processing of α - and β -chains during development in the thymus. Different gene combinations of variable (V), diversity (D) and junctional (J) segments, as well as random addition of nucleotides at V(D) J junctions (called complementary determining region 3 [CDR3]), lead to a highly diverse repertoire of immature thymocytes, estimated at 10^{15} different clonotypes [4]. However, after thymic negative and positive selections, the naive TCR $\alpha\beta$ repertoire is reduced to 2×10^6 to 2×10^7 different TCRs [5,6]. The diversity can be measured by sequencing the hypervariable CDR loops, which interact with the peptide/MHC complex. The repertoire of the TCR is said to be 'public' when a clonotype is shared between animals or 'private' when clonotypes are proper to each animal. The TCR bias of antigen-specific Tregs has been poorly studied to date. This question is of great interest to better characterize alloantigen-specific Tregs in transplantation models and to ensure the best targeted therapy in clinical applications.

Alloantigen recognition by CD8⁺CD45RC^{low} Tregs

Currently, costimulation blockade, targeted to CD40/CD40 ligand (CD40L) interactions in

Elodie Picarda^{1,2,3},
Ignacio Aneon^{1,2,3} &
Carole Guillonneau^{1,2,3}

¹INSERM U844, Nantes, F-44000, France
²CHU Nantes, Institut de Transplantation-Cole-Abel-Geode en Transplantation Organique Reperfusion (TOUR) Nantes, F-44000, France
³Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000, France
Author for correspondence:
Tel: +33 240 007 410
carole.guillonneau@univ-nantes.fr

future
medicine part of fsg

particular, is one of the most promising strategies to induce tolerance to allograft [7]. In several rat and nonhuman primate models, this blockade is responsible for the generation of CD4⁺ Tregs and CD8⁺ Tregs in our allograft model in the laboratory [8–10]. Indeed, we recently reported that in a MHC-mismatched rat heart allograft model, treatment with CD40Ig, a chimeric molecule that blocks CD40L, leads to indefinite allograft survival mediated by tolerogenic CD8⁺CD45RC^{low} Treg cells (referred to as CD8⁺CD40Ig Tregs) [8,9]. CD8⁺CD40Ig Tregs, but not naturally occurring CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, transferred tolerance to naive transplant recipients. We described that the tolerogenic effects of CD8⁺CD40Ig Tregs are dependent on the production of IFN- γ and expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by graft endothelial cells and dendritic cells (DCs) of the spleen. Furthermore, our recent studies showed that CD8⁺CD40Ig Tregs perform their suppression both by contact-dependent and -independent mechanisms, implicating IDO or the IFN- γ /fibrinogen-like protein 2 (Fgl-2) pair, respectively [10]. CD8⁺ Treg cells suppress CD4⁺ antidonor responses in a contact-dependent manner when using plasmacytoid DCs versus conventional DCs [10]. We also showed previously that activation of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs in CD40Ig-treated animals is donor specific. Indeed, third-party Brown Norway grafts, but not the type of donor Lewis 1W, are rejected after adoptive transfer of Tregs. Furthermore, treatment with an anti-MHC-I antibody prevents the tolerization of the graft, showing the importance of TCR/peptide/MHC interaction in tolerance induction. Our work focuses on the characteristics of this molecular interaction in order to highlight its potential in our model. For this, we are analyzing the allogeneic peptides recognized and the TCR usage of the antigen-specific CD8⁺CD40Ig Tregs.

■ Antigen specificity of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs

As CD8⁺CD40Ig Tregs are antigen specific, and donor and recipient only differ on MHC molecules, we hypothesized that allogeneic peptide(s) recognized by Tregs are derived from polymorphic regions of donor MHC class I and II molecules (RT1.A α , RT1.B β 1, RT1.D β 1). We have designed 62 synthetic overlapping peptides of 16 amino acids in length on regions of mismatches between donor and recipient MHC molecules [11,12]. These peptides were tested by groups *in vitro* in a coculture of Tregs with syngeneic plasmacytoid DCs. The results obtained allowed us to exclude nearly half of

the peptides and to test only a reduced number of allogeneic candidates in an individual form. From this analysis, only two peptides may lead to a strong activation of CD8⁺CD40Ig Tregs. They are characterized by prominent amino acids with a large lateral chain at a rather central position. Interestingly, the structure of the allogeneic peptide/MHC complex can influence the diversity of the TCR repertoire after transplantation. According to the literature, such allogeneic peptides could result in a large TCR repertoire diversity of the specific Tregs [13,14].

■ TCR repertoire of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs

Looking at the TCR repertoire of the CD8⁺CD40Ig Tregs, we previously observed alterations of the V β transcripts of cells from long-term surviving animals. These cells preferentially used the V β 11 chain with a prominent peak at the same length of CDR3 in all animals (nine amino acids) [9]. The quantitative analysis, using real-time PCR, of the V β 11 family transcripts accumulation showed a greater than 11-times increase in CD40Ig-treated animals versus naive ones. We confirmed this upregulation and sequenced the V β 11 CDR3 region to characterize the nature of the TCR repertoire. The analysis of 160 clones of TCR from six long-surviving animals suggested a preferential use of a nine amino acids long CDR3 β with a bias towards the use of a particular J β region. Interestingly, no clonal sequences were found but conserved amino acids sequences were frequently selected, showing common features between clonotypes.

Conclusion

The complete characterization of the TCR repertoire of CD8⁺ Tregs and also of the allogeneic epitopes recognized will contribute to a better understanding of the role of the TCR in the cell function. To that extent, this ongoing study has the potential to clarify important aspects of the CD8⁺ Treg biology.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Bibliography

