

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

École Doctorale : **BIOLOGIE SANTÉ**

Année 2012

N°attribué par la bibliothèque

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

Étude des mécanismes impliqués dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : BIOLOGIE MÉDECINE SANTÉ
Spécialité : IMMUNOLOGIE

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Laëtitia Le Texier

Le 24 Octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs: Dr Nuala MOONEY, Directeur de Recherche, Paris
Dr Claire HIVROZ, Directeur de Recherche, Paris

Examineur: Dr Laëtitia GAUTREAU, Maître de conférences, Nantes

Directeur de thèse :

Dr Élise CHIFFOLEAU, Chargé de Recherche, Nantes

UMR INSERM U1064 – ITUN
Dirigée par le Dr Anegon

Sommaire

Sommaire	2
Liste des abréviations	5
Liste des figures	7
Introduction	8
A. La transplantation	8
I- Généralités	8
II- Enjeux et limites	8
1. Pénurie d'organes	8
2. Rejet de Greffe	9
2.1. Le rejet hyper aigu	9
2.2. Le rejet aigu	10
2.3. Le rejet chronique	10
3. Traitements immunosuppresseurs	11
B. La réponse immunitaire en transplantation	14
I- La réponse immunitaire innée	14
II- La réponse immunitaire adaptative	15
1. Les antigènes reconnus en transplantation	15
2. Les cellules dendritiques: des APC professionnelles.	16
2.1. Généralités	16
2.2. Activation et maturation des cellules dendritiques	17
3. Activation des APC du donneur et du receveur	19
4. Phase effectrice de la réponse immunitaire adaptative	22
4.1. La réponse lymphocytaire T	22
(a). Activation de la réponse lymphocytaire T	22
(b). Polarisation de la réponse lymphocytaire T	23
4.2. La réponse lymphocytaire B	26
(a). Activation et différenciation des lymphocytes B	26
(b). Phase effectrice de la réponse lymphocytaire B	29
C. La Tolérance	32
I- La tolérance centrale	32
1. Sélection des lymphocytes T	33
2. Sélection des lymphocytes B	35
II- La tolérance périphérique	36
1. La délétion clonale/l'apoptose	37
2. L'anergie	37
3. La régulation/suppression	38
III- Les cellules régulatrices	38
1. Les lymphocytes T régulateurs	39
1.1. Les lymphocytes T régulateurs naturels	39
(a). $CD4^+CD25^+$	39
(b). $CD8^+$	40
1.2. Les lymphocytes T régulateurs induits	40
1.3. Mécanismes de régulation des lymphocytes T régulateurs	42

(a). <i>La production de cytokines régulatrices</i>	43
(b). <i>La lyse cellulaire</i>	44
(c). <i>La perturbation métabolique</i>	45
(d). <i>La régulation des cellules dendritiques</i>	45
1.4. Les lymphocytes T régulateurs en transplantation	47
2. Les DC tolérogènes	49
2.1. Les DC immatures	49
2.2. Les DC matures	50
2.3. Induction de DC tolérogènes	50
2.4. Molécules associées aux DC tolérogènes	52
2.5. DC tolérogènes en transplantation	52
3. Les lymphocytes B régulateurs	53
3.1. Généralités	53
3.2. Identification des populations de lymphocytes B régulateurs	55
3.3. Mécanismes de régulation des lymphocytes B régulateurs	56
(a). <i>La sécrétion de facteurs solubles</i>	56
(b). <i>Le contact cellulaire</i>	57
(c). <i>Les anticorps protecteurs</i>	58
3.4. Induction de lymphocytes B régulateurs	59
3.5. Les lymphocytes B régulateurs et la tolérance en transplantation	60
(a). <i>Des lymphocytes B nécessaires à l'induction de la tolérance</i>	61
(b). <i>Des anticorps protecteurs</i>	61
(c). <i>Des lymphocytes B associés à la tolérance chez l'homme</i>	61
D. Stratégies d'induction de tolérance en transplantation	64
I- L'induction de chimérisme hématopoïétique	65
II- La déplétion lymphocytaire	65
III- Le blocage de la costimulation	66
IV- L'inhibition de la migration cellulaire	68
V- L'induction et le transfert de cellules régulatrices	69
Résultats	72
A. Modèles d'allogreffes cardiaques chez le rat	72
I- Le modèle de tolérance induit par le LF15-0195	73
1. Le LF15-0195	73
1.1. Propriétés immunosuppressives	73
1.2. Mécanismes de suppression	74
(a). <i>Interaction avec l'Hsc70, une molécule de choc thermique</i>	74
(b). <i>Induction de la mort cellulaire</i>	74
(c). <i>Inhibition de la voie NF-kB et induction de DC tolérogènes</i>	74
2. Résultats préalablement obtenus dans le modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat induite par le LF15-0195	75
II- Le modèle de rejet chronique (DST)	76
B. Étude de la réponse lymphocytaire B dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat	78
I- Article 1	78
C. Étude d'une nouvelle molécule, LIME, impliquée dans la fonction des DC	91
I- Article 2	91
Discussion/perspectives	116
Bibliographie	130
Annexes	158

A. Annexe 1: Immunoregulatory function of IL-27 and TGFβ1 in cardiac allograft transplantation	158
B. Annexe 2: Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells.	158
C. Annexe 3: The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation.	158

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
Ag	Antigène
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
AICD	Activation Induced Cell Death
AIRE	AutoImmune Regulator
AP-1	Activator Protein-1
APC	Cellule Présentatrice d'Antigènes
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAFF	B cell-Activating Factor
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cells
CD	Cluster de Différenciation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
cTEC	cortical Thymic Epithelial Cells
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DC	Dendritic Cell
DCIR	Dendritic Cell immunoReceptor
DN	Double Négative
DSG	Déoxyspergualine
EAE	Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale
EBI3	Epstein-Barr virus induced gene 3
Foxp3	Forkhead box P3
Gal-1	Galectin-1
GITR	Glucocorticoid-Induced TNF-related Receptor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GVHD	Graft Versus Host Disease
HLA	Human Leucocyte Antigen
HO-1	Hème Oxygénase-1
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyl Transférase
IDO	Indoléamine 2,3- Dioxygénase
IFN- γ	Interféron-gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IS	ImmunoSuppresseur
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
KO	Knock-Out
LB	Lymphocytes B
LT	Lymphocytes T
LEW	Lewis
LFA-1	Leucocyte-Function-Associated <i>molecule</i> 1
LPS	Lipopolysaccharide
MAI	Maladie Auto-Immune
MLR	Mixed Leucocyte Reaction
mTEC	medullary Thymic Epithelial Cells
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin)
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF κ B	nuclear factor- κ B

NK	Natural killer
NOD	Non-Obese Diabetic
Nrp-1	Neuropilin-1
OLS	Organes Lymphoïdes Secondaire
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	Programmed Death 1
pDC	plasmacytoid Dendritic Cell
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	T Cell receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta”
Th	T helper
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor necrosis Factor
Treg	Cellule T régulatrice
WT	Wild Type

Liste des figures

Figure 1: Schéma représentant les modes d'action de différents immunosuppresseurs d'après Halloran et al. (Halloran 2004).....	13
Figure 2: Schéma représentant les trois voies de présentation allogéniques, directe, indirecte et semi-directe d'après Wood et al.(Kathryn J Wood & R. Goto 2012).	21
Figure 3: Schéma représentant les différentes voies de différenciation des cellules T CD4 ⁺ d'après Wood et al. (Kathryn J Wood & R. Goto 2012).....	25
Figure 4: Représentation schématique d'un anticorps.	26
Figure 5: Schéma de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires d'après Goodnow et al.(Christopher C Goodnow et al. 2010).....	29
Figure 6: Schéma représentant la sélection positive et négative des lymphocytes T dans le thymus d'après Griesemer et al.(Griesemer et al. 2010).	34
Figure 7: Schéma représentant le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse à partir de Kurosaki et al.(Kurosaki 2010).	36
Figure 8: Schéma représentant les différents mécanismes de tolérance périphérique	37
Figure 9: Schéma représentant les quatre principaux mécanismes de suppression des Treg d'après Workman et al.(Workman et al. 2009).	47
Figure 10: Schéma synthétisant les mécanismes de régulation des Breg à partir de Mizoguchi et al. (Atsushi Mizoguchi & Atul K Bhan 2006).....	59
Figure 11: Modèles d'induction de tolérance (LF15-0195) et de rejet chronique (DST) d'allogreffes cardiaques chez le rat.....	76
Figure 12: Images représentant les lésions et l'infiltration cellulaire dans des greffes cardiaques (J100) syngéniques (Syng), en rejet chronique (CR) ou tolérées (Tol) à partir de Heslan et al. (J. M. Heslan et al. 2006)	77
Figure 13: Schéma récapitulatif des principaux mécanismes observés dans le modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat.....	126

Introduction

A. La transplantation

I- Généralités

Actuellement, la greffe d'organes ou de cellules constitue une thérapeutique efficace pour pallier aux dysfonctionnements d'organes vitaux (cœur, foie, rein, poumon, ...), ou bien dans certains cas de cancers (moelle osseuse). Il existe différents types de greffes définis par le degré d'identité génétique entre le donneur et le receveur. Les greffes syngéniques sont réalisées entre individus génétiquement identiques. Chez l'homme, ce cas est rencontré lors de greffes autologues, c'est-à-dire, lorsqu'un patient reçoit une greffe de tissus ou de cellules dérivés de son propre organisme ou plus rarement, dans le cas d'isogreffe qui a lieu entre de "vrais" jumeaux. Ce type de greffe est habituellement bien accepté par le système immunitaire du receveur pour lequel la greffe ne constitue pas un élément étranger. Lorsque la greffe a lieu entre des individus génétiquement différents mais d'une même espèce, on parle d'allogreffe. Enfin, la xéno greffe concerne la greffe réalisée entre deux espèces différentes comme dans le cas de greffe de tissu porcine chez l'homme. Dans ces deux derniers cas, la greffe est considérée comme pathogène par l'organisme et entraîne une réponse immunitaire qui vise à la détruire. Cependant, dans le cas de la xéno greffe, la très grande disparité génétique entre le receveur et le donneur donne lieu à une réponse immunitaire plus forte.

II- Enjeux et limites

1. Pénurie d'organes

Ces dernières années, des avancées remarquables ont été réalisées sur la connaissance des mécanismes de rejet, l'amélioration des techniques chirurgicales et la qualité de vie des patients transplantés. Ces progrès ont fait de la transplantation une thérapeutique de choix. Cependant, en France, plus de 15 000 malades sont en attente d'une greffe d'organe chaque année. Pourtant, en 2010, seulement 4 700 d'entre eux ont été greffés (données de l'Agence de la Biomédecine). Ces chiffres sont révélateurs de la pénurie d'organes à laquelle nous faisons face. En effet, les besoins ne cessent d'augmenter sans que le nombre d'organes disponibles n'augmente. C'est pourquoi, la xéno transplantation et la greffe de tissus composites sont des stratégies thérapeutiques envisagées sur lesquelles les chercheurs travaillent actuellement. De plus, le rejet de greffe entraîne la nécessité pour certains patients

de recevoir plusieurs greffes au cours de leur vie. L'induction de tolérance des greffons à long terme pourrait permettre d'éviter à une même personne de se retrouver plusieurs fois en attente de greffe et ainsi contribuer à diminuer le nombre de personnes en liste d'attente. La pénurie d'organes rend chaque organe prélevé très précieux. L'objectif de notre recherche est donc de trouver des solutions thérapeutiques pour prolonger au maximum la durée de vie des greffons.

2. Rejet de Greffe

Le rôle du système immunitaire est de protéger l'organisme des pathogènes. Pour cela, il est capable de distinguer le "soi" du "non soi" (Janeway 1992) et ainsi d'éliminer ce qu'il reconnaît comme étranger. Les greffes étant principalement réalisées entre individus génétiquement différents, le système immunitaire du receveur va considérer comme étranger les cellules, le tissu ou l'organe du donneur et va s'employer à le détruire, c'est le phénomène de rejet. Il existe différents types de rejets qui se distinguent par les réactions immunologiques mises en cause et par leur cinétique d'apparition. Les différents rejets sont le rejet hyper aigu, le rejet aigu et le rejet chronique.

2.1. Le rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu intervient dans les heures voire les minutes qui suivent la greffe. Il est dû à la présence d'anticorps (Ac) préexistants dans le sérum du receveur. Ces anticorps sont dirigés contre les antigènes du système ABO ou les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) du donneur. La présence de ces Ac est généralement due à une précédente transplantation, une transfusion sanguine ou une immunisation lors d'une grossesse. Ces anticorps vont se fixer sur les cellules endothéliales du greffon, activer la voie classique du complément et attirer les granulocytes neutrophiles qui libèrent des enzymes lytiques. Les cellules endothéliales sont alors détruites, les plaquettes adhèrent au tissu lésé et provoquent une thrombose des vaisseaux ce qui entraîne la nécrose du greffon. Ce type de rejet est devenu rare de part le choix du donneur ABO et HLA compatible et par le test du crossmatching (optimisation de la compatibilité du CMH entre le donneur et le receveur) qui précède la transplantation. En revanche, il survient toujours dans le cas de xénogreffes. Ce type de greffe étant une solution envisagée du fait de la pénurie d'organe, le rejet hyper aigu continue d'être le sujet de nombreuses études.

2.2. Le rejet aigu

Le rejet aigu survient dans les premiers mois après la greffe. Il peut être induit par une réponse immunitaire à médiation cellulaire. En effet, les cellules présentatrices d'antigènes (APC) du donneur ou du receveur, induisent l'activation des cellules T alloréactives du receveur (Lechler and Batchelor 1982; Benichou et al. 1992). Ceci a pour conséquence l'infiltration massive de ces lymphocytes T au niveau du site de la greffe, entraînant la destruction du tissu. La réponse à médiation humorale via la production d'Ac par les lymphocytes B (LB) peut également jouer un rôle important dans le rejet aigu. Une fois activés, les LB vont se différencier en plasmocytes et produire des anticorps dirigés contre les antigènes du donneur et contribuer à la destruction du greffon (Hippen et al. 2005). Grâce aux avancées sur la connaissance des mécanismes immunologiques mis en jeu lors de ce rejet et donc, grâce à l'utilisation adaptée de différents types de traitements immunosuppresseurs (IS), le rejet aigu est actuellement bien contrôlé. Par exemple, le taux de survie à un an des greffes rénales est actuellement de 90% (Lee, A. J., *et al.* 2005) contre 30% dans les années 1970 (Agence de la biomédecine 2009). Malgré cela, la survie à long terme des greffons, n'a quant à elle, pas été améliorée par ces IS, ceux-ci pouvant même contribuer à la perte du greffon à long terme en raison de leur toxicité (W. M. Bennett et al. 1996; Nankivell et al. 2003). De plus, ils ne permettent pas d'éviter le rejet chronique qui est la cause principale de la perte du greffon 5 à 10 ans après la greffe.

2.3. Le rejet chronique

Le rejet chronique se développe des mois voire des années après la greffe. Il se manifeste par une occlusion lente et progressive des vaisseaux par artériosclérose, entraînant une ischémie responsable de la nécrose et de la fibrose du greffon. Ce phénomène induit l'altération de la fonction du greffon au cours du temps. Les mécanismes induisant le rejet chronique sont encore mal connus, mais différents facteurs de risques immunologiques et non immunologiques, associés à ce rejet, ont été identifiés. Parmi les facteurs immunologiques, l'alloréactivité des cellules T, la production d'Ac dirigés contre les greffons et l'activation des cellules endothéliales semblent jouer un rôle clé dans le rejet chronique (A. Takeda et al. 2011). En effet, différentes études ont associé les cellules T effectrices de type Th1 et Th2 au rejet chronique (Obata et al. 2005; Illigens et al. 2009), et la production d'anticorps chez les patients transplantés est associée à un mauvais pronostic de la survie des greffons à long terme (A. Piazza et al. 2001). La fixation de ces anticorps sur les cellules endothéliales du greffon est à l'origine de lésions vasculaires observées lors du rejet chronique (F. Li et al.

2009). De plus, il a été démontré que la survenue d'épisodes de rejet aigu augmente le risque d'apparition du rejet chronique (Matas et al. 1994). Les facteurs non immunologiques semblent également importants dans le développement du rejet chronique. En effet, une augmentation du risque de rejet du greffon a été démontrée lorsque l'organe provient d'un donneur décédé (Terasaki et al. 1995) (Sánchez-Fructuoso et al. 2007). En France, en 2011, sur 4926 prélèvements d'organes, 1572 provenaient de donneurs en état de mort encéphalique (données de l'Agence de la Biomédecine). La mort cérébrale entraîne différentes réactions immunologiques conduisant à l'activation de l'endothélium qui exprime alors des molécules d'adhésion (E- et P-sélectines, VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), LFA-1 (Leucocyte-Function-Associated Molecule 1)), des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et produit des cytokines pro-inflammatoires (M. J. Wilhelm et al. 2002). Ceci va favoriser l'infiltration des leucocytes au sein du greffon et augmenter le risque de dysfonctionnement à long terme (Johann Pratschke et al. 2008). De plus, l'acte chirurgical en lui-même peut influencer le rejet. Il est aussi à l'origine du phénomène d'ischémie-reperfusion dont les conséquences favorisent le rejet chronique (Chin et al. 2011). L'ischémie correspond à une privation d'oxygène due à une diminution de l'apport sanguin dans le greffon durant l'acte chirurgical. L'ischémie et la reperfusion de l'organe greffé induisent une hypoxie cellulaire aboutissant à la génération de dérivés de l'oxygène (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) appelés "Reactive Oxygen Species" (ROS). Ces dérivés provoquent une attaque oxydative des cellules du greffon entraînant la nécrose, l'apoptose cellulaire ainsi que la libération de DAMPs (Damage Associated molecular pattern) telles que les protéines de choc thermique appelées "Heat Shock Protein" (HSP). Les DAMPs se lient alors aux récepteurs de l'immunité innée, les "Toll like Receptor" (TLR), exprimés à la surface et dans les endosomes des cellules endothéliales vasculaires, des monocytes et des cellules dendritiques du greffon. L'activation de ces cellules, par la stimulation des TLR, va entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines ainsi que l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium. Ces molécules vont favoriser, une fois de plus, le recrutement des leucocytes sur le site de la greffe en créant un environnement inflammatoire (Goldstein 2006).

3. Traitements immunosuppresseurs

L'objectif des IS est de diminuer la réponse immunitaire du receveur afin d'empêcher l'attaque du greffon par les cellules de son propre système immunitaire. Il existe différents IS qui se distinguent par leur mode d'action. La réponse allogénique des lymphocytes jouant

un rôle clé dans le processus de rejet, les principaux IS ont pour cibles les lymphocytes T et B du système immunitaire. Les traitements IS peuvent inhiber l'activation ou la prolifération des lymphocytes ou bien, ils peuvent être déplétants (Halloran 2004) (Figure 1).

-*Les inhibiteurs de calcineurines* (la Cyclosporine A ou le Tacrolimus) empêchent l'activation des promoteurs des gènes codant pour des cytokines comme l'IL-2, nécessaire à la survie et la prolifération des lymphocytes T (C. Brandt et al. 2010).

-*Les inhibiteurs de mTOR* (mammalian target of rapamycin) (Sirolimus, Rapamycine) agissent quant à eux en inhibant l'enzyme de la famille des sérines/thréonines kinases, mTOR, empêchant la prolifération des lymphocytes induite par les cytokines.

-*Les inhibiteurs de purines* (Azathioprine, Mycophénolate Mofetil (MMF ou MPA)) ou les inhibiteurs de bases pyrimidiques (Leflunomide) inhibent également la prolifération des lymphocytes T et B ainsi que celle des monocytes.

-*Les corticoïdes*, analogues d'hormones naturelles aux propriétés anti-inflammatoires, agissent en inhibant la transcription de cytokines par les lymphocytes T et les macrophages. Ils sont classiquement utilisés comme traitement d'entretien en association avec les inhibiteurs de calcineurines.

-*Les anticorps polyclonaux* (ATG=anti-thymocyte globulins) induisent une déplétion lymphocytaire en ciblant différentes populations de lymphocytes. En revanche, *les anticorps monoclonaux* agissent sur des populations plus spécifiques. Par exemple, l'OKT3 (anti-CD3), le Rituximab (anti-CD20) et le Campath-1H (anti-CD52) déplètent respectivement les lymphocytes T, les lymphocytes B ou les deux à la fois. Ces anticorps sont classiquement utilisés comme traitement d'induction lors de greffes présentant un risque accru de rejet. D'autres Ac non-déplétants mais bloquant l'activation des lymphocytes T sont utilisés. C'est le cas du Daclizumab (anti-CD25 humanisé) et du Basiliximab (anti-CD25 chimérique) qui fixent le récepteur à l'IL-2 présent principalement sur les lymphocytes T activés. Ils sont plus spécifiques et ne transduisent pas de signal d'activation contrairement à l'ATG et l'OKT3 qui peuvent induire la production de cytokines en se fixant aux lymphocytes. On retrouve également des molécules qui bloquent la liaison des molécules de costimulation entre les APC et les lymphocytes T (CTLA4-Ig, CD40-Ig), inhibant ainsi l'activation de ces lymphocytes.

Parmi ces différents types de traitement IS, certains comme les inhibiteurs de calcineurines, induisent de graves effets secondaires tels que la néphrotoxicité à long terme (W. M. Bennett et al. 1996). Afin de minimiser les effets secondaires de chaque traitement, il est d'usage de combiner différents types d'IS et d'utiliser une trithérapie initiale qui associe des corticoïdes, un anti-prolifératif et un anti-calcineurine. Ce dernier peut parfois être

remplacé par un anti-mTOR qui n'a pas d'effet néphrotoxique. Ensuite, lors du traitement d'entretien, l'objectif est de diminuer les doses, soit de corticoïdes, soit d'anti-calceurines, afin de limiter les effets secondaires. Cependant, la toxicité des immunosuppresseurs utilisés en routine reste toujours un des problèmes majeurs en transplantation.

En plus de leur toxicité, les IS affaiblissent le système immunitaire du receveur, ce qui entraîne chez le patient une augmentation du risque de cancer (Kasiske et al. 2004) et d'infections (Dharnidharka et al. 2004).

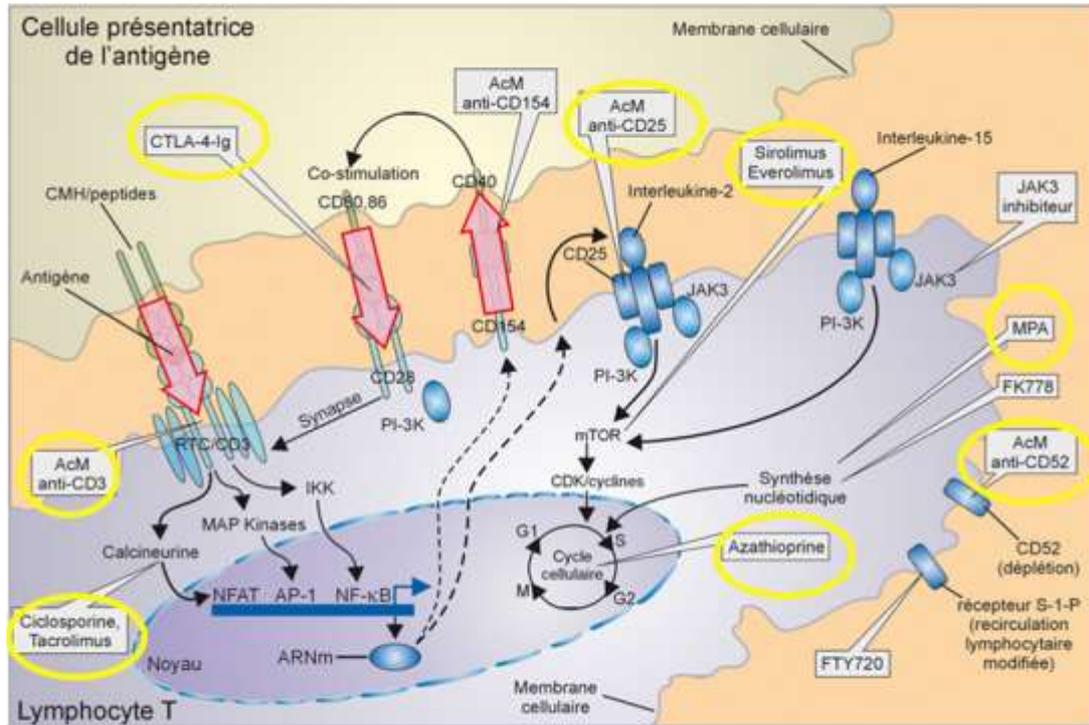


Figure 1: Schéma représentant les modes d'action de différents immunosuppresseurs d'après Halloran et al. (Halloran 2004).

AP-1: activating protein-1; CDK: cyclin-dependent kinase; CMH: complexe majeur d'histocompatibilité; IKK: I κ B kinase; JAK3: Janus kinase 3; mTOR: mammalian-target-of-rapamycin; NFAT: nuclear factor of activated T cells; NF- κ B: nuclear factor- κ B; PI-3K: phosphoinositide-3-kinase; S-1-P: sphingosine-1-phosphate.

B. La réponse immunitaire en transplantation

I- La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée se caractérise par son absence de spécificité antigénique et sa rapidité d'intervention. Elle est responsable de la réaction inflammatoire survenant rapidement après un dommage tissulaire. En transplantation, l'importance de l'immunité innée a été mise en évidence par de nombreux travaux (W G Land 2007). Elle est déclenchée par différents facteurs évoqués précédemment tels que la mort cérébrale du donneur, la chirurgie du greffon ainsi que le phénomène d'ischémie reperfusion qui entraînent la production de cytokines proinflammatoires, de radicaux libres, de DAMPS et l'expression de molécules d'adhésion (Walter G Land 2005a; Walter G Land 2005b). Ces diverses molécules entraînent le recrutement de leucocytes dans le greffon et l'activation des cellules de l'immunité innée. Ce sont majoritairement des polynucléaires neutrophiles qui sont recrutés, attirés par les chimiokines CXCL10, RANTES, Interleukine-17 (IL-17) et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Ils adhèrent aux cellules endothéliales du greffon activées, exprimant les molécules d'adhésion ICAM1, E- et P-sélectines. Les neutrophiles vont à leur tour produire des cytokines pro-inflammatoires et des radicaux libres oxygénés. Un gradient chimiotactique est alors créé et induit le recrutement d'autres leucocytes tels que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DC)... Des signaux de danger tels que les protéines de stress HSP, l'ARN (acide désoxyribonucléique) venant de cellules nécrotiques, l'acide urique et les protéines oxydées, sont ainsi produits dans le greffon. Ces signaux, ligands endogènes de PRR (pattern recognition receptor) tels que les TLR, vont activer ces récepteurs présents sur des cellules de l'immunité innée comme les macrophages, les NK ou encore les DC. Certaines études mettent en évidence le rôle majeur du TLR4 dans le phénomène d'ischémie-reperfusion montrant l'absence de lésions chez les rats "Knock Out" (KO) pour le TLR4 (P. Zhao et al. 2009). La liaison du ligand sur le TLR va induire l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NFκB (nuclear factor-κB), AP-1 (activating protein-1), et IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) impliqués dans l'inflammation et notamment dans la maturation des DC. Les DC présentes dans le greffon vont alors être activées puis devenir matures et servir de relais pour activer la réponse immunitaire adaptative.

II- La réponse immunitaire adaptative

1. Les antigènes reconnus en transplantation

La réponse immunitaire adaptative se définit notamment par sa spécificité antigénique. En transplantation, les antigènes du donneur reconnus par le système immunitaire du receveur sont :

-Les antigènes érythrocytaires ABO portés par les cellules endothéliales du greffon qui peuvent être reconnus par les anticorps naturels du receveur. La reconnaissance de ces antigènes est évitée par la réalisation de greffes ABO compatibles.

-Les antigènes des complexes majeurs d'histocompatibilité, CMH de classe I et II (Human leucocyte antigen: HLA pour l'homme, RT1 pour le rat, Histocompatibility-2: H-2 pour la souris). Ces molécules sont codées par des gènes hautement polymorphes de sorte qu'il est extrêmement rare de trouver deux individus ayant le même haplotype. Les molécules de classe I sont portées par toutes les cellules nucléées et les molécules de classe II par les cellules présentatrices d'antigène (APC): les DC, les macrophages, les LB et les cellules endothéliales (CE) vasculaires. La reconnaissance du CMH ou de peptides issus des CMH du donneur induit une réponse immune très forte.

-Les antigènes dits mineurs d'histocompatibilité comme MICA et MICB (MHC class I polypeptide-related sequences A et B). Ils sont présents notamment sur les CE, les monocytes et sont associés à l'augmentation du risque de rejet (Y. Zou et al. 2007; Sumitran-Holgersson 2008). L'antigène H-Y, codé par le chromosome Y fait aussi partie de ces antigènes. En effet, le risque de rejet aigu est augmenté lorsque le receveur est une femme et que le donneur est un homme, ce qui a été attribué à la présence de l'antigène H-Y dans le transplant (Gratwohl et al. 2008; Pabón et al. 2011).

-Des antigènes non polymorphiques ont aussi été impliqués dans le rejet comme le collagène ou le récepteur à l'angiotensine II (Q. Zhang & Elaine F Reed 2010).

Ces antigènes sont présentés par les APC du donneur ou du receveur aux lymphocytes du receveur. Cette présentation antigénique est réalisée via l'interaction entre les molécules des CMH de classe I ou II, chargées en peptides antigéniques à la surface des APC, et les récepteurs des lymphocytes T. Alors que la principale fonction des macrophages et des LB est l'élimination de pathogènes et la production d'anticorps, la fonction première des DC est de présenter l'antigène aux lymphocytes T. Les DC sont les cellules les plus aptes à induire l'activation de cellules T naïves pour générer une réponse effectrice efficace.

2. Les cellules dendritiques: des APC professionnelles.

2.1. Généralités

Les DC sont les cellules pivots du système immunitaire. Localisées à l'interface avec le milieu extérieur, ce sont les sentinelles du système immunitaire capables de détecter la pénétration de pathogènes dans l'organisme. Elles sont impliquées à la fois dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Leur capacité à intégrer les différents signaux de danger leur permet d'induire une réponse immunologique efficace et adaptée (Banchereau et al. 2000). Les DC sont impliquées dans l'induction de réponses immunitaires secondaires et jouent un rôle critique dans l'induction de réponses primaires. (Lanzavecchia & Sallusto 2001) (I Mellman & R M Steinman 2001). En effet, les DC sont des APC professionnelles nécessaires à la modulation de la réponse des cellules T. Elles sont aussi impliquées dans la réponse des LB et des NK. Les DC exercent une activité centrale dans le système immunitaire. En effet, leur fonction ne se limite pas à l'activation de la réponse immunitaire, ces cellules peuvent également inhiber la réponse effectrice et induire la tolérance aux antigènes qu'elles présentent.

Il existe plusieurs sous-populations de DC se distinguant par leur localisation, leur fonction et leur phénotype. Les DC sont générées dans la moelle osseuse à partir d'un même progéniteur hématopoïétique $CD34^+$. Ce progéniteur génère des précurseurs myéloïdes et lymphoïdes qui migrent dans les tissus pour se différencier en DC immatures. Les précurseurs myéloïdes seront à l'origine de DC conventionnelles (cDC) $CD11c^+$ alors que les précurseurs lymphoïdes induiront des DC plasmacytoïdes (pDC) $CD11c^-$. Les cDC sont largement distribuées au sein de l'organisme. Elles sont subdivisées en différentes sous-populations qui se distinguent par leur localisation et l'expression de différents marqueurs de surface. Au niveau de l'épiderme de la peau et de l'épithélium des muqueuses se trouvent notamment les premières DC conventionnelles décrites, les cellules de Langerhans. Elles sont caractérisées par l'expression d'une lectine, la Langérine (CD207) et la présence de granules de Birbeck dans le cytoplasme (Caux et al. 1996; Valladeau et al. 2000). La plupart des cDC décrites par la suite sont des cellules interstitielles présentes dans la majorité des tissus lymphoïdes. Elles se divisent en populations $CD8^+$ ou $CD8^-$ chez la souris (Shortman & Heath 2010) ou $CD4^+CD103^{lo}$ et $CD4^-CD103^{hi}$ chez le rat (Voisine et al. 2002), dont les DC n'expriment pas le marqueur CD8. Parmi les cDC des tissus non lymphoïdes se trouvent les cDC $CD103^+$ et les cDC $CD11b^+$ chez la souris (Helft et al. 2010).

Les pDC sont quant à elles situées au niveau de la rate, des ganglions, du thymus, du sang et de la moelle osseuse. Ces cellules ont principalement été décrites pour leur production de grande quantité d'IFN de type I (α et β) (Cella et al. 1999; Siegal et al. 1999) suite à une stimulation via les TLR 7 et 9, par de l'ARN ou de l'ADN viral. Bien que leur propriété d'APC ait été moins décrite, ces cellules sont capables de capter, d'apprêter et de présenter des antigènes et jouent un rôle important dans l'immunité tumorale (Schettini & Mukherjee 2008).

Il existe une troisième population de DC, les iDC (DC inflammatoires). Ces cellules sont générées à partir des monocytes circulant dans le sang et de façon dépendante du GM-CSF (**G**ranulocyte-**M**acrophage **C**olony-**S**timulating **F**actor) (Shortman & Naik 2007). Lors d'une inflammation, les monocytes migrent dans le tissu concerné et se différencient en DC $CD11c^{low/int}CMHII^{int}$. Ces cellules ont été décrites comme étant à l'origine de réponses T effectrices contre les pathogènes (León et al. 2007).

2.2. Activation et maturation des cellules dendritiques

En absence d'infection, les DC situées en périphérie sont à l'état immature. Elles testent en permanence leur environnement en captant des antigènes (Buckwalter & M. L. Albert 2009) par endocytose, phagocytose ou macropinocytose (Trombetta & Ira Mellman 2005). Elles migrent ensuite dans les ganglions lymphatiques dans lesquels elles rencontrent des cellules T potentiellement auto-réactives et leur présentent les antigènes du soi de façon tolérogénique. L'absence de signaux de costimulation fournis par les DC entraîne la déplétion des lymphocytes T ou l'induction de cellules T régulatrices. Je développerai plus précisément ce phénomène dans la partie "Tolérance" de cette introduction.

Lors d'une infection, de dommages tissulaires ou de stress cellulaire, comme observés lors d'une transplantation, les DC vont détecter les signaux de danger d'origine pathogène, les PAMP (Pathogen associated molecular pattern) (Janeway, 1989) ou d'origine endogène, les DAMP (K. Shimizu & Fujii 2008), via les PRR qu'elles expriment en surface. Ces signaux vont déclencher le processus d'activation et de maturation des DC. Parmi les PRR exprimés par les DC se trouvent les TLR, dont les ligands peuvent être exogènes comme les peptidoglycanes (TLR2), l'ARN viral double brin (TLR3), les lipopolysaccharrides (LPS) (TLR4), la flagelline (TLR5), l'ARN bactérien (TLR7/8) ou l'ADN bactérien (TLR9) (Medzhitov 2001) ou endogènes comme l'ADN, l'ARNm, les HSP... (Rifkin et al. 2005). D'autres PRR tels que les récepteurs "NOD-like" (NLR) ou les récepteurs de la famille des lectines de type C sont impliqués dans la maturation des DC tels que DC-SIGN (Pathak et al.