- 1 Mahic M, Henjum K, Yaqub S *et al.*: Generation of highly suppressive adaptive CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur. J. Immunol.* 38(3), 640–646 (2008).
- 2 Zheng J, Liu Y, Qin G *et al.*: Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *J. Immunol.* 183(6), 3742–3750 (2009).
- 3 Guillonnet C, Picarda E, Anegón I: CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15(6), 751–756 (2010).
- 4 Davis MM, Chen YH. T cell antigen receptors. In: *Fundamental Immunology*. Paul WE (Ed.). Lippincott-Raven, PA, USA 341–366 (1999).
- 5 Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P: Diversity of human $\alpha\beta$ T cell receptors. *Science* 288(5469), 1135 (2000).
- 6 Casrouge A, Beaudoin E, Dalle S, Pannetier C, Kanellopoulos J, Kourilsky P: Size estimate of the $\alpha\beta$ TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J. Immunol.* 164(11), 5782–5787 (2000).
- 7 Li XL, Menoret S, Le Mauff B, Angin M, Anegón I: Promises and obstacles for the blockade of CD40–CD40L interactions in allotransplantation. *Transplantation* 86(1), 10–15 (2008).
- 8 Guillot C, Guillonnet C, Mathieu P *et al.*: Prolonged blockade of CD40–CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40lg results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J. Immunol.* 168(4), 1600–1609 (2002).
- 9 Guillonnet C, Hill M, Hubert FX *et al.*: CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117(4), 1096–1106 (2007).
- 10 Li XL, Menoret S, Bezie S *et al.*: Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J. Immunol.* 185(2), 823–833 (2010).
- 11 Van Denderen B, Peche H, Gagne K, Usal C, Cuturi MC, Souillou JP: Identification of immunodominant donor MHC peptides following rejection and donor strain transfusion-induced tolerance of heart allografts in adult rats. *Eur. J. Immunol.* 31(5), 1333–1339 (2001).
- 12 Ballet C, Renaudin K, Degauque N *et al.*: Indirect CD4⁺ TH1 response, antidonor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long-term recipients conditioned by donor antigens priming. *Am. J. Transplant.* 9(4), 697–708 (2009).
- 13 Turner SJ, Kedzierska K, Komodromou H *et al.*: Lack of prominent peptide-major histocompatibility complex features limits repertoire diversity in virus-specific CD8⁺ T cell populations. *Nat. Immunol.* 6(4), 382–389 (2005).
- 14 Theodossis A, Guillonnet C, Welland A *et al.*: Constraints within major histocompatibility complex class I restricted peptides: presentation and consequences for T-cell recognition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(12), 5534–5539 (2010).

Article IV

Les Tregs CD8⁺ en transplantation d'organes solides

Carole Guillonnet, Elodie Picarda and Ignacio Anegon.

Article publié dans *Current Opinion in Organ Transplantation* 2010, 15:751–756

Titre original : CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation

CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation

Carole Guillonnet, Elodie Picarda and Ignacio Anegón

INSERM, UMR 643, CHU Nantes, ITUN, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

Correspondence to Carole Guillonnet, INSERM, UMR 643, F44093 Nantes, France
Tel: +33 2 40 08 74 10;
e-mail: Carole.Guillonnet@inserm.fr

Current Opinion in Organ Transplantation 2010, 15:751–756

Purpose of review

Recent advances in phenotypic identification of CD8 T cells with regulatory properties has allowed better definition of this subset of CD8 Tregs (also called CD8 T suppressor cells in the past). Analysis of their potential contribution in transplantation has attracted most of the interest in the past few years. A better understanding of the mechanisms of action and role of antigenic specificity of the different subtypes of CD8 Tregs and their potential in solid organ transplantation will bring considerable advances in the field. This review will focus and summarize the potential of this subset in cell-based treatments of human transplantation and highlight major discovery in the last months.

Recent findings

Identification of markers such as PD-1 has allowed better definition of the different CD8 Tregs subsets. Recent animal and human studies have identified mechanisms used by antigen-specific CD8 Treg cells in suppressing anti-allograft immune responses such as perforin-dependent cytotoxicity. New strategies of ex-vivo stimulation (through the T-cell receptor or not) of CD8 Tregs have shown future direction for solid organ transplantation.

Summary

CD8 Treg cells represent a subset of regulatory T cells with great potential for future therapeutic application and researchers are moving ahead for a better understanding of their action in anti-graft immune response suppression.

Keywords

CD8 regulatory T cells, tolerance, transplantation

Curr Opin Organ Transplant 15:751–756
© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
1087-2418

Introduction

Tolerance to the immune peripheral system is a necessary process to avoid immune responses to self. A key component of this peripheral tolerance system is specialized regulatory T cells (Tregs) that are able to down-regulate immune responses in various cases such as inflammation and transplantation. Until the last decade, most of the focus has been drawn on the CD4⁺ Treg cell subset because CD8⁺ T cells were first identified as effector T cells, although in the early 1970s, a few groups were capable of characterizing Tregs expressing the CD8 surface molecule [1,2]. It is only recently that technical advances and markers identification have allowed the identification of CD8⁺ Tregs in various models of auto-immunity, tumor immunity and tolerance to pathogens and transplants. Most of the interest on CD8 Tregs is now on the suppressor potential of CD8 Tregs and how we can generate/enhance CD8 Tregs activity and specificity to prevent, protect or treat allograft rejection and graft-versus-host disease (GVHD). In fact, generation of alloantigen-specific CD8 Tregs is of greatest interest because these have higher efficiencies and specificity

for the regulation of the immune response without compromising immunity to exogenous antigens [3,4,5,6].

The present review will bring up to date the effort made in solid organ transplantation to further define and use CD8 Tregs.

Natural CD8⁺ Tregs

Because of the lack of identification of specific phenotypic markers, the presence, origin and name of natural occurring CD8⁺ Tregs cells has long been a matter of debate. Identified in the past and called CD8⁺ suppressor cells because of their suppressive activity [7,8], this concept has recently re-emerged and a few groups have firmly demonstrated the presence of CD8⁺ Tregs [9–12]. In addition, it seems now that CD8 T cell subset with regulatory properties may originate from the thymus [CD4⁻CD8⁺Foxp3⁺ thymocytes (Foxp3 is the well-known marker of Tregs) represent less than 1%] and from naive or effector CD8 T cell in the periphery [13–15]. Crossing of Foxp3^{flp} mice with major histocompatibility complex (MHC) class I-deficient mice has clearly

752 Cellular transplantation

demonstrated the requirement for a T cell receptor (TCR)–MHC interaction in the thymus in the development of Foxp3⁺CD8⁺ thymocytes [16].

The discovery of molecular markers, as well as functional properties of Tregs, has allowed identification of several populations of natural CD8⁺ Tregs in various models. Similar to natural occurring CD4⁺ Tregs, the expression of Foxp3 and CTLA-4 can generally be found in subset of natural CD8⁺ Tregs. In human and rats, Saoudi's group showed that the natural CD8⁺ Tregs subset expresses the CD45RC^{low} marker in disease model patient of antibody-associated vasculitis (AAV) or lupus (SLE) [17*,18]. This subset displayed regulatory properties as shown by the production of type-2 cytokines (IL4, IL10, IL13 and TGFβ) and act in a contact-dependent manner. In mice, various populations of CD8⁺ Tregs have been identified bearing the CD25 (CD44^{high}GITR⁺CTLA-4⁺CD28⁻) [13], CD28⁻ (CD62L⁺CD44^{low}CD45RB^{high}) [19], CD103^{high} (CD44⁻) [20] or CD122 (Foxp3⁻ or CD44^{high}) [21–23] markers. Recently, it has been reported that the CD8⁺CD122⁺ natural occurring population can either be regulatory or memory T cells depending on their expression of the programmed death-1 (PD-1) marker and antigen specificity, the regulatory subset being PD-1⁺ cells [24**]. Accordingly, Koehn *et al.* [25] showed that blocking of PD-1 using anti-PD-1 antibodies led to allograft skin rejection in a transgenic OT-I system where PD-1 is overexpressed on CD8 T cell following blockade of costimulatory pathways. Haspot *et al.* [26] showed in an allogeneic bone marrow transplantation protocol that only CD8 cell tolerance, and not CD4, is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway.