2012), Dectin-1 (S. Agrawal et al. 2010) ou encore Clec9A (Caminschi et al. 2012). Les récepteurs de type lectine sont également impliqués dans la captation et la présentation antigénique ainsi que dans l'activation de la réponse immune effectrice. Il existe également des récepteurs de type lectine inhibiteurs, exprimés par les DC, qui régulent la réponse effectrice au profit d'une réponse régulatrice comme l'a démontré l'étude du récepteur CLEC-1 réalisée par notre équipe (P Thebault et al. 2009). Certains récepteurs aux chimiokines comme CCR5 et CCR7 (Aliberti et al. 2000; Marsland et al. 2005) ou certaines cytokines proinflammatoires comme le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) peuvent également participer à la maturation des DC (Castiello et al. 2011). L'activation des DC est donc finement régulée par de nombreuses molécules de surface activatrices ou inhibitrices dont l'expression va favoriser l'état activateur ou inhibiteur de la DC. Parmi ces molécules se trouvent également les récepteurs aux fragments Fc (Fragment cristallisable des anticorps) (FcR) inhibiteurs et activateurs qui se lient aux complexes immuns formés par les anticorps et leurs antigènes. Ces récepteurs sont importants pour réguler l'activation des DC et sont également impliqués dans la captation, l'apprêtement et la présentation des antigènes (Nimmerjahn & Jeffrey V Ravetch 2006). Par exemple, il a été montré que le récepteur inhibiteur Fc γ RIIb est impliqué dans la modulation de la réponse immune induite par les DC. En effet, les DC de souris déficientes pour ce récepteur entraînent une réponse immune plus longue et plus intense *in vitro* et *in vivo* (Kalergis & Jeffrey V Ravetch 2002). De plus, l'utilisation d'un anticorps pour bloquer l'interaction de Fc γ RIIb avec les complexes immuns déclenche une maturation spontanée des DC, révélant l'importance de ce récepteur dans la régulation de leur activation (M V Dhodapkar et al. 2001). Les récepteurs activateurs tels que le Fc γ RI et le Fc γ RIII favorisent la maturation des DC et la présentation des antigènes aux cellules T (Regnault et al. 1999).

La détection des signaux de danger par les DC, via les PRR, engendre une cascade d'évènements intracellulaires permettant d'augmenter les capacités de migration et de stimulation des DC. Celles-ci migrent alors dans les ganglions lymphatiques afin d'activer les cellules T naïves ou alloréactives dans le cas de la transplantation. La maturation des DC se traduit par:

✓ La modification morphologique des cellules via un réarrangement du cytosquelette.

La maturation des DC est associée à la perte des structures d'adhésion telles que les podosomes qui sont des structures riches en actine, observés seulement dans les DC immatures (S Burns et al. 2001). Cette dissolution des podosomes permet aux DC de migrer, notamment au niveau des ganglions lymphatiques (van Helden et al. 2006; Nobile et al.

2008). La maturation induit également la formation d'extensions cytoplasmiques, les dendrites, et l'augmentation de la mobilité (Banchereau & R M Steinman 1998). L'équipe du Pr Amigorena a émis l'hypothèse que ces dendrites pourraient être nécessaires à l'induction d'une réponse lymphocytaire T efficace. En effet, ils ont pu montrer qu'au sein des ganglions lymphatiques, les DC matures projettent, de façon aléatoire, leurs dendrites jusqu'à ce qu'elles rencontrent un lymphocyte T. Ce contact déclenche la polarisation de l'ensemble des dendrites autour de ce lymphocyte et la DC va se déplacer vers le lymphocyte pour être entièrement en contact avec cette cellule (Benvenuti et al. 2005). L'ensemble de ces modifications met en jeu le réarrangement du cytosquelette d'actine (Trombetta & Ira Mellman 2005; Watts et al. 2007) qui est principalement contrôlé par l'activité des protéines de la famille des Rho GTPase (Etienne-Manneville & A. Hall 2002).

✓ La perte de leur capacité à capturer les antigènes et une augmentation de la stabilité des complexes CMH/peptides en surface afin d'optimiser la présentation aux lymphocytes T (Delamarre & Ira Mellman 2011).

✓ L'augmentation de l'expression des molécules de costimulation telles que CD40, CD80, CD86 et les CMH de classe I et II.

✓ L'induction de la production de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-12, ce qui permet aux DC de présenter les peptides antigéniques aux cellules T de façon immunogénique (Banchereau & R M Steinman 1998).

✓ Le changement d'expression des récepteurs aux chimiokines. Les DC matures vont notamment exprimer le récepteur CCR7 qui va leur permettre de migrer dans les ganglions lymphatiques, en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21 sécrétées au niveau des zones T des ganglions lymphatiques et par les cellules endothéliales lymphatiques en condition inflammatoire (Sozzani 2005).

3. Activation des APC du donneur et du receveur

Lors de l'allogreffe, les APC du donneur, notamment les DC, sont activées au sein du greffon. Elles sécrètent alors des cytokines proinflammatoires, sur-expriment les molécules de costimulation B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) et les CMH de classe II couplés à des peptides antigéniques du donneur. Les DC acquièrent des propriétés de migration et expriment le récepteur aux chimiokines CCR7. En réponse aux CCL19 et CCL21, elles migrent du greffon vers les organes lymphoïdes drainants. Les DC présentent alors les antigènes du donneur via les CMH de classe II et I, respectivement aux lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ alloréactifs du receveur. Ce mécanisme de reconnaissance constitue la présentation directe des antigènes du

donneur au receveur (Figure 2). Cette voie de présentation ne répond pas à la règle de restriction du CMH classique qui impose aux lymphocytes T d'exprimer un TCR qui reconnaît un CMH du "soi". Dans le cas de la présentation directe, cette interaction CMH-TCR s'explique par l'existence de cellules T capables de reconnaître par mimétisme moléculaire un CMH qui n'est pas du "soi". Cette reconnaissance peut être dépendante ou non du peptide porté par le CMH. Cette présentation directe ne nécessitant pas l'apprêtement de l'alloantigène, et l'existence d'un grand nombre de lymphocytes alloréactifs (jusqu'à 20% des lymphocytes T) (Suchin et al. 2001), font de la réponse allogénique directe une réaction rapide et intense (Afzali et al. 2007). Son importance dans le rejet aigu a été mise en évidence par l'étude de Lafferty, montrant que la déplétion des leucocytes du donneur empêchait le rejet d'allogreffes thyroïdiennes et que le transfert des APC (macrophages) rétablissait ce rejet (Talmage et al. 1976). Cette présentation directe semble majoritaire dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative et dans le rejet aigu à court terme lors de greffes incompatibles pour le CMH (M. Y. Braun et al. 1993).

Cependant, le nombre de leucocytes du donneur et leur durée de vie étant limitée, le rôle de la présentation directe par les APC du donneur dans le rejet décroît au court du temps (G Benichou 1999). Il est proposé que les APC (DC, monocytes, LB) du receveur, attirées par un environnement pro-inflammatoire, infiltrent le greffon (Penfield et al. 1999). Ensuite, ces cellules, notamment les DC, vont capter localement les antigènes majeurs ou mineurs du donneur rendus accessibles suite à la destruction des cellules du donneur provoquée par les événements évoqués précédemment (donneurs cadavériques, chirurgie et ischémie reperfusion). Les DC vont ensuite migrer dans les ganglions lymphatiques, apprêter les antigènes en peptides antigéniques et les présenter sur les molécules de CMH qu'elles vont porter en surface afin de les présenter aux cellules T (K Inaba et al. 1998; Elizabeth Ingulli 2010). Ce n'est que très récemment que l'équipe du Dr P. Bousso a réellement confirmé ce scénario en transplantation à l'aide de la microscopie biphotonique. En effet, ils ont mis en évidence une infiltration rapide des greffes de peau chez la souris par les DC et les monocytes inflammatoires du receveur. Ces cellules migrent ensuite vers les ganglions drainant la greffe et présentent les alloantigènes aux lymphocytes T alloréactifs (Celli et al. 2011). Ce mécanisme de présentation par les APC du donneur représente la présentation indirecte (Figure 2). L'alloreconnaissance indirecte nécessite la captation d'antigènes exogènes, ce qui va favoriser la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4⁺ via les molécules de CMH de classe II. La présentation par les molécules de CMH de classe I peut

également avoir lieu via un mécanisme appelé cross-présentation (Morón et al. 2004), effectué par les APC et qui peut également être réalisé par les cellules endothéliales (Limmer et al. 2000). La cross-présentation permet d'activer les $CD8^+$ alloréactifs (M L Albert et al. 1998). Ce mécanisme a également été observé lors de l'étude du Dr P. Bousso qui montre l'infiltration rapide des greffes par des cellules $CD8^+$ du donneur activées par la cross-présentation (Celli et al. 2011). La présentation indirecte a été associée au rejet chronique (G Benichou 1999) mais également au rejet aigu chez le rongeur (Fangmann et al. 1992) et chez l'homme (Z. Liu et al. 1996).

Un troisième mécanisme de présentation des alloantigènes, la présentation semi-directe a été décrite par l'équipe de Robert Lechler. Ils ont montré la capacité *in vivo* et *in vitro* des DC du receveur à capter des complexes CMH-peptide allogéniques intacts venant de cellules (DC, cellules endothéliales) du donneur. Ces DC sont ensuite capables d'activer de façon directe des cellules T spécifiques de l'alloantigène. Ce mode de présentation semi-directe permet de mieux comprendre certaines études comme celle de Lee et ses collègues qui montrait la capacité des lymphocytes $CD4^+$ de spécificité indirecte à amplifier la réponse cytotoxique de cellules $CD8^+$ de spécificité directe (R. S. Lee et al. 1994). En effet, les DC peuvent stimuler des cellules T à la fois de façon directe et indirecte, permettant ainsi aux lymphocytes T $CD4^+$ activés par la voie indirecte de fournir un signal d'activation aux $CD8^+$ de spécificité directe. Actuellement, le rôle de cette troisième voie de l'allorecognition dans un contexte de rejet n'a pas encore été démontré.

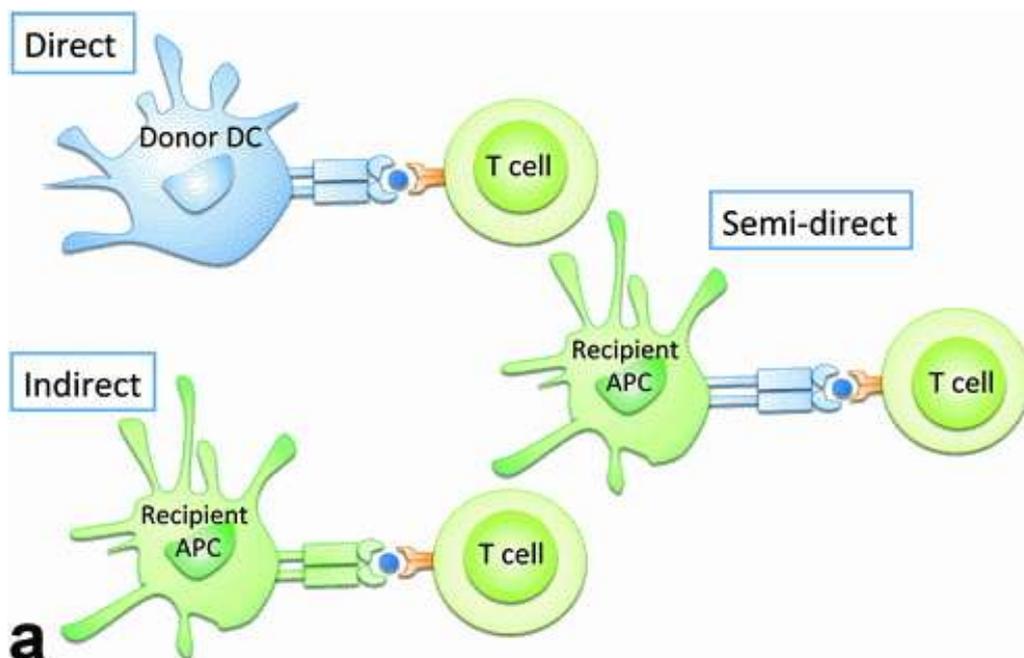


Figure 2: Schéma représentant les trois voies de présentation allogéniques, directe, indirecte et semi-directe d'après Wood et al. (Kathryn J Wood & R. Goto 2012).

4. Phase effectrice de la réponse immunitaire adaptative

4.1. La réponse lymphocytaire T

(a). Activation de la réponse lymphocytaire T

L'allorecognition des antigènes du donneur par les lymphocytes T naïfs n'est pas suffisante pour induire une activation complète de ces cellules. En effet, les lymphocytes T doivent recevoir trois signaux d'activation, le premier signal étant apporté par l'interaction du TCR des cellules T avec le complexe CMH-peptide antigénique porté par les DC. Cependant, l'activation via le TCR doit être associée à un second signal fourni par l'interaction des molécules de costimulation présentes sur les DC, avec leurs ligands exprimés par les cellules T (Janeway & Bottomly 1994). Il existe de nombreuses molécules de costimulation (Frauwirth & Craig B Thompson 2002) qui peuvent être divisées en deux groupes. On trouve notamment la famille B7, dont les membres les plus décrits sont B7.1 et B7.2. Ces molécules sont portées par les APC et se lient aux molécules CD28 et CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) (CD152) exprimées par les lymphocytes T. On trouve également la famille du TNF dont le CD40 présent sur les APC est l'un des membres le plus décrit et se lie au CD154 (CD40L) des cellules T. La signalisation via la molécule CD28 permet de diminuer le seuil d'activation de la cellule T. Ainsi, l'interaction TCR/CMH associée à la costimulation permet d'activer, dans les lymphocytes T, des cascades de signalisation entraînant l'activation de facteurs de transcription, tels que NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), NF κ B et AP-1. Ces facteurs participent à la production de la cytokine IL-2 et à l'augmentation de l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25). La production d'une grande quantité d'IL-2 participe au troisième signal nécessaire à la prolifération et la survie des cellules T activées (Beverly et al. 1992). La signalisation via la molécule CD28 permet également l'induction de l'expression de la molécule CD40L qui, en se liant au CD40 présent sur les APC, fournit un signal positif à la cellule T ainsi qu'à l'APC (I. S. Grewal & R A Flavell 1996). En retour, celle-ci va augmenter l'expression de ses molécules de costimulation B7 et va permettre d'amplifier l'activation des cellules T. Ces dernières peuvent également exprimer des molécules de costimulation négatives telles le CTLA-4 et la molécule PD-1 (Programmed Death-1) qui sont importantes pour réguler négativement leur activation (Walunas et al. 1996; Latchman et al. 2001).

La costimulation étant une composante importante de l'induction d'une réponse lymphocytaire T efficace, elle est impliquée dans l'induction de la réponse effectrice contre le greffon. En effet, différents groupes ont mis en évidence que le blocage de la costimulation

pouvait permettre de réguler la réponse contre le greffon. Par exemple, l'utilisation de la molécule CTLA4-Ig qui se fixe sur les molécules B7 et bloque l'interaction B7-CD28, permet d'éviter le rejet aigu (Baliga et al. 1994) et le rejet chronique (Glysing-Jensen et al. 1997) dans des modèles animaux.

(b). Polarisation de la réponse lymphocytaire T

Lors de son activation, la cellule T naïve (Th0), peut se différencier en différents types de cellules effectrices, les cellules T "helper" (Th), les cellules T cytotoxiques (CTL) ou les cellules T régulatrices. Cette différenciation est dépendante des cytokines présentes dans l'environnement et des autres signaux transmis par la DC (costimulation positive ou négative) aux cellules T. Je traiterai des populations régulatrices dans le chapitre suivant, "La Tolérance".

Les différentes cellules T effectrices se distinguent par leur profil cytokinique, leur fonction et sont caractérisées par l'expression de facteurs de transcription particuliers. Les cellules T CD4⁺ peuvent se différencier en cellules T helper de différents types: Th1, Th2, Th17 et Tfh (T follicular helper) (Figure 3). Plus récemment, d'autres types de T helper ont été mis en évidence tels que les Th9 (Dardalhon et al. 2008) et les Th22 (S. Eyerich et al. 2009).

La production d'IL-12 par les DC activées et la production d'interféron- γ (IFN γ) par les cellules NK favorisent la polarisation de la réponse T vers le type **Th1** qui vont à leur tour produire de l'IFN γ et exprimer le facteur de transcription T-bet (T-box expressed in T cells) (Szabo et al. 2000). Elles vont favoriser la production d'anticorps IgG2a et activer les cellules phagocytaires. En transplantation, les cellules Th1 participent au rejet aigu via la production d'IFN γ , mais des études montrent qu'elles ont également un rôle dans le rejet chronique (D'Elis et al. 1997; J. Karczewski et al. 2008; Ballet et al. 2009). La production d'IFN γ par les cellules Th1 contribue également à l'activation des cellules T CD8⁺ cytotoxiques (CTL).

Les **CTL** sont issues des cellules T CD8⁺ naïves activées via l'interaction TCR-CMH de classe I présentée par des DC activées et de façon dépendante de l'assistance de cellules Th1 (Ridge et al. 1998). Les CTL exercent leur fonction cytotoxique en utilisant la voie Fas/FasL ou Granzyme B/Perforine (Kägi et al. 1994; Trapani & Smyth 2002) afin de lyser des cellules cibles qu'elles reconnaissent via l'interaction avec les CMH de classe I. Les CTL vont donc induire la destruction du greffon par la reconnaissance des antigènes du donneur présentés par les CMH de classe I portés par les cellules du greffon.