Finally, the Qa-1-restricted CD8 αα⁺ (TCRαβ⁺) population [10,27] is probably the best identified population of natural occurring CD8⁺ Tregs [28]. It is well known that this population interacts with nonclassical MHC-Ib molecule Qa-1 (equivalent of HLA-E in human and RTBM-1 in rat) presenting a peptide derived from the nonhypervariable region of the TCR [11,29]. These Vβ-specific CD8 Tregs inhibit the activation of CD4⁺ T cells that express similar Vβ-chain irrespective of their antigen specificity. New advances on this subset of regulatory CD8 T cells have shown that they emerge upon T cell activation from a pool of naïve T cells and that they are capable of controlling polyclonal T cell and NKT cell reactivation in a Vβ-independent way [30**].

Induced CD8⁺ Tregs (nonantigen-specific and antigen-specific)

Unlike CD4 Treg cells, which are selected naturally in the thymus for their high affinity to antigens and express high levels of Foxp3, most of the CD8 Treg cells express low levels of Foxp3 and are fully efficient when primed

by antigens. Indeed, our own research in rats have demonstrated that induced CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, derived from natural CD8⁺CD45RC^{low} Treg cells, primed after CD40Ig treatment and allo-transplantation can inhibit, only when primed, a fully MHC-mismatched heart transplantation [31]; natural CD8⁺CD45RC^{low} Tregs can only inhibit a CD4-dependent GVHD in a rat model [32]. In a number of other transplant models, CD8 Tregs tolerance can be induced by antigen administration or donor blood transfusion [33,34], by rATG-treatment [35*], by TGF-β in an ova-specific TCR transgenic model of cardiac allograft in mice [36]. Zhou *et al.* [37] provided evidence that the CD8⁺ Tregs generated by oral exposure to alloantigen and mediating kidney allograft survival are IL-10 secreting, γδ TCR⁺ T cell.

Antigen-specific CD8 Tregs represent a population with great potential as they could suppress in transplantation, immune response to the graft without suppressing the global immune system. For example, CD8⁺CD28⁻ Tregs tolerance can be generated by repeated allostimulation with respectively a minor histocompatibility antigen-immunodominant peptide [6,38*]. In our model of fully mismatch heart allograft, we have observed a bias in the Vβ repertoire of the CD8⁺CD45RC^{low} Tregs toward a Vβ11 usage with a length of nine amino acids, suggesting the presence of a polyclonal antigen-specific expansion [31].

New markers have recently been identified as indicator of induced Treg function and activity such as fibrinogen-like protein 2 (FGL2), an immunosuppressive molecule secreted by Tregs cells and affecting dendritic cell function by inhibiting T cell proliferation and allo-antigen proliferation [39,40]. Our own results in a cardiac allograft model of tolerance have shown an important role for fg1-2 in Treg suppressive effect when CD8 Tregs are in contact with plasmacytoid dendritic cells (pDC) [41**]. New evidence suggested that molecules such as CD28 signaling are essential for the activity of the CD8⁺CD122⁺ and CD8⁺CD45RC^{low} Treg cells [42–44]. Using an anti-CD28-specific antibody *in vivo* in combination with the CD40Ig chimeric molecule has resulted in modification of regulatory mechanism with the deletion of the Vβ11-specific CD8⁺CD45RC^{low} Treg population in our allograft model in rat. Tolerance could not be transferred to irradiated grafted recipients by the splenocytes from animals treated with anti-CD28 antibody [44]. ICOS-B7h blockade *in vivo* has been shown to induce CD8 Tregs expressing the PD-1 molecule inhibiting the expansion of alloreactive CD4⁺ T cells [45]. Shi *et al.* [43] showed that blocking of the CD80/CD86–CD28 molecules *in vitro* using antibody and *in vivo* with CD28-knockout mice prevented the suppressive activity of induced CD8⁺CD122⁺ Treg cells. Recently, they have identified the human counterpart of CD8⁺CD122⁺

Tregs as being CD8⁺CXCR3⁺. CXCR3 overexpression was revealed by DNA microarrays on CD8⁺CD122⁺ Tregs and activity of CD8⁺CD122⁺CXCR3⁺ Tregs in mice correlated with CD8⁺CXCR3⁺ subset in human [46*].

Mechanism of action

The CD8 Tregs can display a range of mechanisms of action from killing activity, that is direct lysis of target cells (this is the case for Qa-1-restricted CD8 $\alpha\alpha$ Tregs), to generally a suppressive activity by secretion of immunosuppressive cytokines (reason for their original name). The different CD8 Treg subsets described in the literature utilize different mechanisms but advances in this field have allowed identification of cytolytic molecules involved in the killing activity of the CD8 Tregs. Recent studies from Cantor's group have shown that the perforin-mediated cytotoxicity is necessary for the activity of the Qa-1-restricted CD8 Treg cells [28,47]. In addition, the Qa-1 molecule presenting the Qdm peptide can engage CD8 and natural killer cells to inhibit the activity of these cells [28,48].

Cytokines play an important part in the induction of the suppressive mechanisms of CD8 Treg cells. Thus, human endothelial cell membrane-bound TGF- β was capable of inducing CD8⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Treg cells acting themselves by TGF- β 1 production [49*]. Wang *et al.* [50] showed in a model of corneal xenotransplantation that T cell vaccination greatly enhance CD8⁺CD28⁻ and CD4⁺CD25⁻ Treg cell subsets, which act cooperatively to induce significant prolongation of the xenograft survival, although adoptive transfer of the CD8⁺CD28⁻ Treg population itself resulted in profound inhibition of corneal xenograft rejection. Velthuis *et al.* [51*] observed accumulation of CD8⁺CD28⁻ Tregs in the pancreas allograft of a type 1 diabetic recipient resulting in the induction of the expression of the inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript-3 on antigen-presenting cells in a donor HLA class I-specific manner. Accordingly, CD8⁺CD103⁺ Treg cells are expanded by TGF- β and alloantigen stimulation by myeloid dendritic cells to produce IFN- γ , IL-6 and display cytotoxicity toward alloreactive effector cells through close cell-to-cell contact [52]. Uss *et al.* [53] showed previously that this subset could be enhanced by rapamycin immunosuppressive treatment and Lu *et al.* [54*] observed that this subset was present in spontaneous tolerance of liver allograft. CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells recognize target T cells via the CD80/CD86–CD28 interaction to become active regulatory cells and CD8⁺ $\gamma\delta$ Tregs generated after allogeneic donor splenocytes exposure in a kidney allograft model are both producing suppressive factors such as IL-10 [37,42,43]. CD8⁺PD-1⁺ Tregs generated in a cardiac allograft model using anti-ICOS Abs are localized

CD8⁺ Tregs in solid organ transplantation Guillonnet *et al.* 753

to graft, produce both IFN- γ and IL-4 and both inhibit CD4 effector responses and switch these responses to a Th2 profile [45]. Finally, Zheng *et al.* [5**] showed that the allo-antigen-specific suppression of CD8^{high} Treg is cell–cell contact dependent, requires allo-antigen-specific stimulation and partially relies on IL-10, TGF- β , GITR and CTLA-4 expression, but not on cell-mediated cytotoxicity.

We have recently described a new mechanism of action for CD8⁺CD45RC^{low} Treg cells. We observed that when tolerogenic CD8⁺ Tregs were not in contact with CD4⁺ T cells, suppression was mediated by indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), whereas contact with CD4⁺ T cells resulted in alternative suppressive mechanisms implicating IFN- γ , IDO and fibroblast growth factor-2 [41**]. In addition, IDO could be induced by CD8⁺ Treg cells in both dendritic cells and endothelial cells of the graft [31].

Additional mechanisms involved the TCR/callicreinin/NFAT pathway in a recent study of M. Sykes group, where NFAT1-deficient mice were used to demonstrate a CD8 T cell intrinsic NFAT1 requirement for CD8 tolerance *in vivo* in an allogeneic bone marrow transplantation model [55*].

Antigen specificity of CD8⁺ Tregs and role of T cell receptor

The requirement for a TCR interaction in the shaping of the regulatory T cell population is an active and ongoing debate. In the thymus, TCR signaling of high strength is required for Foxp3 induction in the Tregs [14,56]. Regulation of Foxp3 expression and Treg induction seems to be differentially regulated in the CD4 and CD8 lineage. Recently, Josefowicz *et al.* [57**] demonstrated that TCR activation in the absence of DNA methyltransferase-1 (Dnmt1), an enzyme involved in the regulation of Foxp3, is sufficient for induction of Foxp3 expression but that Dnmt1 is required for differential regulation of Foxp3 in the CD4 versus the CD8 lineage. However, Wu *et al.* [58**] have shown that in the periphery, Qa-1-restricted CD8⁺ T cells cross-protect animals from type 1 diabetes without abrogating the immune response to foreign antigens, not by recognizing the structural differences between self and foreign antigens, but rather by perceiving the avidity of T cell activation. This is the 'avidity model' that Jiang and Chess [59] published recently and stating that Qa-1-restricted CD8 Tregs downregulate activated T cells of intermediate avidity, independently of their antigen specificity. In the same issue, Burlingham and Goulmy [60] published a low-avidity model in which they identify pre-existing low-avidity CD8 Tregs specific of minor histocompatibility antigen, playing a role in transplant tolerance. We are actively working on identifying the exact contribution of the TCR in the

754 Cellular transplantation

activity of the CD8 Tregs as we think that it might be important for the efficacy and generation of this lineage [31,44,61].

The major barrier in the understanding of the role of the antigenic-specificity of the Tregs, that is role of the TCR, has been limited by the characterization of the antigenic targets and the isolation of antigen-specific cells from the periphery. In that direction, the use of TCR-transgenic or retrogenic mice has shown that such induced TCR-transgenic Tregs are similar to natural Tregs for their ability to inhibit proliferation and effector response by naive T cells and that TCR specificity play a crucial role [36,62–64]. In addition, several animal studies have shown that TCR-transgenic Tregs or endogenous antigen-specific Tregs are more potent at suppressing than polyclonal Treg populations. This is true for CD4 but still remain unanswered for CD8 Tregs [65,66].

CD8⁺ Tregs and transplantation

Tolerance to the allograft, that is to allo-antigens, is a process that needs the involvement of regulatory population including CD8 Treg cells. Unlike CD4 Treg cells, the role of CD8 Tregs in modulating transplant rejection is less clear and understood. Our group and others have clearly demonstrated the role of CD8 Tregs in the suppression of transplant rejection, although we observed that their mechanism of action involved IFN- γ secretion and therefore could be responsible of chronic rejection [31,36,67]. Expansion of CD8 Tregs is however a major goal in transplantation [61] and recent publications have shown that increase CD8 Tregs presence in human correlate with low immunosuppressant dosage and decrease acute and chronic liver allograft rejection [68*,69*]. Suci-foca's group has recently demonstrated that an engineered ILT3-Ig chimeric molecule (ILT3 is an inhibitory receptor expressed by antigen-presenting cells) can efficiently differentiate and expand CD8 Tregs both *in vitro* and *in vivo* in an allogeneic human islet transplants in humanized mice model [70,71] and their role in the suppression of xenogeneic GVHD [72*]. Their findings efficiently demonstrated the requirement for an interaction with membrane and soluble ILT3 with antigen-specific CD8 Tregs [73*] and that the interaction with a tolerogenic functional dendritic cell is crucial to the development of peptide-specific Tregs [74].

In addition, authors agree that antigen-specific recognition is critical for the function of regulatory CD8⁺ T cells and greatly enhance their function [75**]. This is applicable in a number of diseases such as type 1 diabetes which often end by pancreas or islet transplantation. Recently, Tsai *et al.* [76–78] have provided a potential therapeutic approach by expanding low-avidity auto-antigen-specific CD8 Tregs.

Conclusion

A lot of effort has been made to identify better phenotypic markers for CD8 Tregs. Heterogeneity of this population has made it more difficult to identify mechanism of action and we are ourselves still trying to identify the exact mechanism of action of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs in our transplant tolerance model in rat. Given the potential of CD8 Treg cells in solid organ transplantation, more efforts are been made in trying to expand and/or generate these cells *ex vivo*, *in vivo* or *in vitro* in order to translate T regulatory cell therapy in human [79*,80*].

References and recommended reading

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

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (pp. 794–796).