En présence d'IL-4, les cellules T CD4⁺ naïves se différencient en cellules **Th2** et

expriment le facteur de transcription GATA-3 (GATA-binding-factor 3) (K. M. Murphy & Reiner 2002). Les cellules Th2 qui sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de IL-10 et de l'IL-13 (Le Gros et al. 1990; Swain et al. 1990) favorisent la production d'IgG1 par les LB (Rizzo et al. 1995). Les cellules Th2 ont été classiquement associées au rejet chronique (Koshiba et al. 2003; Illigens et al. 2009). Or, certaines thérapies favorisant la polarisation Th2 permettent de retarder le rejet aigu ou de favoriser l'induction de tolérance (Yin et al. 2010; Amarnath, Hao Chen, et al. 2011; Xie et al. 2011).

Les cellules **Th17** générées en présence de TGF- β et d'IL-6 expriment le facteur de transcription ROR γ T (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ isoform T) et le récepteur à l'IL-23. Elles produisent notamment de l'IL-17, de l'IL-22 et de l'IL-21 (P. R. Mangan et al. 2006). L'IL-21 permet l'amplification de la différenciation Th17 et peut remplacer l'IL-6 lors de cette différenciation (Nurieva et al. 2007). L'IL-23 est responsable du maintien et de la survie des Th17 (Veldhoen et al. 2006). Ces cellules participent à l'élimination des pathogènes au niveau des muqueuses et jouent un rôle important dans de nombreuses maladies auto-immunes (MAI) (Bettelli et al. 2006; Yen et al. 2006). Elles sont également impliquées dans le rejet d'allogreffe, notamment en favorisant le recrutement de cellules neutrophiles (D. A. Rao et al. 2008). Elles ont été tout d'abord associées au rejet aigu (Antonysamy et al. 1999; Loong et al. 2002; Vanaudenaerde et al. 2006). Une étude du groupe de Thomson a pu mettre en évidence que le blocage de l'IL-17 par une protéine de fusion permet de prolonger la survie d'allogreffes cardiaques de souris. Dans cette même étude, ils ont montré que l'IL-17 pourrait favoriser le rejet en stimulant la maturation des cellules dendritiques (Antonysamy et al. 1999). Les cellules TH17 semblent aussi jouer un rôle dans le rejet chronique, comme il est suggéré dans l'étude de Yuan et ses collègues. En effet, ils ont mis en évidence un rôle des TH17 dans l'augmentation des signes de vasculopathie chronique d'allogreffe chez la souris (X. Yuan et al. 2008).

Les cellules **Tfh** (T follicular helper) décrites récemment sont, comme leur nom l'indique, retrouvées dans les follicules des ganglions lymphatiques. Leur différenciation dépend des cytokines IL-6 et IL-21. Elles expriment le facteur de transcription BCL-6 (B cell lymphoma 6 protein) et le récepteur aux chimiokines CXCR5. Elles sont importantes dans la différenciation des LB en cellules mémoires et en plasmocytes de longue durée de vie, producteurs d'anticorps de haute affinité (Fazilleau et al. 2009). Ce rôle leur vaut d'être impliquées dans le rejet à médiation humorale, comme le montre l'étude de Colon et ses collègues. Ils ont mis en évidence qu'une population de cellules T allospécifiques peut se différencier en cellules T folliculaires et permettre la formation de centres germinatifs

nécessaires à la production d'anticorps anti-donneurs impliqués dans le rejet de l'allogreffe cardiaque de souris (Conlon et al. 2012).

Le développement de chacun de ces sous-types de cellules effectrices entraîne la production de cytokines qui favorisent la différenciation en ce même sous-type et inhibent celle en un sous-type différent. Cependant, le processus de différenciation vers un type de cellules T helper particulier ne semble pas définitif. Différentes études montrent l'existence d'une plasticité entre les divers types cellulaires. En effet, les cellules Th17 sont capables de dévier en cellules Th1 en absence de TGF- β et sous l'influence de l'IL-12 et de l'IL-23 (Y. K. Lee et al. 2009). De même, lors d'infections virales, les cellules Th2 peuvent dériver en cellules Th1 et exprimer le facteur de transcription T-bet et produire de l'IFN- γ (Hegazy et al. 2010). Elles peuvent aussi se différencier en cellules Th9 productrices d'IL-9 en présence de TGF- β (Veldhoen et al. 2008). Il semblerait que les cellules Tfh soient capables de se différencier en Th1, Th2 et Th17 et inversement, que les autres types de cellules puissent devenir des cellules Tfh (K. T. Lu et al. 2011). Il existe également une plasticité entre les cellules effectrices et les cellules régulatrices. Dans certaines conditions cytokiniques, les cellules T régulatrices peuvent dévier en cellules Th17 (L. Xu et al. 2007; Gautreau et al. 2011). À l'inverse, sous l'influence de l'interaction PD-1/PDL-1, les cellules Th1 peuvent devenir des cellules régulatrices Foxp3⁺ (Amarnath, Mangus, et al. 2011).

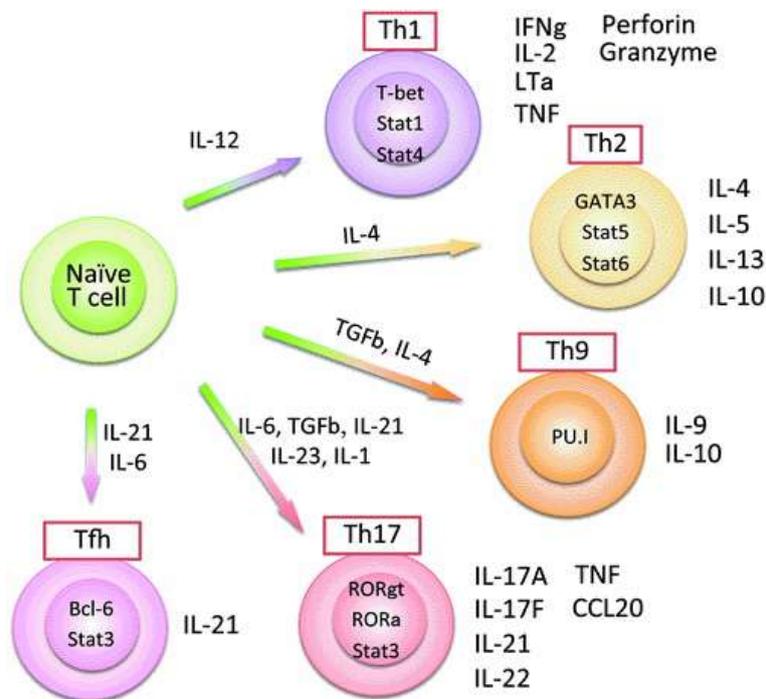


Figure 3: Schéma représentant les différentes voies de différenciation des cellules T CD4⁺ d'après Wood et al. (Kathryn J Wood & R. Goto 2012).

4.2. La réponse lymphocytaire B

La réponse immunitaire humorale est induite par les LB qui exercent leur fonction via la production d'anticorps. Ces anticorps sont des immunoglobulines (Ig) composées d'une partie constante correspondant à l'isotype responsable de la fonction de l'anticorps et d'une partie variable qui permet la reconnaissance et la fixation spécifique des antigènes (Figure 4). La production de ces anticorps nécessite l'activation et la différenciation des LB naïfs suite à une rencontre avec l'antigène pour lequel ils sont spécifiques.

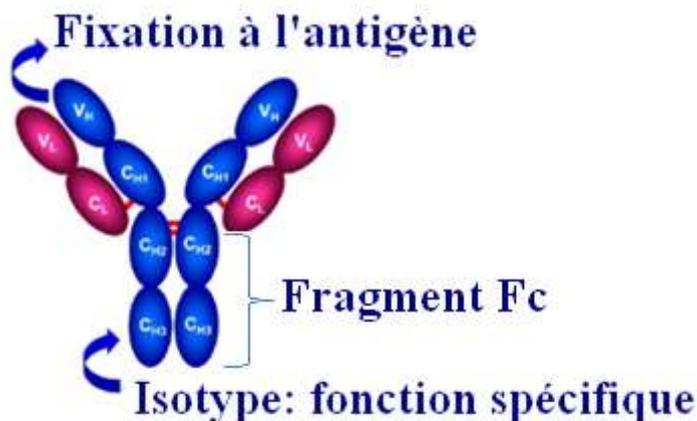


Figure 4: Représentation schématique d'un anticorps.

V=partie variable; C=partie constante; H=chaîne lourde (heavy chain); L=chaîne légère (Light chain), Fc= Fragment cristallisable.

(a). Activation et différenciation des lymphocytes B

L'activation des LB naïfs a lieu au niveau des follicules situés dans la zone corticale des organes lymphoïdes secondaires (OLS) (Figure 5). Cette activation est déclenchée par la rencontre du LB avec l'antigène pour lequel il est spécifique. Chaque LB possède une spécificité antigénique unique déterminée par l'expression de son BCR (récepteur des cellules B). Ce récepteur est une Ig de surface d'isotype IgM ou IgD qui leur permet de reconnaître et de capter un antigène particulier. Lors de la greffe, les antigènes du donneur sont drainés par la lymphe jusqu'aux OLS et sont alors accessibles aux LB. La reconnaissance de ces antigènes par les LB alloréactifs via le BCR va permettre de leur fournir le premier signal d'activation. Ce signal n'est pas suffisant pour induire une activation complète. Les LB présentent l'antigène capté et apprêté à leur surface sur les molécules de CMH de classe II et migrent au niveau de l'interface du follicule et de la zone T de l'OLS. Ils peuvent alors interagir avec les lymphocytes T CD4⁺ de même spécificité antigénique. Ce contact cellulaire fournit le second signal d'activation grâce à l'interaction TCR/CMH/peptide et l'interaction des molécules de costimulation (CD40L/CD40, ICOS/ICOSL, CD28/B7) (Garside et al.

1998; Okada et al. 2005) associée à la production de cytokines par les cellules T (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10) (Figure 5 n°1). Les LB migrent ensuite dans la région centrale du follicule où ils prolifèrent rapidement (Figure 5 n°2) et enclenchent le mécanisme de recombinaison de classe des Ig (MacLennan et al. 2003; T. D. Chan et al. 2009) contrôlé par l'enzyme AID (activation-induced cytidine deaminase). Ce mécanisme consiste à modifier l'isotype IgM ou IgD en un autre isotype IgG, IgA ou IgE tout en conservant la spécificité antigénique. La recombinaison vers un isotype particulier est principalement gouvernée par la production des cytokines lors de l'interaction lymphocyte B-lymphocyte T. Chaque isotype confère à l'anticorps des propriétés particulières comme la fixation du complément pour les IgG, la forte liaison aux mastocytes et aux polynucléaires basophiles pour les IgE ou encore, le passage de la barrière épithéliale pour les IgA.

Il existe trois voies de différenciation possibles pour les LB activés (Christopher C Goodnow et al. 2010). Ils peuvent se différencier en cellules B mémoires précoces, en plasmocytes extrafolliculaires ou en cellules B qui prolifèrent et forment une structure appelée centre germinatif (GC), qui permet de générer des cellules sécrétrices d'Ig de forte affinité. Certaines études suggèrent que la qualité et la stabilité de l'interaction lymphocyte B-lymphocyte T ainsi que la production des cytokines durant l'interaction, semblent influencer le devenir des LB vers une de ces trois voies (T. D. Chan et al. 2009; Paus et al. 2006). La différenciation en LB du centre germinatif ou en plasmocyte extrafolliculaire nécessite respectivement l'expression des facteurs de transcription Bcl-6 et BLIMP-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) (codé par le gène *Prdm1*) (Tunyaplin et al. 2004; Sciammas & Davis 2004; Cimmino et al. 2008), dont l'expression dépend du facteur de transcription IRF4 et de la cytokine IL-21 sécrétée par les cellules T (U. Klein et al. 2006; M. Saito et al. 2007; Zotos et al. 2010). Les plasmocytes extrafolliculaires ont une courte durée de vie, ils fournissent une réponse rapide qui sera cependant moins efficace en raison de la faible affinité des anticorps qu'ils produisent. Les LB des GC situés dans la zone sombre, appelés centroblastes, vont initier plusieurs cycles de prolifération au cours desquels ils vont subir le phénomène d'hypermutation somatique. Ce mécanisme consiste à introduire des mutations dans les gènes codant la partie variable des Ig afin d'augmenter la diversité et l'affinité des Ig générées. Ces nouveaux clones de LB (centrocytes) migrent alors dans la zone claire du GC dans laquelle aura lieu la sélection des cellules possédant des Ig de forte affinité (Figure 5 n°3). L'hypothèse actuelle suggère que cette sélection repose sur une compétition entre les nouveaux clones générés pour interagir avec les lymphocytes T folliculaires qui vont alors leur fournir un signal de survie. En effet, les clones produisant une Ig de forte affinité

semblent posséder une meilleure capacité à capter les antigènes présentés par les DC folliculaires (Suzuki et al. 2009), à les apprêter et les présenter aux cellules T folliculaires (C. D. C. Allen et al. 2007; O'Neill et al. 2009; Victora et al. 2010). Ces LB sélectionnés se différencient ensuite en cellules de longue durée de vie de type mémoire ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Figure 5 n°4).

La plupart des plasmocytes dérivés du GC migrent dans la MO et une plus faible proportion rejoint la rate. Leur survie dépendra notamment de la production des molécules APRIL (a proliferation-inducing ligand) et BAFF (B cell-activating factor) par les cellules stromales (Benson et al. 2008) dans la MO et par les DC CD11c⁺ dans la rate (Mackay & Schneider 2009). Les plasmocytes dérivés des GC sont responsables de la production et du maintien de la quantité d'anticorps en périphérie.

Les cellules mémoires générées suite à la formation du GC, vont se localiser au niveau des organes lymphoïdes mais également au niveau des organes non lymphoïdes (Kurosaki et al. 2010). Comme leur nom l'indique, ces cellules constituent la mémoire de la première rencontre avec l'antigène et sont capables d'induire une réponse rapide et efficace lors d'une seconde rencontre avec ce même antigène en se différenciant rapidement en plasmocyte sécréteur d'anticorps de forte affinité.

En transplantation, la réponse à médiation humorale est une composante majeure du rejet d'allogreffe (Robert B Colvin & R Neal Smith 2005). Elle est observée précocement lors du rejet hyper aigu induit par la présence d'anticorps anti-donneurs, les DSA, préformés avant la greffe. Plus tardivement, elle peut participer au rejet aigu et au rejet chronique (Paul I Terasaki & J. Cai 2008) via la formation d'anticorps anti-donneurs générés post-greffe, les DSA de novo, et principalement dirigés contre les molécules du CMH du donneur. En clinique, la présence de DSA est généralement associée à un mauvais pronostic de la survie de la greffe (A. Piazza et al. 2001; Haririan et al. 2009). Ces anticorps dirigés contre les cellules du greffon vont générer une toxicité et induire le rejet. Les mécanismes homéostatiques contrôlant les populations de plasmocytes ou de cellules mémoires ainsi que leur rôle respectif dans le niveau de production des DSA sont encore peu connus. En effet, le contexte immunologique d'une greffe est très spécifique car les alloantigènes sont présents en permanence. Ils entraînent une stimulation continue des LB et notamment des cellules mémoires qui peuvent donc également être responsables du maintien de la production de DSA. Or, ces connaissances sont importantes en transplantation car elles ont une implication thérapeutique. En effet, l'utilisation de certaines molécules, comme l'anti-CD20 visant à dépléter les LB afin de diminuer la production des DSA, ne ciblent pas l'ensemble des LB. Il

est donc nécessaire d'identifier la population responsable de la production d'anticorps délétères pour le greffon afin d'utiliser un traitement adapté.

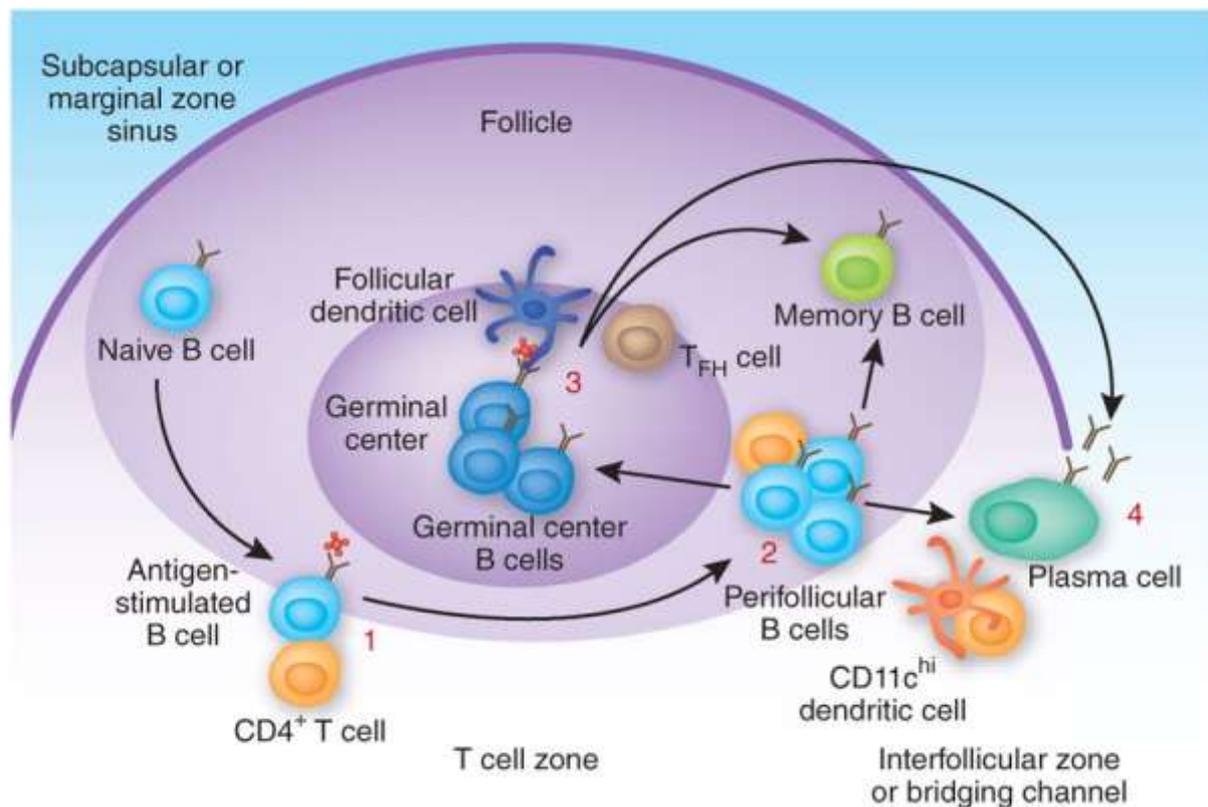


Figure 5: Schéma de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires d'après Goodnow et al. (Christopher C Goodnow et al. 2010).