- 1 Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18:723–737.
 - 2 Cantor H, Shen FW, Boyse EA. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II: Activation by antigen: after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J Exp Med* 1976; 143:1391–1440.
 - 3 Bushnell A, Jones E, Gallimore A, *et al.* The generation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells that prevent allograft rejection does not compromise immunity to a viral pathogen. *J Immunol* 2005; 174:3290–3297.
 - 4 Stroopinsky D, Avivi I, Rowe JM, *et al.* Allogeneic induced human FOXP3⁺IFN- γ T cells exhibit selective suppressive capacity. *Eur J Immunol* 2009; 39:2703–2715.
 - 5 Zheng J, Liu Y, Qin G, *et al.* Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *J Immunol* 2009; 183:3742–3750.
- In this study, Zheng *et al.* developed a method to generate *in vitro* at a large-scale highly efficient alloantigen-specific CD8^{high} Tregs from naive CD8⁺CD25⁺ T cells. This is a low-cost and simple method that could facilitate the use of Tregs for clinical applications.
- 6 Mahic M, Henjum K, Yaqub S, *et al.* Generation of highly suppressive adaptive CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur J Immunol* 2008; 38:640–646.
 - 7 Fowler DH, Breglio J, Nagel G, *et al.* Allospecific CD8⁺ Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease. *J Immunol* 1996; 157:4811–4821.
 - 8 Martin PJ. Donor CD8 cells prevent allogeneic marrow graft rejection in mice: potential implications for marrow transplantation in humans. *J Exp Med* 1993; 178:703–712.
 - 9 Najafian N, Chitnis T, Salama AD, *et al.* Regulatory functions of CD8⁺CD28[–] T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 2003; 112:1037–1048.
 - 10 Hu D, Ikizawa K, Lu L, *et al.* Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 2004; 5:516–523.
 - 11 Jiang H, Kashleva H, Xu LX, *et al.* T cell vaccination induces T cell receptor V β -specific Qa-1-restricted regulatory CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:4533–4537.
 - 12 Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. Qa-1 restriction of CD8⁺ suppressor T cells. *J Clin Invest* 2004; 114:1218–1221.
 - 13 Bienvenu B, Martin B, Auffray C, *et al.* Peripheral CD8⁺CD25⁺ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 2005; 175:246–253.
 - 14 Aandahl EM, Torgersen KM, Tasken K. CD8⁺ regulatory T cells-A distinct T-cell lineage or a transient T-cell phenotype? *Hum Immunol* 2008; 69:696–699.
 - 15 Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, *et al.* Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 2005; 202:901–906.