(b). Phase effectrice de la réponse lymphocytaire B

L'action des anticorps, produits par les plasmocytes, dépend principalement de deux mécanismes qui sont l'activation de la cascade protéolytique du complément et le mécanisme de "cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps" (ADCC). Ces mécanismes cytotoxiques sont déclenchés par la fixation des alloanticorps, notamment sur les molécules de CMH de classe I et II du donneur exprimées par les cellules endothéliales du greffon.

La cytotoxicité envers les cellules du greffon peut donc être induite via le mécanisme d'ADCC. Le fragment Fc des anticorps fixés sur les cellules cibles est reconnu par les cellules NK et les macrophages qui expriment les récepteurs aux fragments Fc. Cette reconnaissance active les NK et les macrophages, qui vont lyser les cellules cibles via la voie granzyme/perforine et induire la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que NO, ROS et TNF- α .

L'activation de la voie classique (dépendante des anticorps) du complément est induite via la fixation du composant C1 sur le fragment Fc des anticorps couplés à leur antigène. La

cascade enzymatique du complément aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (C5b,6,7,8,9) qui forme un canal dans la membrane cellulaire, ce qui endommage et active l'endothélium (S. Nakashima et al. 2002). Les cellules endothéliales activées produisent des cytokines proinflammatoires l'IL-1, l'IL-8 et le MCP-1 qui attirent les cellules neutrophiles et les monocytes dans la greffe et favorisent la perméabilité vasculaire, ainsi que la sécrétion de facteurs pro-coagulants. Cette cascade d'évènements aboutit à des hémorragies, à la thrombose vasculaire et provoque l'ischémie et le rejet du greffon (Rocha et al. 2003). L'activation de la voie du complément génère également des composants tels que le C4a, C4b, C3a, C3b et C5a qui participent aux dommages tissulaires. Le C3a, le C4a et le C5a sont des anaphylatoxines qui favorisent la perméabilisation cellulaire, la chimiotaxie et participent ainsi au recrutement des leucocytes dans le greffon. Le C3b et le C4b produits se fixent aux cellules cibles et aux anticorps favorisant la destruction du greffon par les cellules phagocytaires portant les récepteurs au complément. Le C4d issu de l'hydrolyse du C4b se dépose sur les cellules du greffon et constitue un marqueur de l'activation de la réponse humorale (Robert B Colvin & R Neal Smith 2005). Comme la présence de DSA, la détection de dépôt de C4d sur les cellules du greffon constitue un mauvais pronostic. En cas de rejet, il permet de fournir une indication sur les mécanismes induisant ce rejet et permet ainsi d'adapter les traitements immunosuppresseurs. Mais il est important de noter qu'étant données les limites techniques de détection du C4d et l'existence d'une réponse effectrice indépendante du complément, l'absence de ce dépôt n'exclut pas l'implication des anticorps dans le rejet (Haririan et al. 2009). De plus, l'équipe d'Halloran a mis en évidence que la modification de l'expression des gènes liés notamment à la dysfonction et l'activation des cellules endothéliales (ENDATs: endothelial associated transcripts) dans le greffon, semble être un meilleur signe de la présence d'un rejet à médiation humorale que la simple détection de DSA et du dépôt de C4d (Sis et al. 2009). En effet, le seul fait de la fixation des DSA sur les molécules du CMH du donneur peut activer les cellules endothéliales de façon pro-inflammatoire et induire un signal intracellulaire, favorisant la prolifération de ces cellules et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et pro-thrombotiques (Yamakuchi et al. 2007; F. Li et al. 2009). De plus, l'effet délétère des DSA est influencé par leur concentration, leur affinité, leur isotype et les groupements glycanes qu'ils portent au niveau du fragment Fc (A. T. Chang & Platt 2009; X Zhang & E F Reed 2009)

Il existe différentes stratégies afin de diminuer le niveau de DSA chez les patients transplantés. Comme je l'ai cité précédemment, une des approches est d'induire la déplétion des LB en utilisant des anticorps comme l'anti-CD20 (Rituximab). Cependant, cette stratégie

ne permet pas d'éliminer directement les DSA circulants car l'anti-CD20 ne permet pas d'éliminer les plasmocytes. Néanmoins, il déplete les cellules mémoires permettant ainsi d'empêcher la différenciation de ces cellules en plasmocytes sécréteurs de DSA. D'autres stratégies comme la plasmaphérèse ou l'injection en intraveineuse d'immunoglobulines polyclonales (IVIg) permettent, quant à elles, d'éliminer plus rapidement les DSA circulants. L'IVIg consiste à injecter de fortes doses d'IgG humaines purifiées à partir de nombreux donneurs sains. Il est suggéré que l'effet immunosuppresseur de ces Ig passe par leur fixation sur les DSA ce qui entrave leur fonction mais également par des mécanismes régulateurs induits par la fixation de leur fragment Fc (Fragment cristallisable) (Figure 4) sur les récepteurs aux Fc présents sur de nombreuses cellules comme les LB, les DC et les macrophages (Anthony, Nimmerjahn, et al. 2008). D'autres stratégies faisant actuellement l'objet d'études cliniques semblent prometteuses. Parmi elles, se trouve l'inhibiteur du protéasome (Bortezomib) qui bloque la production d'anticorps et induit l'apoptose des plasmocytes (Perry et al. 2009) ou encore les molécules (ex: Belimumab, BR3-Fc) bloquant la voie du facteur BAFF impliqué dans la survie, la prolifération et la maturation des LB (Vugmeyster et al. 2006). La fonction des DSA passant par l'activation du complément, un anticorps monoclonal humanisé ciblant le composé C5 du complément (Eculizumab) est également en étude. Il permet d'inhiber la formation du complexe d'attaque membranaire (Stegall et al. 2011).

C. La Tolérance

La tolérance en immunologie se définit par la non-réponse du système immunitaire à un antigène. Elle a pour but de permettre au système immunitaire de distinguer les antigènes du "soi", du "non soi", et d'induire une réponse uniquement contre ce dernier. La tolérance en transplantation correspond à l'acceptation du greffon sans signe de rejet en l'absence d'IS, tout en maintenant une réponse envers d'autres antigènes étrangers. L'induction de la tolérance en transplantation se base principalement sur la connaissance des mécanismes de tolérance immunologique. Il existe deux types de tolérance qui sont la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

I- La tolérance centrale

La tolérance centrale met en jeu des mécanismes ayant pour objectif l'élimination de cellules T et B autoréactives, c'est-à-dire, capables de reconnaître les antigènes du soi.

Les lymphocytes T et B sont issus de précurseurs lymphoïdes qui sont générés dans la moelle osseuse. Les cellules T et B se développent dans les organes lymphoïdes primaires qui sont respectivement, le thymus et la moelle osseuse. Les précurseurs vont subir, au sein de ces organes, différentes étapes de sélection afin de générer un répertoire T et B fonctionnel, non autoréactif et capable de reconnaître une grande variété d'antigènes étrangers. La reconnaissance des antigènes passe par les récepteurs membranaires des lymphocytes T et B, respectivement le TCR et le BCR. Ces récepteurs sont le résultat du réarrangement somatique des gènes codant pour les chaînes qui les composent. Le réarrangement des gènes dépendant des enzymes RAG (recombination activating gene) a lieu entre les différents segments V, D, J, C (Variable, Diversité, Jonction, Constante) qui codent pour les régions variables et constantes de ces récepteurs. Etant donné le caractère aléatoire du phénomène de réarrangement somatique, la sélection des futurs lymphocytes permet de ne conserver que les cellules ayant un récepteur fonctionnel et non autoréactif. La reconnaissance de l'antigène par les récepteurs TCR et BCR se réalise via leur région variable. Alors que le BCR des LB est capable de reconnaître un Ag non modifié, le TCR ne peut interagir qu'avec un Ag apprêté et présenté sur un CMH porté par une APC. Ainsi, la première étape de sélection des lymphocytes T est basée sur cette première contrainte.

1. Sélection des lymphocytes T

Dans le thymus, les précurseurs des lymphocytes T, les thymocytes double-positifs ($CD4^+CD8^+$) exprimant à leur surface le TCR issu du réarrangement aléatoire de ses gènes, vont interagir avec les cellules épithéliales corticales thymiques (cTEC) qui expriment des complexes CMH/peptide du soi (Hogquist & Bevan 1996). Seuls les thymocytes possédant un TCR capable de reconnaître un peptide présenté par un CMH du soi vont recevoir un signal de survie (Fink & Bevan 1978; C Benoist & D Mathis 1989). Selon le type de CMH de classe I ou II avec lequel le TCR interagit, les cellules T double-positives vont conserver l'expression d'un seul marqueur, le CD8 ou le CD4. Les cellules n'interagissant pas avec ce complexe ou avec une affinité trop faible, meurent par apoptose dans le cortex thymique (Figure 6). Cette première étape de sélection est appelée la sélection positive. Les cellules sélectionnées positivement (moins de 5% du pool de thymocytes doubles positifs) migrent dans la médulla du thymus où aura lieu la sélection négative. Celle-ci a pour objectif l'élimination des cellules interagissant avec une trop forte affinité avec les complexes CMH/peptides du soi. Ces complexes sont présentés par les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTEC) mais aussi par les cellules dendritiques du thymus (G. Anderson et al. 1998). Ce mécanisme majeur de la tolérance centrale permet l'élimination des lymphocytes T autoréactifs. Lorsqu'il y a un dysfonctionnement dans ce système de sélection, comme une déficience au niveau du gène AIRE (AutoImmune REgulator), les cellules autoréactives ne sont pas convenablement éliminées et sont responsables de MAI (Roitt & A. Cooke 1987). En effet, le gène AIRE permet l'expression par les mTEC d'antigènes uniquement présents dans certains tissus spécifiques, les TSA (tissus specific antigen), et permet donc une élimination optimale des cellules T autoréactives (Zuklys et al. 2000; Gavanescu et al. 2007). Chez la souris, il a été décrit qu'un défaut de ce gène se traduit par le développement de MAI (M. S. Anderson et al. 2002; Liston et al. 2003; Kuroda et al. 2005). Une pathologie similaire est décrite chez l'homme (Aaltonen et al. 1994), l'APECED (Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy). Cependant, l'expression des TSA 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. 2005).

Les lymphocytes T ayant franchi ces étapes de sélection (environ 3%) migrent ensuite vers les OLS (Goldrath & Bevan 1999).

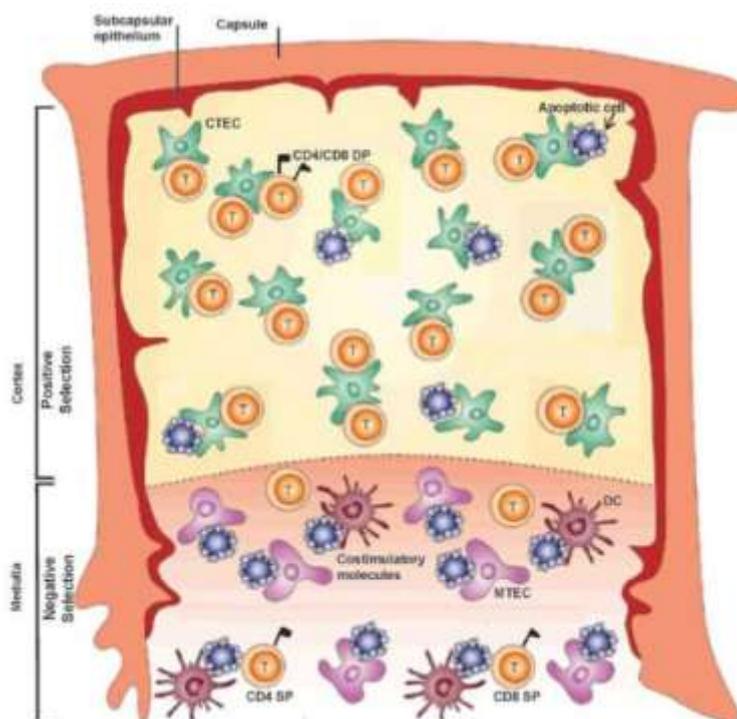


Figure 6: Schéma représentant la sélection positive et négative des lymphocytes T dans le thymus d'après Griesemer et al. (Griesemer et al. 2010).

DP=doublé positive (CD4 et CD8), SP=simple positive (CD4 ou CD8), CTEC=cellules épithéliales corticales thymiques, MTEC=cellules épithéliales médullaires thymiques.

La sélection positive dans le thymus permet aussi de générer des lymphocytes T régulateurs (Treg) dits naturels (nTreg) (C.-S. Hsieh et al. 2012). Les nTreg expriment fortement la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25⁺) ainsi que le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3) (S Sakaguchi et al. 1995). Initialement décrits comme provenant de cellules double-positives (CD4⁺CD8⁺) (Bensinger et al. 2001; Liston et al. 2008), il semble que ces nTreg soient principalement issus de cellules sélectionnées positivement CD4⁺ (H. M. Lee & C.-S. Hsieh 2009). La génération des nTreg nécessite la présence des cellules stromales thymiques: les DCs du thymus (N. Watanabe et al. 2005) et les mTEC qui vont favoriser l'expression du facteur de transcription FoxP3 par les précurseurs des cellules CD4⁺FoxP3⁺ (Aschenbrenner et al. 2007; Shimon Sakaguchi et al. 2010) de façon dépendante de la lymphopœïétine stromale thymique (TSLP) (N. Watanabe et al. 2005). L'interaction du TCR exprimé par les précurseurs de Treg avec le CMH/peptide du soi présent sur les cellules stromales thymiques, semble avoir un rôle majeur dans leur développement (Picca et al. 2006). De plus, l'interaction avec ces cellules fournit un signal de costimulation qui est nécessaire au développement des nTreg. En effet, des études montrent qu'une déficience pour certaines molécules de costimulation telles que le CD40 ou le CD28, diminue le nombre de

cellules Treg CD4⁺CD25⁺ dans le thymus et en périphérie (Shimon Sakaguchi 2005). Certaines cytokines, telles que l'IL-2, IL-7 ou IL-15, semblent également impliquées voire nécessaires au développement de ces nTreg (Burchill et al. 2007; Malek et al. 2008). Les nTreg vont intégrer la circulation sanguine et migrer dans les OLS (rate et ganglions) et dans d'autres organes tels que le foie ou la peau. Leur rôle consiste notamment à neutraliser l'action de cellules autoréactives qui ont échappé à la sélection thymique et qui sont potentiellement responsables de MAI (Samy et al. 2005). Les nTreg peuvent également migrer sur les sites inflammatoires et réguler la réponse immune induite par une infection (Belkaid et al. 2002).

2. Sélection des lymphocytes B

Dans la moelle osseuse, le développement des LB est aussi soumis à différentes étapes de sélection afin de générer un répertoire primaire de LB immatures, non auto-réactifs. Au sein de ce répertoire, chaque LB exprime un récepteur unique, le BCR, capable de reconnaître un antigène du "non-soi". Le BCR est une glycoprotéine appartenant à la super-famille des Ig. Il est composé de deux chaînes lourdes identiques (μ ou δ) et de deux chaînes légères (λ ou κ) elles aussi identiques, issues du réarrangement somatique VDJC des gènes qui les codent. Le développement des LB passe par différents intermédiaires (Figure 7), dont les cellules pro-B, les pré-B et les LB immatures, qui correspondent aux différentes étapes de réarrangement VDJC. La sélection positive des LB permet de conserver seulement les précurseurs pré-B possédant un pré-récepteur fonctionnel, le pré-BCR. Ce pré-récepteur est composé de deux chaînes lourdes μ identiques réarrangées et de deux chaînes légères de substitution identiques composées des chaînes VpréB et λ_5 . L'expression d'un pré-BCR fonctionnel est essentielle à la différenciation du précurseur B. Le pré-BCR doit pouvoir induire une signalisation intracellulaire efficace via les molécules membranaires qui lui sont associées, le CD79A (Ig α) et le CD79B (Ig β). Il était suggéré que l'expression du pré-BCR à la membrane était suffisante à cette signalisation. Or, des études réalisées par Schiff et ses collègues ont révélé que la Galectine-1 (Gal-1) soluble, produite par les cellules stromales de la moelle osseuse, pouvait agir comme un ligand du pré-BCR chez la souris et chez l'homme (Gauthier et al. 2002; B. Rossi et al. 2006). Gal-1 déclencherait la signalisation des pré-BCR via la formation de la synapse entre les pré-B et les cellules stromales. De plus, d'autres études utilisant des modèles murins transgéniques pour le BCR suggèrent la nécessité d'une reconnaissance à un antigène du soi par le pré-BCR pour favoriser la sélection positive du précurseur pré-B (Eschbach et al. 2011; Gaudin, M. Rosado, et al. 2004; Gaudin, Hao, et al. 2004). Ceux-ci

vont alors se différencier en pré-BII et vont proliférer pour enfin initier le réarrangement des gènes codant pour la chaîne légère κ . Le BCR complet, une Ig d'isotype μ (IgM), est exprimé à la membrane et les cellules deviennent des LB immatures qui vont alors devoir passer l'étape de la sélection négative. Les cellules qui vont reconnaître un autoantigène via leur BCR, avec une trop forte avidité, devront initier un nouveau réarrangement de gène codant pour la chaîne légère (λ) afin de former un nouveau BCR non autoréactif. C'est le phénomène de "receptor editing" (Gay et al. 1993; Radic et al. 1993; Tiegs et al. 1993). En cas d'échec, les lymphocytes seront neutralisés par anergie ou par apoptose (S B Hartley et al. 1993). Les LB ayant franchi les étapes de sélection sortent de la moelle osseuse et migrent en périphérie sous forme de LB transitionnels immatures. Cependant, certains LB autoréactifs échappent à la sélection négative. Le maintien de la tolérance implique donc des mécanismes qui ont lieu en périphérie afin de neutraliser ces LB potentiellement pathogènes (Parsons et al. 2012).