- 16 Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22:329–341.
- 17 Ordonez L, Bernard I, L'Faqihi-Olive FE, *et al.* CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One* 2009; 4:e5287.
- This study demonstrated that human CD4 and CD8 T cells can be divided in subset according to the CD45RC expression. The CD45RC low expression is associated with type 2 and regulatory cytokine production.
- 18 Xystrakis E, Cavailles P, Dejean AS, *et al.* Functional and genetic analysis of two CD8⁺ T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat. *J Immunol* 2004; 173:3140–3147.
- 19 Menager-Marcq I, Pomie C, Romagnoli P, *et al.* CD8⁺CD28⁻ regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 2006; 131:1775–1785.
- 20 Ho J, Kurtz CC, Naganuma M, *et al.* A CD8⁺/CD103high T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J Immunol* 2008; 180:2573–2580.
- 21 Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, *et al.* Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* 2004; 200:1123–1134.
- 22 Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z, *et al.* Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN- γ production and proliferation of CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2005; 175:7093–7097.
- 23 Chen X, Priatel JJ, Chow MT, *et al.* Preferential development of CD4 and CD8 T regulatory cells in RasGRP1-deficient mice. *J Immunol* 2008; 180:5973–5982.
- 24 Dai H, Wan N, Zhang S, *et al.* Cutting edge: programmed death-1 defines CD8⁺CD122⁺ T cells as regulatory versus memory T cells. *J Immunol* 2010; 185:803–807.
- In this study, Dai *et al.* have shown that PD-1, a negative costimulatory molecule, is a marker that allows identification of regulatory CD8⁺CD122⁺PD-1⁺ Treg versus memory CD8⁺CD122⁺PD-1⁻ T cells. The PD-1⁺ subset only can suppress T cell responses.
- 25 Koehn BH, Ford ML, Ferrer IR, *et al.* PD-1-dependent mechanisms maintain peripheral tolerance of donor-reactive CD8⁺ T cells to transplanted tissue. *J Immunol* 2008; 181:5313–5322.
- 26 Haspot F, Fehr T, Gibbons C, *et al.* Peripheral deletion tolerance of alloreactive CD8 but not CD4 T cells is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway. *Blood* 2008; 112:2149–2155.
- 27 Seo SK, Choi JH, Kim YH, *et al.* 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2004; 10:1088–1094.
- 28 Lu L, Cantor H. Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 2008; 5:401–406.
- 29 Li J, Goldstein I, Glickman-Nir E, *et al.* Induction of TCR V β -specific CD8⁺ CTLs by TCR V β -derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol* 2001; 167:3800–3808.
- 30 Varthaman A, Khallou-Laschet J, Clement M, *et al.* Control of T cell reactivation by regulatory Qa-1-restricted CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2010.
- This study describes the emergence of non-V β -specific Qa-1-restricted CD8 $\alpha\alpha$ Treg cells upon polyclonal activation. There is a therapeutic potential in these cells as they can regulate reactivation of T cells and NKT cells.
- 31 Guillonnet C, Hill M, Hubert FX, *et al.* CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007; 117:1096–1106.
- 32 Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I, *et al.* Identification of a novel natural regulatory CD8⁺ T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 2004; 104:3294–3301.
- 33 Cortesini NS, Colovai AI, Manavalan JS, *et al.* Role of regulatory and suppressor T-cells in the induction of ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells in organ allografts. *Transpl Immunol* 2004; 13:73–82.
- 34 Liu J, Liu Z, Witkowski P, *et al.* Rat CD8⁺ FOXP3⁺ T suppressor cells mediate tolerance to allogeneic heart transplants, inducing PIR-B in APC and rendering the graft invulnerable to rejection. *Transpl Immunol* 2004; 13:239–247.
- 35 Sewgobind VD, van der Laan LJ, Kho MM, *et al.* Characterization of rabbit antithymocyte globulins-induced CD25⁺ regulatory T cells from cells of patients with end-stage renal disease. *Transplantation* 2010; 89:655–666.
- This study describes that rabbit antithymocyte globulins (rATG) stimulation of human CD25⁺ T cells can increase CD4⁺ and CD8⁺ CD25⁺FOXP3⁺CD127⁺ Tregs with regulatory properties.
- 36 Kapp JA, Horjko K, Kapp LM, *et al.* TCR transgenic CD8⁺ T cells activated in the presence of TGF β express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. *Int Immunol* 2006; 18:1549–1562.
- 37 Zhou J, Appleton SE, Stadnyk A, *et al.* CD8⁺ gammadelta T regulatory cells mediate kidney allograft prolongation after oral exposure to alloantigen. *Transpl Int* 2008; 21:679–687.
- 38 Sireci G, Barera A, Macaluso P, *et al.* A continuous infusion of a minor histocompatibility antigen-immunodominant peptide induces a delay of male skin graft rejection. *Immunobiology* 2009; 214:703–711.
- Sireci *et al.* showed that continuous infusion of an HY immunodominant peptide induce CD8⁺CD28⁻FOXP3⁺ suppressor T cells that can inhibit immune responses to male tissues and cells.
- 39 Liu H, Shalev I, Manuel J, *et al.* The FGL2-Fc γ R2b pathway: a novel mechanism leading to immunosuppression. *Eur J Immunol* 2008; 38:3114–3126.
- 40 Shalev I, Liu H, Kosciak C, *et al.* Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J Immunol* 2008; 180:249–260.
- 41 Li XL, Menoret S, Bezie S, *et al.* Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 2010.
- In this study, Li *et al.* have shown that CD8⁺CD45RC^{low} Tregs and pDCs accumulate in the graft and spleen only and that pDCs induces CD8 Tregs to suppress antidonor CD4 effector cells in two ways. When CD8 Tregs were in contact with CD4 effector cells, suppression was mediated by IFN- γ and fibro-leukin-2, whereas suppression implicated IDO when they were not in contact.
- 42 Rifa'i M, Shi Z, Zhang SY, *et al.* CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- α phbetaTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *Int Immunol* 2008; 20:937–947.
- 43 Shi Z, Rifa'i M, Lee YH, *et al.* Importance of CD80/CD86–CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Immunology* 2008; 124:121–128.
- 44 Guillonnet C, Seveno C, Dugast AS, *et al.* Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40lg-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 2007; 179:8164–8171.
- 45 Izawa A, Yamaura K, Albin MJ, *et al.* A novel alloantigen-specific CD8⁺PD1⁺ regulatory T cell induced by ICOS-B7h blockade in vivo. *J Immunol* 2007; 179:786–796.
- 46 Shi Z, Okuno Y, Rifa'i M, *et al.* Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ Treg. *Eur J Immunol* 2009; 39:2106–2119.
- DNA microarrays analysis revealed CXCR3 as a preferential marker of murine CD8⁺CD122⁺ Tregs and allowed identification of a human CD8⁺CXCR3⁺ Treg counterpart.
- 47 Lu L, Kim HJ, Werneck MB, *et al.* Regulation of CD8⁺ regulatory T cells: interruption of the NKG2A–Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:19420–19425.
- 48 Lu L, Ikizawa K, Hu D, *et al.* Regulation of activated CD4⁺ T cells by NK cells via the Qa-1–NKG2A inhibitory pathway. *Immunity* 2007; 26:593–604.
- 49 Yamada Y, Sugita S, Horie S, *et al.* Mechanisms of immune suppression for CD8⁺ T cells by human corneal endothelial cells via membrane-bound TGF β . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:2548–2557.
- CD8⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Tregs can be induced by human endothelial cells expressing membrane-bound TGF- β .
- 50 Wang J, Jiang S, Shi H, *et al.* Prolongation of corneal xenotransplant survival by T-cell vaccination-induced T-regulatory cells. *Xenotransplantation* 2008; 15:164–173.
- 51 Velthuis JH, Unger WW, van der Slik AR, *et al.* Accumulation of autoreactive effector T cells and allo-specific regulatory T cells in the pancreas allograft of a type 1 diabetic recipient. *Diabetologia* 2009; 52:494–503.
- Kidney–pancreas transplantation in type 1 diabetic recipient is characterized by an increased presence of CD8⁺CD28⁻ Tregs in the pancreas resulting in increased ILT-3 expression on APCs in a donor-specific manner.
- 52 Koch SD, Uss E, van Lier RA, *et al.* Alloantigen-induced regulatory CD8⁺CD103⁺ T cells. *Hum Immunol* 2008; 69:737–744.
- 53 Uss E, Yong SL, Hooibrink B, *et al.* Rapamycin enhances the number of alloantigen-induced human CD103⁺CD8⁺ regulatory T cells in vitro. *Transplantation* 2007; 83:1098–1106.
- 54 Lu L, Yu Y, Li G, *et al.* CD8⁺CD103⁺ regulatory T cells in spontaneous tolerance of liver allografts. *Int Immunopharmacol* 2009; 9:546–548.
- This is a study of spontaneous liver allograft tolerance in MHC-mismatch rat strains thanks to CD8⁺CD103⁺ Tregs presents in the allograft and induced by liver-specific factors.
- 55 Fehr T, Lucas CL, Kurtz J, *et al.* A CD8 T cell-intrinsic role for the calcineurin–NFAT pathway for tolerance induction in vivo. *Blood* 2010; 115:1280–1287.
- In this study, Fehr *et al.* demonstrated that NFAT1 is cell-intrinsically required for peripheral CD8 tolerance but not CD4 in an allogeneic bone-marrow transplantation model.