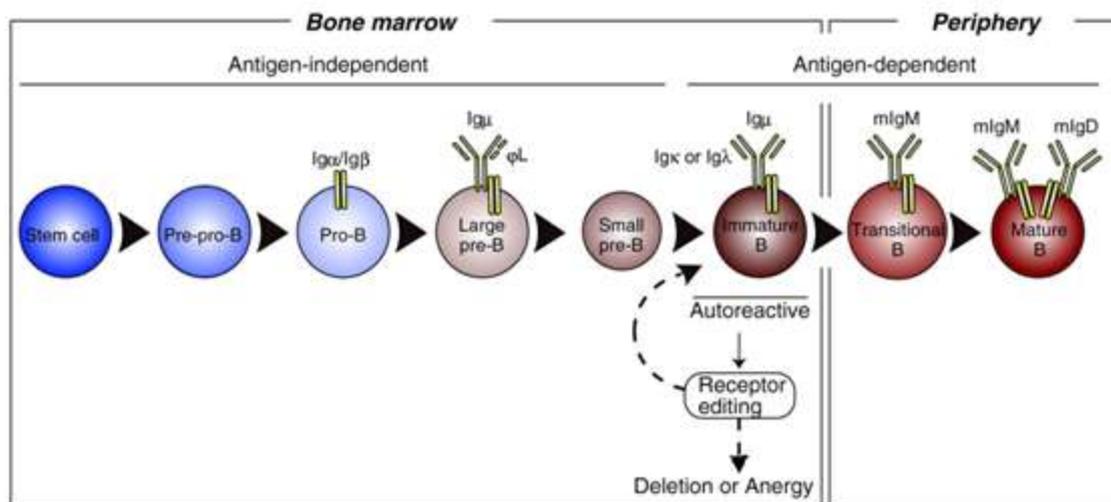


Figure 7: Schéma représentant le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse à partir de Kurosaki et al. (Kurosaki 2010).

II- La tolérance périphérique

Certains lymphocytes autoréactifs échappent à la sélection réalisée dans les organes lymphoïdes primaires. La tolérance centrale n'étant pas suffisante au maintien d'une non réponse du système immunitaire contre les antigènes du soi, d'autres mécanismes de tolérance dite périphérique sont alors mis en jeu (Bouneaud et al. 2000). Leurs rôles sont non seulement d'empêcher la réponse auto-immune mais également de limiter les réponses immunitaires trop intenses contre des antigènes étrangers. La tolérance périphérique permet d'éviter l'induction d'une réponse disproportionnée et non justifiée afin d'empêcher l'apparition de MAI, d'allergie, d'asthme... De même, elle est nécessaire à la mise en place d'une tolérance foeto-

maternelle et d'une tolérance orale. Différents mécanismes de tolérance périphérique ont été décrits (Figure 8).

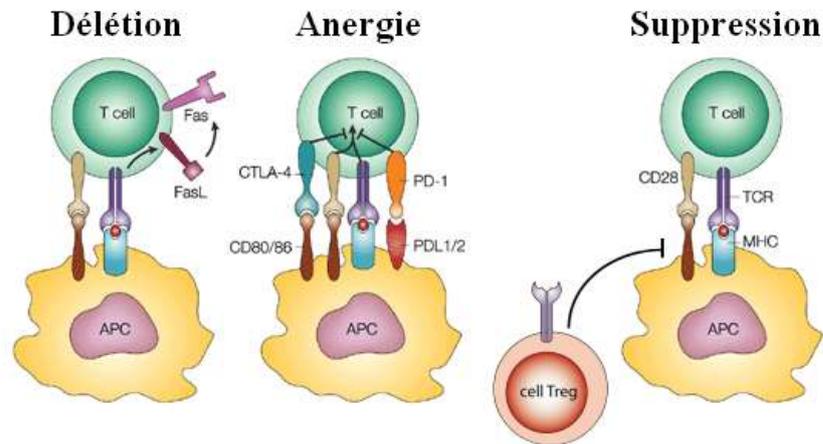


Figure 8: Schéma représentant les différents mécanismes de tolérance périphérique

1. La délétion clonale/l'apoptose

Ce mécanisme utilisé lors de la sélection négative au niveau central peut aussi avoir lieu en périphérie. Il consiste à éliminer les cellules autoréactives en entraînant leur mort par apoptose. La délétion des lymphocytes a lieu lors de la rencontre avec son antigène dans un contexte particulier (Kabelitz et al. 1993). Pour les lymphocytes T, l'apoptose est notamment induite lorsqu'ils sont privés de facteurs de croissance comme l'IL-2. En effet, l'IL-2 permet l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xl nécessaires à la survie des cellules T (Schimpl et al. 2002). Les LB autoréactifs activés ne rencontrent généralement pas de lymphocytes T de spécificité antigénique identique. Ils ne reçoivent donc pas les signaux de survie fournis par l'interaction avec ces cellules et rentrent alors en apoptose (J G Cyster et al. 1994). La mort cellulaire des cellules T peut aussi être déclenchée lors d'une activation trop importante en présence d'une forte concentration d'antigène. Ce phénomène correspond à la «mort cellulaire induite par l'activation» (AICD) et met en jeu le système Fas/FasL (Brunner et al. 1995). Cette voie Fas/FasL permet également d'éliminer les LB autoréactifs qui, dans de rares cas, rencontrent les lymphocytes T de même spécificité auto-antigénique. L'interaction avec la cellule T, en absence de la costimulation CD86-CD28, entraîne la mort de la cellule B via l'interaction Fas-FasL (Rathmell et al. 1996; Rathmell et al. 1998).

2. L'anergie

L'anergie est caractérisée par l'incapacité fonctionnelle des lymphocytes à être réactivés par leur antigène (Jenkins & R. H. Schwartz 1987). Elle est induite lorsque le

lymphocyte reçoit le premier signal d'activation, c'est-à-dire pour le lymphocyte T, quand il reconnaît l'antigène présenté sur un CMH par une APC, et ceci en l'absence du 2^{ème} signal d'activation (costimulation). Les cellules anergiques sont incapables de proliférer et de produire de l'IL-2 (R. H. Schwartz 1990). En revanche, l'anergie peut être levée par l'apport d'IL-2 à ces cellules (Essery et al. 1988). L'anergie semble aussi dépendre des molécules de costimulation inhibitrices telles que le CTLA-4. En effet, son absence dans des cellules T transgéniques rend ces dernières réfractaires à l'induction d'anergie par une stimulation antigénique via des APC exprimant faiblement la molécule de costimulation B7 (Greenwald et al. 2001). L'anergie des cellules B autoréactives est due à une désensibilisation du BCR suite à une stimulation chronique par l'autoantigène (Yarkoni et al. 2010). En transplantation, l'induction de tolérance via l'anergie a pu être démontrée dans un modèle de primate non humain (Bashuda et al. 2005). Dans cette étude, des cellules T du receveur sont rendues anergiques via le contact *in vitro* avec des APC du donneur et en présence d'anticorps bloquant la costimulation. Le transfert de ces cellules T anergiques a permis d'induire une survie à long terme des receveurs.

3. La régulation/suppression

À la différence des autres mécanismes de tolérance, celui-ci fait intervenir une population de cellules dites régulatrices, qui via des propriétés suppressives va agir sur la population de cellules à réguler. La régulation ou la suppression est donc un phénomène actif dépendant de la production de cytokines ou d'un contact cellulaire, et permet d'inhiber l'activation ou la fonction des cellules effectrices. Le concept de suppression induit par des cellules T capables d'inhiber d'autres cellules est apparu dans les années 1970 (Gershon & K. Kondo 1970; Gershon & K. Kondo 1971; Gershon et al. 1972). Aujourd'hui, 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 MAI, les allergies ou le cancer. De nombreuses cellules régulatrices ont été décrites. Certaines sont présentes naturellement dans l'organisme comme les nTreg, dont j'ai précédemment évoqué le développement dans le thymus, et d'autres sont induites en périphérie lors de l'activation de la réponse immunitaire afin de limiter son intensité ou même de l'inhiber.

III- Les cellules régulatrices

Actuellement, un large panel de cellules régulatrices possédant des fonctions suppressives a été décrit. Parmi ces cellules, les plus étudiées sont des cellules T CD4⁺ bien

que des cellules T CD8⁺ et TCD4⁻CD8⁻ aient été aussi mises en évidence. Les DC et les LB peuvent également avoir des propriétés régulatrices. Enfin, d'autres populations cellulaires telles que les cellules T $\gamma\delta$, les NKT mais aussi les macrophages, les cellules myéloïdes suppressives et les cellules mésenchymales stromales jouent un rôle dans la régulation de la réponse immune (Kathryn J Wood et al. 2012).

1. Les lymphocytes T régulateurs

1.1. Les lymphocytes T régulateurs naturels

(a). CD4⁺CD25⁺

Comme je l'ai décrit précédemment, les cellules T régulatrices naturelles CD4⁺CD25⁺ (nTreg) se développent dans le thymus et migrent en périphérie afin de contrôler les lymphocytes autoréactifs qui seraient responsables du développement de MAI. Les nTreg expriment constitutivement différents marqueurs tels que le GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related protein) (Jun Shimizu et al. 2002), le CTLA-4 (T Takahashi et al. 2000), l'antigène LAG-3 (CD223) (C.-T. Huang et al. 2004), le CD103 ($\alpha\beta$ intégrine) (Curotto de Lafaille & Lafaille 2002), le CD62L (Szanya et al. 2002) ou la molécule Nrp-1 (Neuropilin-1) (Bruder et al. 2004). Cependant, l'expression de ces molécules n'étant pas restreinte à ces cellules, elles ne peuvent donc pas être utilisées comme marqueurs spécifiques. Chez la souris et le rat, l'expression du facteur de transcription Foxp3 a été spécifiquement associée aux cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺. Foxp3 a été identifié comme régulateur du développement et de la fonction des Treg CD4⁺CD25⁺. Le transfert du gène codant Foxp3 dans des cellules CD4⁺CD25⁻ confère un phénotype et une fonction suppressive à ces cellules (J. D. Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). De plus, la mutation du gène codant pour Foxp3 chez la souris scurfy entraîne un désordre auto-immun lymphoprolifératif (Brunkow et al. 2001). Chez l'homme, des études ont permis d'associer la mutation du gène codant Foxp3 au syndrome sévère auto-immun allergique fatal, appelé le syndrome IPEX pour, "Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked syndrome" (C. L. Bennett et al. 2001; Wildin et al. 2001). Malgré l'expression de Foxp3 dans les Tregs humaines, celui-ci a également été décrit comme transitoirement augmenté dans les lymphocytes T activés, rendant difficile son utilisation comme marqueur spécifique. Actuellement, aucun marqueur spécifique n'a encore été identifié chez l'homme, bien que l'utilisation du CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL7) permette d'affiner le phénotypage des Treg. En effet, son expression est sous-réglée dans les Tregs (W. Liu et al. 2006; Codarri et

al. 2007). Cependant, une récente étude réalisée chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde montre également une diminution de l'expression du CD127 dans les cellules T activées (Aerts et al. 2008), soulignant la difficulté de trouver un marqueur spécifique aux Treg humaines.

Les nTreg sont capables d'inhiber différentes réponses lymphocytaires induites par les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, mais aussi la réponse humorale via l'inhibition de la production d'anticorps par les LB. Les nTreg peuvent également inhiber des réponses immunologiques induites par les NK et sont capables de modifier la maturation et la fonction des DC (A M Thornton & E M Shevach 2000). La présence de l'IL-2 est essentielle à la prolifération et à l'activation des nTreg (Angela M Thornton et al. 2004), alors que leur fonction suppressive dépend du TGF-β et de l'IL-10 (Du et al. 2006). Cependant, il semble que les nTreg soient capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17. En effet, l'IL-6 pourrait convertir les nTreg en cellules Th17 de façon dépendante du TGF-β (L. Xu et al. 2007). Cette plasticité cellulaire montre que les nTreg pourraient, dans certaines conditions, se différencier en cellules effectrices et favoriser la réponse immune activatrice.

(b). CD8⁺

Une population de cellules T CD8⁺ naturelles a été mise en évidence chez le rat par Saoudi et ses collègues en 2004 (Xystrakis et al. 2004). Cette population de lymphocytes T CD8⁺ est caractérisée par une faible expression de la molécule CD45RC (CD8⁺CD45RC^{low}). Elle exprime le facteur de transcription Foxp3, l'antigène CTLA-4 et peut produire de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IL-10 *in vitro*. Ces lymphocytes T CD8⁺ exercent leur fonction régulatrice en inhibant l'expansion de cellules T CD4⁺ de type Th1 via un contact cellulaire (Xystrakis et al. 2004). Chez l'homme, une population de thymocytes CD8⁺CD25⁺ possédant un phénotype (GITR, CTLA-4, TGF-β1) et des fonctions suppressives similaires aux cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ a été mise en évidence par l'équipe de Sergio Romagnani et de Francesco Annunziato (Cosmi et al. 2003).

1.2. Les lymphocytes T régulateurs induits

Alors que les nTreg sont associés à la tolérance aux antigènes du "soi", les Treg induits (iTreg) générés en périphérie semblent contrôler la réponse aux antigènes étrangers non pathogènes provenant par exemple de la flore commensale, des aliments ou des antigènes inhalés. De nombreuses populations ont été décrites ces vingt dernières années.

On retrouve les lymphocytes T **CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺** issus de la conversion de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Treg. Différents mécanismes permettent l'induction de ces iTreg (Curotto de Lafaille & Lafaille 2009) dont le plus décrit est dépendant de la présence de l'IL-2 et du TGF-β (Fantini et al. 2004). En transplantation, l'induction de ces iTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a été observée dans des modèles de tolérance à l'allogreffe cardiaque dépendant du TGF-β (Cobbold et al. 2004; Ochando et al. 2006). Ces cellules possèdent le même phénotype que les nTreg rendant leur distinction difficile. Récemment, les études du groupe de Shevach suggèrent qu'un membre de la famille des facteurs de transcription d'Ikaros, Helios, serait un marqueur des Treg thymiques et pourrait permettre de discriminer les iTreg des nTreg (Angela M Thornton et al. 2010). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces données, cette idée ayant été récemment remise en question par différentes études (Akimova et al. 2011; Haribhai et al. 2011). En effet, l'équipe de Williams montre chez la souris que des cellules Foxp3⁻ (Haribhai et al. 2011) converties en Treg sont majoritairement Helios^{hi} suggérant que l'expression d'Helios n'est pas restreinte aux nTreg.

Deux autres populations d'iTreg CD4⁺ ont été décrites: les Tr1 et les Th3.

Les **Tr1**, décrites par le groupe de M.G. Roncarolo, sont capables d'inhiber la colite auto-immune (H Groux et al. 1997). Elles sont générées à partir de cellules CD4⁺, en présence d'IL-10. Récemment, une autre cytokine, l'IL-27, a été décrite comme capable d'induire la génération de Tr1 (Apetoh et al. 2010). Les Tr1 exercent leur fonction suppressive via la production d'IL-10 et de TGF-β (M G Roncarolo et al. 2001). En transplantation, l'induction *in vivo* de ces cellules avec une combinaison d'IL-10 et de Rapamycine permet d'établir une tolérance à long terme d'allogreffe d'îlots pancréatiques (Battaglia et al. 2006). Un essai clinique basé sur le transfert de ces cellules Tr1 est actuellement en cours en Italie afin d'évaluer leur efficacité dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (M.-G. Roncarolo & Battaglia 2007).

Les **Th3** ont été décrites pour la première fois dans un modèle d'induction de tolérance orale à l'EAE chez la souris (Y Chen et al. 1994). Elles sont générées en présence d'IL-4, d'IL-10 et de TGF-β. Leur fonction régulatrice est dépendante du TGF-β qu'elles produisent (H L Weiner 2001). Elles ont la particularité d'induire la différenciation de lymphocytes T en cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Carrier et al. 2007).

Outre les populations d'iTreg CD4⁺, des populations d'iTreg CD8⁺ ont aussi été mises en évidence, dont les cellules **CD8⁺CD28⁻**. Décrites chez l'homme, elles sont générées *in vitro* par des stimulations répétées via des APC (Z. Liu et al. 1998). Leur fonction suppressive

est spécifique de l'antigène et dépend d'un contact cellulaire (John S Manavalan et al. 2004). Elles ont la capacité d'empêcher le rejet aigu dans un modèle de greffe de foie chez le rat (Y Liu et al. 2007). Ces cellules ont été retrouvées chez des patients transplantés rénaux, hépatiques ou cardiaques, ne présentant pas de signe de rejet (Raffaello Cortesini et al. 2002; Adriana I Colovai et al. 2003). Une équipe de notre laboratoire a également mis en évidence une population d'iTreg $CD8^+$ possédant un phénotype similaire aux cellules naturelles $CD8^+CD45RC^{low}$ décrites par l'équipe de Saoudi. Cette population est capable d'inhiber le rejet aigu dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Guillonnet et al. 2007).