756 Cellular transplantation

- 56 Hsieh CS, Rudensky AY. The role of TCR specificity in naturally arising CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cell biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 293:25–42.
- 57 Josefowicz SZ, Wilson CB, Rudensky AY. Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 2009; 182:6648–6652.
- In this study, the authors observed that TCR stimulation in the absence of DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) is sufficient for Foxp3 induction and resulted in marked increase of CD8⁺ Foxp3⁺ T cells. They conclude that Dnmt1 is required for Foxp3 induction in the CD4 T cell lineage.
- 58 Wu Y, Zheng Z, Jiang Y, *et al.* The specificity of T cell regulation that enables self–nonself discrimination in the periphery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:534–539.
- In this study, the authors showed that cross-protection is achieved by Qa-1-restricted CD8⁺ Tregs that downregulated CD4 effector cells activated by any self-antigens but of intermediate avidity. Thus, it is not the structural differences, but rather the avidity of the recognition that allowed the Qa-1 CD8 Tregs to discriminate self from nonself.
- 59 Jiang H, Chess L. Qa-1/HLA-E-restricted regulatory CD8⁺ T cells and self–nonself discrimination: an essay on peripheral T-cell regulation. *Hum Immunol* 2008; 69:721–727.
- 60 Burlingham WJ, Goulmy E. Human CD8⁺ T-regulatory cells with low-avidity T-cell receptor specific for minor histocompatibility antigens. *Hum Immunol* 2008; 69:728–731.
- 61 Bisikirska B, Colgan J, Luban J, *et al.* TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺ CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest* 2005; 115:2904–2913.
- 62 Lathrop SK, Santacruz NA, Pham D, *et al.* Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. *J Exp Med* 2008; 205:3105–3117.
- 63 Kapp JA, Honjo K, Kapp LM, *et al.* Antigen, in the presence of TGF-beta, induces up-regulation of FoxP3^{hi} in CD4⁺ TCR transgenic T cells that mediate linked suppression of CD8⁺ T cell responses. *J Immunol* 2007; 179:2105–2114.
- 64 Kapp JA, Bucy RP. CD8⁺ suppressor T cells resurrected. *Hum Immunol* 2008; 69:715–720.
- 65 Masteller EL, Tang Q, Bluestone JA. Antigen-specific regulatory T cells: ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol* 2006; 18:103–110.
- 66 Brusko T, Bluestone J. Clinical application of regulatory T cells for treatment of type 1 diabetes and transplantation. *Eur J Immunol* 2008; 38:931–934.
- 67 Zhang J. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J Clin Invest* 2007; 117:871–873.
- 68 Lin YX, Yan LN, Li B, *et al.* A significant expansion of CD8⁺ CD28[–] T-suppressor cells in adult-to-adult living donor liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2009; 41:4229–4231.
- In this study, living donor liver transplant recipients were characterized by expansion of CD8⁺ CD28[–] Tregs maintaining low immunosuppressant dosages and decreasing acute or chronic rejection.
- 69 Lin YX, Wang LL, Yan LN, *et al.* Analysis of CD8⁺ CD28[–] T-suppressor cells in living donor liver transplant recipients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8:241–246.
- Monitoring of the CD8⁺ CD28[–] Tregs of living donor transplant is important to evaluate the immune state of the recipient and to adapt the dosage of immunosuppressant.
- 70 Kim-Schulze S, Scotto L, Vlad G, *et al.* Recombinant Ig-like transcript 3-Fc modulates T cell responses via induction of Th energy and differentiation of CD8⁺ T suppressor cells. *J Immunol* 2006; 176:2790–2798.
- 71 Vlad G, D'Agati VD, Zhang QY, *et al.* Immunoglobulin-like transcript 3-Fc suppresses T-cell responses to allogeneic human islet transplants in hu-NOD/SCID mice. *Diabetes* 2008; 57:1878–1886.
- 72 Vlad G, Stokes MB, Liu Z, *et al.* Suppression of xenogeneic graft-versus-host disease by treatment with immunoglobulin-like transcript 3-Fc. *Hum Immunol* 2009; 70:663–669.
- In this study, treatment with ILT3-Ig, a recombinant immunoglobulin-like transcript 3-Fc protein, induces the differentiation of CD8⁺ Tregs that suppress antixenoantigens cellular and humoral response.
- 73 Vlad G, Chang CC, Colovai AI, *et al.* Membrane and soluble ILT3 are critical to the generation of T suppressor cells and induction of immunological tolerance. *Int Rev Immunol* 2010; 29:119–132.
- In this study, Vlad *et al.* showed that the use of ILT3-Ig, a soluble inhibitory receptor ILT3, induces differentiation of CD8 T suppressor cells and thus can act as an immunotherapeutic molecule.
- 74 Qin H, Vlad G, Cortesini R, *et al.* CD8⁺ suppressor and cytotoxic T cells recognize the same human leukocyte antigen-A2 restricted cytomegalovirus peptide. *Hum Immunol* 2008; 69:776–780.
- 75 Renner P, Popp FC, Eggenhofer E, *et al.* Antigen-specific recognition is critical for the function of regulatory CD8⁺ CD28[–] T cells. *Transpl Immunol* 2010; 22 (3–4):144–149.
- Using a H2-K^b Des-TCR transgenic murine model, Renner *et al.* demonstrated that the suppressive function of naïve CD8⁺ CD28[–] Tregs is greatly enhanced by antigen recognition. This study underlines the importance of antigen-specific TCR–MHC class I recognition in the maintenance of organ transplantation.
- 76 Tsai S, Shameli A, Yamanouchi J, *et al.* Reversal of autoimmunity by boosting memory-like autoregulatory T cells. *Immunity* 2010; 32:568–580.
- 77 Wang J, Tsai S, Shameli A, *et al.* In situ recognition of autoantigen as an essential gatekeeper in autoimmune CD8⁺ T cell inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:9317–9322.
- 78 Zaccone P, Cooke A. Harnessing CD8⁺ regulatory T cells: therapy for type 1 diabetes? *Immunity* 2010; 32:504–506.
- 79 Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 2009; 30:656–665.
- This review focuses on CD4 Tregs but highlights new preclinical models that provide a rationale for human Treg cell therapy trials.
- 80 Long E, Wood KJ. Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation* 2009; 88:1050–1056.
- This review highlights new strategies in murine models to amplify the pool of regulatory T cells such as the use of immunosuppressive treatment.

Production scientifique

PUBLICATIONS

- ❖ Bézie S., **Picarda E.**, Tesson L., Renaudin K., Merieau E., Guillonneau C., Caron L., Anegon I. Interleukin-34 is able to prevent rat cardiac allograft from acute rejection. *En préparation*.
- ❖ **Picarda E.**, Bézie S., Delhumeau A., Echasserieau K., Merieau E., Renaudin K., Brouard S., Bernardeau K., Venturi V., Anegon I., Guillonneau C. Donor MHC-derived peptide recognized by TCR biased-CD8⁺ Tregs suppress organ rejection. *En révision pour resoumission dans Journal of Clinical Investigation*.
- ❖ Bézie S., **Picarda E.**, Tesson L., Renaudin K., Durand J., Merieau E., Chiffolleau E., Guillonneau C., Caron L., Anegon I. Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibronectin induces long-term allograft survival through regulatory B cells. *En révision dans American Journal of Transplantation*.
- ❖ **Picarda E.**, Anegon I., Guillonneau C. T-cell receptor specificity of CD8⁺ Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy*. 2011 Apr;3:35-7.
- ❖ Guillonneau C., **Picarda E.**, Anegon I. CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2010 Sep;15:751-756.