Des cellules $TCR\alpha\beta^+CD3^+NK1.1^-CD4^-CD8^-$, dites double négatives, ont également été décrites comme possédant des propriétés suppressives. Leur fonction est dépendante de l'IL-2 et de l'IL-4 et nécessite un contact cellulaire (Z. X. Zhang et al. 2000). Découvertes chez la souris puis décrites chez l'homme, elles n'expriment pas la molécule CD28 mais possèdent des molécules d'activation telles que le CD25 et le CD69 (Z. X. Zhang et al. 2000; Fischer et al. 2005). Elles sécrètent de l'IFN- γ et du TNF- α (W. Chen et al. 2003). Elles permettent de prévenir le rejet de greffe (M Hill et al. 2011) et la GVHD (Kevin J Young et al. 2003). Une récente étude a mis en évidence la capacité de ces Treg murines à acquérir, *in vivo*, le complexe CMH/peptide antigénique via la trogocytose avec les APC qui portent le complexe. Ce mécanisme confère à ces Treg la capacité à lyser les lymphocytes $CD8^+$ spécifiques de l'antigène (Ford McIntyre et al. 2008).

Les cellules **NKT** sont des cellules exprimant à la fois le $TCR\alpha\beta$ et le marqueur de la lignée NK, le NKR1. Elles peuvent produire de l'IL-4, de l'IFN- γ , du TGF- β et de l'IL-10 suite à une activation via la reconnaissance d'un glycolipide étranger présenté par la molécule CD1d. Les NKT ont été associées à des fonctions de régulation notamment dans le cadre du diabète (Frey & T. D. Rao 1999) mais aussi en transplantation (K. I. Seino et al. 2001; Higuchi et al. 2002). Chez la souris, elles sont impliquées dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque et sont capables d'inhiber la GVHD en favorisant la prolifération des Treg du donneur de façon dépendante de l'IL-4 (Pillai et al. 2009).

1.3. Mécanismes de régulation des lymphocytes T régulateurs

Les cellules Treg, qu'elles soient induites ou naturelles, disposent de diverses stratégies afin d'exercer leur activité suppressive. Différents mécanismes de régulation ont été décrits, dont l'utilisation de cytokines inhibitrices, la cytolyse, la perturbation métabolique et/ou l'inhibition de la maturation ou de la fonction des DC (Figure 9). La diversité de ces

mécanismes permet aux lymphocytes T régulateurs de cibler de nombreux types cellulaires. Les Treg sont capables d'inhiber la réponse à médiation cellulaire en ciblant la prolifération et la fonction de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ effecteurs. Elles inhibent également la réponse humorale en s'attaquant à la commutation de classe des Ig et à la production des anticorps. Enfin, les cellules T régulatrices peuvent cibler la cytotoxicité des NK et des NKT, la maturation et la fonction des DC ainsi que la fonction et la survie des neutrophiles et des mastocytes (Rouse 2007; Ethan M Shevach 2009).

(a). La production de cytokines régulatrices

L'IL-10 et le TGF- β sont les deux principales cytokines suppressives utilisées par les Treg pour exercer leur activité. Diverses études ont pu mettre en évidence l'importance du TGF- β dans le maintien de la tolérance. C'est notamment le cas dans un modèle de diabète chez la souris, dans lequel l'expression du récepteur au TGF- β par les lymphocytes T CD8⁺ est essentielle pour leur régulation par les Treg CD4⁺CD25⁺ (E. A. Green et al. 2003). Dans une autre étude réalisée dans un modèle de colite chez la souris, les cellules effectrices insensibles au TGF- β échappent à la suppression par les Treg. Dans ce même modèle, les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ déficientes pour le TGF- β sont capables d'inhiber la colite. En revanche, cette suppression est levée lors de l'ajout d'un anticorps anti-TGF- β (Fahlén et al. 2005). Ces résultats suggèrent que la fonction des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ peut dépendre du TGF- β produit par d'autres cellules. De plus, notre équipe a mis en évidence l'importance de cette cytokine dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. En effet, nous avons montré que le transfert de la tolérance, via l'injection de cellules T régulatrices à un second receveur syngénique, est dépendant du TGF- β . En effet, l'administration au receveur d'un anticorps bloquant le TGF- β inhibe l'induction de la tolérance (Le Texier et al. 2012). L'utilisation du TGF- β soluble par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ a été remise en cause par certaines études. En effet, Thornton et ses collègues ont montré que la fonction suppressive des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ nécessite un contact cellulaire (A M Thornton & E M Shevach 1998). En effet, l'expression d'une forme membranaire du TGF- β pourrait être responsable de la fonction suppressive des Treg (K. Nakamura et al. 2001).

La cytokine IL-10 a également été décrite comme étant importante dans la tolérance immune. Son rôle dans la régulation par les Treg a été mis en évidence dans différents modèles murins d'autoimmunité, d'infection, de transplantation et d'inflammation (Shimon Sakaguchi 2004). Par exemple, dans un modèle de greffe chez la souris, l'injection d'anticorps bloquant l'IL-10 entraîne un rejet plus rapide de la greffe de peau allogénique

dont le rejet est normalement inhibé par les cellules T régulatrices (Cherry I Kingsley et al. 2002). Dans une autre étude, Rubstov et ses collègues montrent que la délétion spécifique de la production d'IL-10 par les Treg n'est pas associée à l'apparition de MAI systémiques mais que l'IL-10 est tout de même nécessaire à la tolérance locale des poumons et du colon (Rubstov et al. 2008). L'effet inhibiteur de l'IL-10 a notamment été attribué à son action sur les cellules myéloïdes, dont elle diminue l'expression des molécules de CMH de classe II, des molécules de costimulation ainsi que la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (K. W. Moore et al. 2001). Le rôle immunorégulateur de l'IL-10 peut aussi être associé à la génération de cellules Tr1 ou de DC tolérogènes dépendantes de l'IL-10, qui sont elles-mêmes des cellules régulatrices productrices d'IL-10 (Kryczek et al. 2006; Maria Grazia Roncarolo et al. 2006).

Une nouvelle cytokine, l'IL-35, a récemment été décrite comme étant produite par les cellules T régulatrices (Collison et al. 2007). L'IL-35 est constituée de la chaîne EBI3 (analogue de la chaîne IL12p40) associée à la chaîne IL12p35. Chez la souris, Collison et ses collègues ont mis en évidence la production d'IL-35 par les cellules Treg Foxp3⁺. L'IL-35 semble nécessaire à leur activité suppressive. De plus, l'expression ectopique de l'IL-35 dans des cellules T naïves leur confère une activité suppressive. *In vitro*, l'ajout d'IL-35 recombinante sur des cellules T effectrices est suffisant pour inhiber leur prolifération (Collison et al. 2007). Une autre étude réalisée chez la souris montre que l'IL-35 est responsable de l'inhibition de la différenciation des lymphocytes Th17 et permet la diminution de la sévérité de l'arthrite (Niedbala et al. 2007). Chez l'homme, la production d'IL-35 par les Treg humaines reste controversée (Bardel et al. 2008), bien qu'une étude récente montre que la sécrétion d'IL-35 par les Treg Foxp3⁺ est importante pour leur fonction de suppression et contribue à la conversion des cellules T régulées en iTreg productrices d'IL-35 (Chaturvedi et al. 2011).

(b). La lyse cellulaire

Les cellules Treg sont aussi capables d'induire la cytolyse de leurs cibles. Différents mécanismes ont été décrits comme faisant intervenir la voie Fas/FasL (T. Watanabe et al. 2002), la voie granzyme/perforine (Grossman, Verbsky, Barchet, et al. 2004; Grossman, Verbsky, Tollefsen, et al. 2004) ou seulement la voie granzyme B associée à un contact cellulaire (Gondek et al. 2005). Une autre voie a été rapportée comme jouant un rôle dans la fonction cytolytique des Treg. En effet, une étude chez la souris a montré une inhibition de la survie d'allogreffe de peau par blocage de la voie TRAIL/DR5 (Tumor necrosis factor-

Related Apoptosis Inducing Ligand/Death Receptor 5) qui serait dépendante de la diminution de l'activité suppressive et cytotoxique des Treg (X. Ren et al. 2007). La voie PD-1/PD-L1 a également été décrite comme utilisée par les cellules Treg pour exercer leur fonction suppressive, en induisant notamment l'apoptose des LB autoréactifs (Gotot et al. 2012).

(c). La perturbation métabolique

La perturbation métabolique constitue une autre stratégie employée par les Treg afin d'exercer leur fonction régulatrice. Cette méthode consiste à modifier l'environnement biochimique ou cytokinique extracellulaire ou parfois intracellulaire, le rendant délétère pour les cellules cibles. Les cellules Treg, nécessitant la présence d'IL-2 pour survivre et étant incapables d'en produire elles-mêmes, consomment donc l'IL-2 produite par les lymphocytes T effecteurs. Pandiyan et ses collègues ont montré dans un modèle d'inflammation de l'intestin chez la souris que ce phénomène entraîne l'appauvrissement de l'environnement en IL-2, déclenchant l'apoptose des cellules effectrices qui ont besoin d'IL-2 pour survivre (Pandiyan et al. 2007). Certaines études ont aussi mis en avant l'implication de l'ATP (adénosine triphosphate) dans la fonction des Treg. En effet, la présence de l'ATP dans l'environnement extracellulaire a des effets pro-inflammatoires. Le relargage d'ATP est observé lors de dommages tissulaires et de mort cellulaire, et entraîne l'activation des DC. Or, l'ectoenzyme CD39, exprimée par les Treg chez la souris, permet la dégradation de l'ATP en AMP (Adénosine Monophosphate) et donc diminue les effets pro-inflammatoires. Une étude chez l'homme a notamment mis en évidence la diminution d'une population de Treg Foxp3⁺CD39⁺ chez des patients en phase de rechute de sclérose multiple (MS), suggérant l'importance des Treg Foxp3⁺CD39⁺ dans le contrôle des MAI chez l'homme (Borsellino et al. 2007). La forme cyclique de l'AMP, l'AMPc, semble aussi impliquée dans l'activité suppressive des Treg. L'AMPc est connue pour son effet inhibiteur sur la prolifération, la différenciation et la production d'IL-2 par les cellules T (Bodor et al. 2001). L'étude de Bopp et ses collègues montre que les nTreg de souris sont capables d'induire une suppression par le transfert d'AMPc intracellulaire dans des lymphocytes T effecteurs, via des jonctions GAP formées entre les deux types cellulaires (Bopp et al. 2007).

(d). La régulation des cellules dendritiques

En plus d'une action directe des Treg sur les cellules effectrices, les Treg peuvent utiliser un mécanisme indirect de suppression, notamment par l'interaction avec les DC. Cette interaction peut se faire via différentes molécules. La molécule CTLA-4 portée par les Treg

interagit avec les molécules CD80 et CD86 présentes sur les DC et induit la diminution de leur expression. Cette interaction entraîne la diminution de la capacité des DC à induire la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Oderup et al. 2006). L'implication du CTLA-4 a été mise en évidence par l'utilisation d'un anticorps bloquant cette molécule, avec pour résultat la diminution de la suppression dépendante des DC (Oderup et al. 2006). De même, le contact Treg/DC dépendant des molécules CTLA-4, CD80 ou CD86 peut induire l'expression d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les DC. IDO est une enzyme qui permet la dégradation du tryptophane et entraîne la production de métabolites pro-apoptiques induisant la suppression des lymphocytes T effecteurs (Fallarino et al. 2003). D'autres molécules semblent aussi impliquées dans l'activité régulatrice des Treg dépendante des DC. C'est le cas de la molécule LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3) exprimée par les Treg, qui interagit avec les molécules de CMH de classe II et inhibe la maturation des DC, empêchant l'activation des lymphocytes T (Liang et al. 2008). Par une autre stratégie, Nr1, exprimée par les cellules Foxp3⁺, permet aussi aux Treg d'éviter l'activation des lymphocytes T. En effet, elle prolonge le temps de contact des Treg et des DC empêchant les lymphocytes T d'accéder aux DC (Sarris et al. 2008; Ethan M Shevach 2009). Les Treg sont également capables de diminuer la capacité des DC à capter les antigènes via les récepteurs endocytiques, lectines de type C «like» tels que CD206 et DC-SIGN, en diminuant leur expression. Ils entraînent aussi l'expression du récepteur inhibiteur FcγRIIb limitant l'activation des DC (Navarrete et al. 2011).

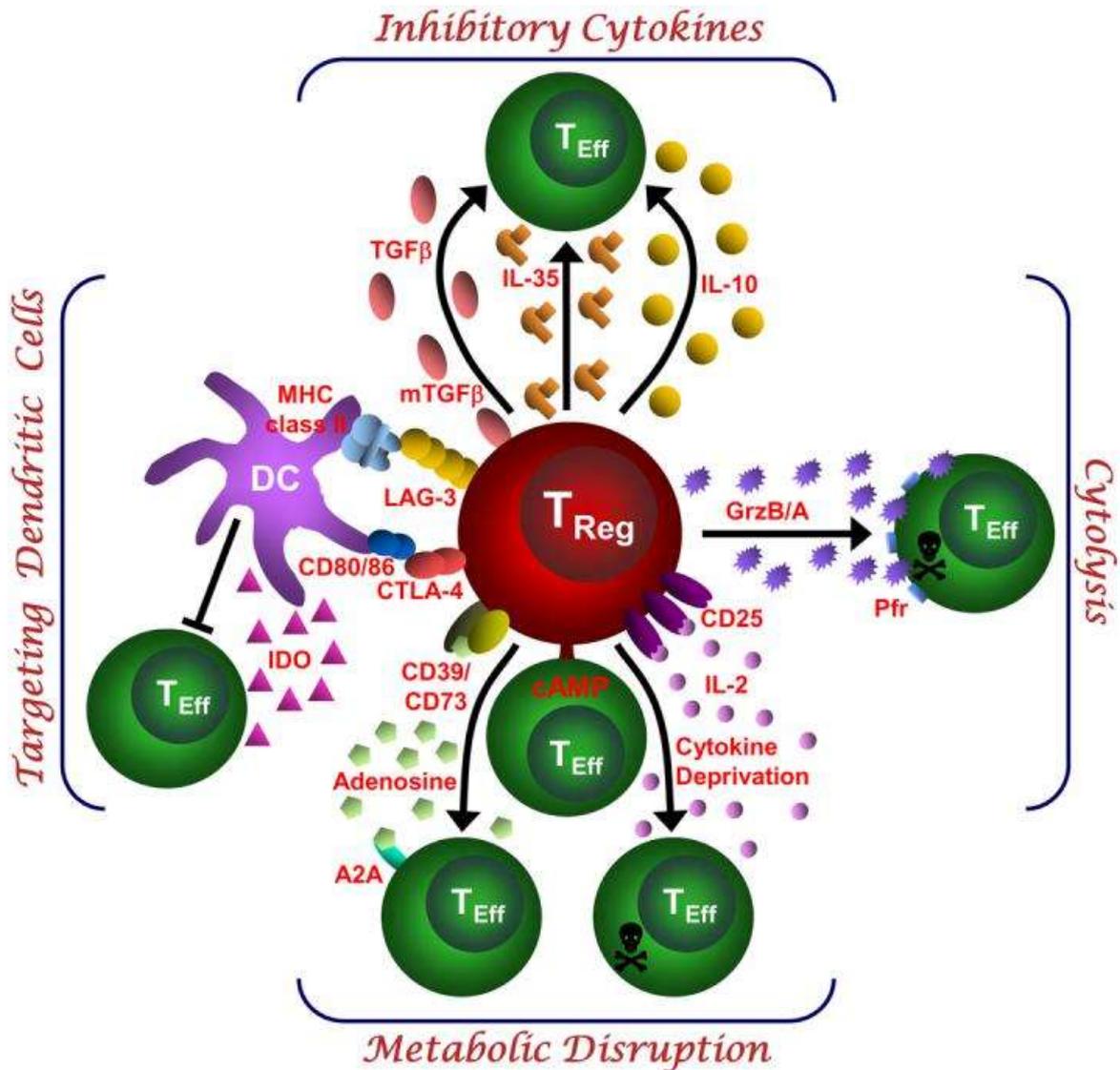


Figure 9: Schéma représentant les quatre principaux mécanismes de suppression des Treg d'après Workman et al. (Workman et al. 2009).

1.4. Les lymphocytes T régulateurs en transplantation

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 Treg et les lymphocytes T effecteurs en transplantation va influencer le devenir du greffon vers le rejet ou la tolérance. Chez un receveur d'allogreffe, la quantité de Treg n'est pas suffisante pour contrer l'action des lymphocytes T alloréactifs et éviter le rejet de l'allogreffe. L'objectif est donc de faire pencher la balance au profit des Treg en diminuant la proportion de lymphocytes T effecteurs ou en favorisant l'expansion des Treg. De nombreux modèles animaux ont mis en évidence l'importance des Treg dans l'induction ou le maintien de la tolérance en transplantation (P. A. Taylor et al. 2001; Hara et al. 2001; Alberto Sánchez-Fueyo et al. 2002; E. Chiffolleau et al. 2002; Guillonnet et al. 2007). Chez l'homme, le rôle des Treg en

transplantation n'est pas encore clairement établi, bien que l'étude des patients dits "opérationnellement tolérants" permette à présent de mieux les caractériser. Ces patients tolérants possèdent une fonction stable du greffon, bien qu'ils ne soient plus sous immunosuppression suite à un arrêt de traitement pour diverses raisons (non-observance ou problèmes d'effets secondaires au traitement). Certaines études suggèrent que la présence de Treg serait associée à la tolérance. En effet, l'équipe de Sánchez-Fueyo A. a mis en évidence un plus grand nombre de cellules Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dans le sang des patients tolérant leur greffe de foie par rapport aux patients sous immunosuppression ou à des volontaires sains (M Martínez-Llordella et al. 2007). Dernièrement, lors de l'étude du profil de gènes exprimés par des patients transplantés rénaux opérationnellement tolérants, une équipe brésilienne a montré que ces patients possédaient un profil d'expression de gènes associés aux Treg tels que Foxp3, le TGF- β et son récepteur (Moraes-Vieira et al. 2012). Une équipe de notre laboratoire a quant à elle mis en évidence une diminution des lymphocytes T CD25^{hi}CD4⁺Foxp3⁺ chez les patients en rejet chronique par rapport aux patients tolérants ou à des volontaires sains, suggérant que le maintien du nombre de Treg en périphérie est important pour la tolérance (Louis et al. 2006; Cécile Braudeau et al. 2007). Bien qu'elle n'ait pas mis en évidence de différence d'expression du TGF- β entre les patients tolérants et ceux développant un rejet chronique, elle a montré que 27% des gènes différentiellement exprimés entre ces deux groupes de patients étaient régulés par cette cytokine (Sophie Brouard et al. 2007).