COMMUNICATIONS ORALES

- ❖ **Picarda E.**, Bézie S., Venturi V., Renaudin K., Merieau E., Davenport M., Anegon I., Guillonneau C. Donor MHC-derived peptide recognized by CD8⁺ Tregs suppress organ rejection. 12^{ème} Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation, 12-15 Décembre 2012, Nantes, France
- ❖ **Picarda E.**, Anegon I., Guillonneau C. Alloantigenic recognition properties of CD8⁺ regulatory T cells. 24th International Congress of The Transplantation Society (TTS), 15-19 Juillet 2012, Berlin, Allemagne

- ❖ **Picarda E.**, Anegon I. and Guillonneau C. Antigenic recognition properties of CD8⁺ regulatory T cells in transplantation. 15th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 4-7 Septembre 2011, Glasgow, Ecosse
- ❖ **Picarda E.**, Anegon I. and Guillonneau C. Characterization of TCR/peptide/MHC interaction of regulatory CD8⁺ T cells in allotransplantation. 12^{ème} Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation, 15-18 Décembre 2010, Genève, Suisse

POSTERS

- ❖ **Picarda E.**, Bézie S., Delhumeau A., Venturi V., Echasserieau K., Merieau M., Renaudin K., Bernardeau K., Brouard S., Anegon I. and Guillonneau C. Donor MHC-derived peptide recognized by TCR biased-CD8⁺ Tregs suppress organ rejection. 15th International Congress of Immunology, 22-27 Août 2013, Milan, Italie
- ❖ **Picarda E.**, Bézie S., Delhumeau A., Venturi V., Echasserieau K., Merieau M., Renaudin K., Bernardeau K., Brouard S., Anegon I. and Guillonneau C. Donor MHC-derived peptide recognized by TCR biased-CD8⁺ Tregs suppress organ rejection. FCE Trainee Satellite Symposium and FOCIS 2013, 27-30 Juin 2013, Boston, Etats-Unis
- ❖ **Picarda E.**, Bézie S., Delhumeau A., Venturi V., Echasserieau K., Merieau M., Renaudin K., Bernardeau K., Brouard S., Anegon I. and Guillonneau C. Donor MHC-derived peptide recognized by TCR biased-CD8⁺ Tregs suppress organ rejection. 18th NAT Conference; Common Perspectives in Transplant and Tumor Immunology, 24-25 Juin 2013, Nantes, France
- ❖ **Picarda E.**, Anegon I., Guillonneau C. Alloantigenic recognition properties of CD8⁺ regulatory T cells, Journée de la Recherche Translationnelle, 14 Novembre 2011, Institut Pasteur, Paris
- ❖ **Picarda E.**, Anegon I., Guillonneau C. Alloantigenic recognition properties of CD8⁺ regulatory T cells. 24th International Congress of The Transplantation Society (TTS), 15-19 Juillet 2012, Berlin, Allemagne
- ❖ **Picarda E.**, Anegon I. and Guillonneau C. Characterization of TCR/peptide/MHC interaction of regulatory CD8⁺ T cells in allotransplantation. ESOT-AST Joint Meeting, Highlights in Biological Agents and Transplantation, 1-3 Octobre 2010, Nice, France

SUBVENTIONS

Trainee FOCIS Travel Award 2013

The Transplantation Society 2012 Berlin Scholarships

Thèse co-financée par l'INSERM et la Région Pays de La Loire

Etude de l'interaction TCR/peptide/CMH des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} en allotransplantation chez le rat

Actuellement, les études en transplantation ont pour objectif d'induire une tolérance spécifique du donneur à long terme. Notre équipe a montré dans un modèle d'allotransplantation cardiaque chez le rat que le blocage de la voie CD40/CD40L induit des lymphocytes T régulateurs (Tregs) CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques du donneur et avec un fort potentiel suppresseur. L'importance de l'interaction du récepteur des Tregs (TCR) dans leur développement et leur fonction reste mal connue. Ces travaux de thèse ont eu pour objectif d'étudier la spécificité antigénique et le répertoire TCR associé des Tregs CD8⁺. Nous avons démontré pour la première fois en transplantation que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} induits reconnaissent un allopeptide de 15 acides aminés, dérivé d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II du donneur. Ce peptide active les Tregs *in vitro* en présence de cellules dendritiques plasmacytoïdes et stimule *in vivo*, et sans autre traitement, la génération et/ou la fonction de Tregs CD8⁺ spécifiques, qui inhibent les réponses immunes anti-donneur et induisent une tolérance chez des receveurs naïfs transplantés. De plus, le complexe CMH du soi/allopeptide identifié est reconnu par des TCRs sélectionnés pour les chaînes Vβ11 et Vβ18 exprimées par les Tregs, présentant un répertoire privé et assez divers dans la rate, mais plus restreint dans le greffon, et assurant une inhibition efficace des réponses alloimmunes. Ces travaux ont permis d'approfondir les connaissances sur la biologie des Tregs CD8⁺ chez le rat et mettent en évidence le potentiel thérapeutique des Tregs spécifiques d'antigènes dans le contrôle des rejets aigu et chronique d'allogreffe.

Mots-clés : transplantation, tolérance, Tregs CD8⁺, TCR, CMH/peptide

Study of TCR/peptide/MHC interaction of CD8⁺ CD45RC^{low} regulatory T cells in rat allotransplantation

Currently, a major goal of transplantation research is to induce long term donor-specific tolerance. Our team has already shown in a rat cardiac allotransplantation model that CD40/CD40L costimulation blockade induces donor-specific CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells (Tregs), with potent suppressive activity. The requirement for a TCR interaction in the development and function of Tregs remains unclear. The purpose of this study was to characterize the antigenic specificity and the related CD8⁺ Tregs' TCR repertoire. We have demonstrated for the first time in transplantation that induced CD8⁺ Tregs recognize a 15 amino acids allopeptide derived from a donor major histocompatibility complex class II (MHC) molecule. This peptide activates Tregs *in vitro* in presence of plasmacytoid dendritic cells and supports *in vivo*, without additional treatment, specific CD8⁺ Tregs generation and/or function, that in turn, inhibit anti-donor immune responses allowing establishment of tolerance in naive transplanted recipients. In addition, the self-MHC/allopeptide complex identified is recognized by Vβ11 and Vβ18-specific Tregs' TCRs displaying a private and diverse repertoire in the spleen, but restricted in the graft, that ensures effective suppression of alloreactive immune responses. This work has increased our knowledge of the biology of CD8⁺ Tregs in the rat and highlights the therapeutic potential of antigen-specific Tregs in the control of acute and chronic allograft rejection.

Keywords: transplantation, tolerance, CD8⁺ Tregs, TCR, MHC/peptide

PICARDA Elodie
INSERM UMR1064 - Equipe 2
30, Bd Jean Monnet
44093 NANTES Cedex 01