Bien qu'il soit admis que les Treg jouent un rôle important dans la tolérance, il semble que la détection d'une augmentation de Treg ne soit pas toujours un marqueur d'une prédisposition à la tolérance chez l'homme. En effet, certaines études montrent une augmentation des marqueurs de Treg tel que le Foxp3 associée au rejet. En transplantation rénale, l'expression de Foxp3 dans les urines des patients corrèle avec le rejet du greffon (B Li et al. 2001; Muthukumar et al. 2005). Des résultats similaires ont été obtenus en transplantation pulmonaire et cardiaque. Une augmentation du nombre de cellules Foxp3⁺ a été mise en évidence dans les lavages broncho-alvéolaires de patients en rejet aigu par rapport à des patients sans rejet (Neujahr et al. 2009). De même, l'expression de Foxp3 est augmentée dans des biopsies cardiaques de patients avec un grade de rejet élevé par rapport à des patients sans rejet ou avec un stade moins avancé de rejet (Baan et al. 2009). Ces résultats suggèrent une augmentation de l'infiltration des greffons par les Treg, probablement dans le but de limiter l'inflammation et la réponse immune contre le greffon.

Bien que les résultats obtenus en transplantation chez l'homme ne soient pas aussi clairs que ceux obtenus chez le rongeur, le rôle des Treg dans la régulation de la réponse immunitaire est quant à lui évident. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser des stratégies thérapeutiques qui favorisent cette population cellulaire chez les patients transplantés.

2. Les DC tolérogènes

Comme j'ai pu l'évoquer précédemment, les DC sont elles aussi impliquées dans les mécanismes de tolérance. L'importance des DC dans la tolérance périphérique a notamment été soulignée par l'étude de Darrasse-Jèze G et ses collègues. Ils ont montré que la déplétion des DC chez la souris entraîne une diminution du nombre de Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, corrélée à une augmentation de lymphocytes T producteurs d'IL-17 et d'IFN- γ , et une augmentation du risque de MAI (Darrasse-Jèze et al. 2009).

2.1. Les DC immatures

Les propriétés régulatrices ou tolérogènes des DC ont classiquement été associées aux cellules immatures. En effet, ces cellules exprimant faiblement les molécules de co-stimulation et ne produisant que très peu ou pas d'IL-12p70 (Banchereau & R M Steinman 1998), elles ne sont pas aptes à activer une réponse immunitaire effectrice. Par ailleurs, elles possèdent de fortes propriétés endocytiques et phagocytiques (Buckwalter & M. L. Albert 2009). Elles captent les antigènes du "soi" et migrent dans les OLS pour présenter ces antigènes aux lymphocytes T autoréactifs et induire leur délétion ou leur anergie (Ralph M Steinman et al. 2003). De nombreuses études ont associé le potentiel régulateur des DC aux cellules immatures. Chez l'homme, l'injection de DC immatures dérivées de monocytes pulsées avec un peptide du virus influenza et injectées en sous-cutanée chez des volontaires, permet la génération de cellules Treg $CD8^+$ spécifiques de l'antigène et productrices d'IL-10 (M V Dhodapkar et al. 2001; Madhav V Dhodapkar & Ralph M Steinman 2002). Nussenzweig et Steinman ont montré que l'apport d'un antigène à des DC en ciblant le récepteur d'endocytose DEC-205 et en condition non inflammatoire, induit la prolifération des cellules T spécifiques de l'antigène puis leur délétion. Au contraire, lorsque la même expérience est réalisée avec des DC activées via le CD40, les cellules T vont alors proliférer, produire de l'IL-2 et de l'IFN- γ , et exercer des fonctions effectrices (Bonifaz et al. 2002). Outre leur capacité à inhiber les lymphocytes T, les DC semblent aussi capables d'inhiber la réponse humorale. Des DC dérivées de la moelle osseuse (BMDC) immatures ainsi que des DC provenant de poumons de souris peuvent fortement inhiber la production d'IgE par des

LB activés via le CD40 et l'IL-4 (Obayashi et al. 2007). Il semble donc évident que les DC immatures peuvent présenter des propriétés tolérogènes notamment en raison de l'absence de signaux de costimulation qu'elles fournissent.

2.2. Les DC matures

Le potentiel tolérogène des DC ne peut pas être exclusivement attribué aux cellules immatures. En effet, il a été démontré que la maturation et l'expression de molécule de stimulation pouvaient être nécessaires à l'induction de tolérance. L'équipe de Lutz a montré que des DC stimulées avec du TNF- α expriment fortement le CMH de classe II et les molécules de costimulation, mais qu'elles produisent peu de cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules sont capables d'induire une protection contre l'EAE chez la souris (Menges et al. 2002). Le concept de cellules semi-matures a donc été proposé, correspondant à un état de maturation intermédiaire de DC capables d'induire la tolérance. D'autre part, les DC matures sont aussi capables d'exercer des fonctions de régulation. Elle peuvent induire une tolérance en stimulant la prolifération de cellules Treg naturelles (Sayuri Yamazaki et al. 2003). Les DC CD11c⁺CD103⁺, qui présentent un phénotype mature (CD80, CD86, CMHII), participent au maintien de la tolérance intestinale en induisant des Treg Foxp3⁺. L'induction de ces Treg dépend de la présence de TGF- β et de la production par les DC de l'acide rétinoïque. Ces deux facteurs permettent l'induction de l'expression de Foxp3 par les cellules T (Coombes et al. 2007; C.-M. Sun et al. 2007; Xiao et al. 2008).

L'ensemble des données sur les DC possédant des propriétés tolérogènes montre que finalement, l'état de maturation des DC basé sur leur phénotype ne permet pas de distinguer les DC tolérogènes des autres DC. Actuellement, seule leur fonction permet de les distinguer. Ainsi, il semble donc plus pertinent de définir l'état de maturation d'une DC d'un point de vue fonctionnel plutôt que phénotypique (Caetano Reis e Sousa 2006).

2.3. Induction de DC tolérogènes

Comme je l'ai décrit précédemment, les cellules Treg sont capables de conférer aux DC 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 DC ou induire l'expression de molécules tolérogènes (IDO, ILT3, ILT4) et ainsi modifier leur fonction. Sous l'action de cellules Treg CD8⁺CD28⁻, l'expression des molécules de costimulation des DC va être diminuée, alors que l'expression des récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 (Immunoglobulin Like Transcript) sera augmentée (C. C. Chang et al. 2002). Les DC

exprimant fortement ces deux récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 entraînent l'anergie des cellules T effectrices, les convertissant en Treg spécifiques de l'antigène (John S Manavalan et al. 2004).

Certains facteurs solubles sont également capables d'induire des DC aux propriétés tolérogènes comme l'IL-10 et le TNF- α . La présence de ces cytokines permet de générer des DC CD11c^{lo}CD45RB⁺ capables d'induire la différenciation de cellules T naïves en cellules régulatrices Tr1 productrices d'IL-10 (Wakkach et al. 2003). D'autres facteurs solubles comme le TGF- β , la vitamine D3 ou les corticostéroïdes sont aussi utilisés pour induire *in vitro* des DC tolérogènes (O'Neill et al. 2004). Récemment, il a été montré que la galectine-1 est également capable de conférer aux DC des fonctions tolérogènes. En effet, les auteurs ont observé que les DC générées en présence de galectine-1, en faible concentration, sont capables d'inhiber l'activation des cellules T et la neuroinflammation auto-immune, de façon dépendante de l'IL-10. Les propriétés tolérogènes de ces DC dépendent de la production de la cytokine IL-27 induite par la galectine-1 (Iarregui et al. 2009). L'IL-27 est une cytokine régulatrice récemment décrite, composée des chaînes IL27p28 et EBI3 (Epstein-Barr virus induced gene 3), produite par les APC activées et notamment par les DC (Pflanz et al. 2002; Awasthi et al. 2007). L'IL-27 possède un rôle régulateur de l'inflammation. En effet, elle inhibe les cellules T effectrices Th1, Th2 et plus particulièrement les cellules Th17 (Batten et al. 2006). Lors d'une infection, les souris déficientes pour le récepteur à l'IL-27 meurent suite à une inflammation sévère des tissus associée à une réponse exagérée des cellules T (Villarino et al. 2003). L'IL-27 permet de contrôler la réponse auto-immune dans des modèles murins d'EAE et d'arthrite (Batten et al. 2006; Pickens et al. 2011). La fonction régulatrice de l'IL-27 est attribuée à sa capacité à induire la différenciation de cellules régulatrices productrices d'IL-10, les Tr1 (Fitzgerald et al. 2007; Stumhofer et al. 2007; Apetoh et al. 2010). Karakhanova et ses collègues ont mis en évidence que l'IL-27 agit également sur les DC en induisant l'expression de la molécule régulatrice B7-H1, également appelée PD-L1 (Programmed Death-1 Ligand), et inhibent les capacités stimulatrices de DC (Karakhanova et al. 2011). Enfin, notre équipe a observé la sur-expression de l'IL-27 dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque de rat et nous avons montré que l'IL-27 semble impliquée dans cette tolérance. En effet, l'injection d'un AAV (adeno-associated virus) codant pour l'IL-27, associé à un court traitement immunosupresseur, permet la prolongation de survie d'allogreffes cardiaques chez le rat (Le Texier et al. 2012).

2.4. Molécules associées aux DC tolérogènes

Bien qu'il n'existe pas de marqueur spécifique pour caractériser les DC dites tolérogènes, il semble pourtant que l'expression de certaines molécules soit associée aux propriétés régulatrices de ces cellules. Nous pouvons citer les récepteurs **ILT3** et **ILT4** évoqués précédemment ou encore l'enzyme hème-oxygénase-1 (**HO-1**). En effet, cette enzyme, responsable du catabolisme de l'hème, a largement été associée à des fonctions de régulation de la réponse immune (Simon et al. 2011). Par exemple, les DC exprimant HO-1 sont capables d'inhiber la réponse T *in vitro* et *in vivo* de façon dépendante de cette enzyme (A Moreau et al. 2009).

Comme mentionné précédemment, l'expression des molécules **PD-L1** et **PD-L2** par les DC a aussi été associée à des capacités tolérogènes. En effet, l'interaction de ces molécules avec leur récepteur PD-1 exprimé par les lymphocytes T induit un signal inhibiteur à celles-ci. Le blocage de cette interaction induit un diabète auto-immun chez la souris (Fife et al. 2009).

L'expression d'**IDO** par les DC leur confère des propriétés tolérogènes (Fallarino et al. 2003). Une population de DC $\text{IDO}^+\text{CD19}^+$, mise en évidence dans la rate chez la souris, possède des propriétés régulatrices lorsqu'elle est stimulée (Mellor et al. 2003). Des travaux réalisés dans notre unité ont mis en évidence le rôle de l'enzyme IDO dans l'induction de la maturation des DC qui induisent l'expansion de Treg $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ (Marcelo Hill, Tanguy-Royer, et al. 2007). De plus, ils ont montré que l'induction de la tolérance à l'allogreffe cardiaque de rat via la molécule CTLA4-Ig est dépendante d'IDO et de NO (oxyde nitrique) (Marcelo Hill, Zagani, et al. 2007).

2.5. DC tolérogènes en transplantation

En transplantation, différents modèles animaux ont permis de mettre en évidence le potentiel tolérogène des DC. L'équipe de Thomson a montré la capacité des BMDC immatures du donneur à prolonger la survie d'allogreffe cardiaque chez la souris, lorsqu'elles sont injectées 7 jours avant la greffe (Fu et al. 1996; L Lu et al. 1997). De même, des DC immatures générées avec des faibles doses de GM-CSF, résistantes à la maturation, ont donné des résultats similaires chez la souris (M B Lutz et al. 2000) et le rat (DePaz et al. 2003). L'injection de DC du donneur au receveur permet également d'éviter le rejet d'allogreffe de peau (Roelen et al. 2003) et protège du développement de la GVHD (Katsuaki Sato et al. 2003). Enfin, notre équipe a montré que des BMDC issues du receveur, injectées la veille de

la greffe et associées à un court traitement immunosuppresseur en dose sous optimale, sont capables d'induire la tolérance à long terme chez le rat (M Hill et al. 2011).

Les pDC possèdent également un potentiel tolérogène. Dans un modèle d'allogreffe cardiaque de souris, les pDC captent les alloantigènes de la greffe et migrent dans les ganglions où elles génèrent des Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Ochando et al. 2006) et permettent d'induire la tolérance. Chez l'homme, la forte expression de PDL-1 et de CD86 par les pDC, corrèle avec une accumulation de Treg CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ dans le sang de patients tolérant leur greffe de foie (Tokita et al. 2008).

Les études réalisées chez l'animal montrent le potentiel thérapeutique des DC tolérogènes. Des études cliniques de thérapie cellulaire utilisant des DC ont déjà été réalisées dans le cas de traitement contre le cancer. Cependant, ces études utilisaient la capacité immunogène des DC pour tenter d'induire une réponse effectrice et non régulatrice. En transplantation, la thérapie cellulaire utilisant les DC tolérogènes pour induire la tolérance n'a pas encore été testée chez l'homme. Le risque majeur de cette stratégie serait d'induire une immunogénicité envers les alloantigènes. En effet, les DC tolérogènes injectées dans un contexte inflammatoire pourraient être modifiées et induirent une réponse immunitaire contre les alloantigènes au lieu d'induire une tolérance. Pour pallier ce risque, il est proposé d'associer à l'injection de DC des traitements tels que des molécules bloquant la costimulation, afin que la présentation des antigènes aux cellules T se fasse dans un contexte tolérogène.

3. Les lymphocytes B régulateurs

3.1. Généralités

Les LB sont principalement connus pour leur capacité à induire positivement la réponse immunitaire à travers leur propriété d'APC et leur capacité unique à produire et sécréter des anticorps. Ils jouent un rôle important dans l'élimination de pathogènes extracellulaires et sont largement décrits pour leur implication dans des pathologies telles que les MAI via la production d'auto-anticorps, dans les allergies par la sécrétion d'IgE ou encore en transplantation via la génération d'anticorps anti-donneurs. Cependant ces dix dernières années, de nombreuses études ont rapporté un rôle régulateur des LB démontrant l'existence de LB régulateurs, les Breg (Vitale et al. 2010). Dès la fin des années 1960, il a été suggéré pour la première fois l'existence d'une population de cellules productrices d'anticorps capables d'exercer un effet régulateur. En 1968, Alan Morris et Göran Möller ont mis en évidence la résistance à l'immunisation par le SRBC (Sheep red blood cells), des animaux

injectés avec des splénocytes producteurs d'anticorps (A. Morris & Möller 1968). Par la suite, Katz, Parker et Turk ont décrit l'effet suppressif des LB en démontrant que la déplétion des LB, dans une préparation de splénocytes, inhibait le rôle régulateur de cette préparation sur la DTH (Delayed-type hypersensitivity) chez le cobaye (Katz et al. 1974). Dans les années 1990, l'équipe de Janeway a confirmé l'existence d'une fonction régulatrice portée par les cellules B, en utilisant un modèle d'EAE de souris déficientes en LB (souris μ MT) (S. D. Wolf et al. 1996). Cette étude montre que l'induction d'EAE dans ce modèle ne nécessite pas la présence de LB, mais que ceux-ci sont nécessaires à la diminution de la sévérité et à la guérison de la maladie. Les fonctions régulatrices de ces cellules ont par la suite été attribuées à des LB producteurs d'IL-10, appelés ensuite cellules B10. En 2002, des expériences de transfert réalisées par Fillatreau et ses collègues montrent que les LB wild type (WT), à la différence des LB IL-10^{-/-}, sont capables de normaliser l'EAE chez des souris μ MT (Fillatreau et al. 2002). Plusieurs études réalisées dans des modèles animaux ont également mis en évidence l'importance de la fonction régulatrice des B10 dans les MAI, comme les coliques chroniques, les maladies inflammatoires intestinales (IBD) (A Mizoguchi et al. 1997; Atsushi Mizoguchi et al. 2002) ou l'hypersensibilité de contact (CHS) (R. Watanabe et al. 2007). Les B10 régulent le diabète chez des souris NOD (Non-Obese Diabetic), dans lesquelles les LB sont également décrits comme impliqués dans l'induction de la maladie (Xiu et al. 2008). Dans un modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA), la déplétion des LB réduit la sévérité de la maladie (Yanaba et al. 2007) alors que l'injection de cellules B arthritogéniques activées avec un anticorps anti-CD40 diminue l'incidence et la sévérité de la maladie via la production d'IL-10 (Mauri et al. 2003). L'existence de LB régulateurs chez l'homme a été suggérée par différentes équipes. Duddy et ses collègues ont observé une diminution des LB producteurs d'IL-10 chez des patients atteints de sclérose multiple (MS) (Duddy et al. 2007). L'équipe de C. Mauri a mis en évidence une diminution de la capacité d'une population de LB à produire de l'IL-10 et à exercer des fonctions suppressives chez des patients atteints d'un lupus systémique érythémateux (SLE) (Blair et al. 2010). L'action des Breg ne semble pas se limiter aux MAI. Les Breg peuvent également être impliqués dans l'induction de tolérance périphérique en tolérant des cellules T CD8⁺ autoréactives (Werner-Klein et al. 2007) ou dans l'immunosuppression induite lors d'infection par des helminthes (N. E. Mangan et al. 2004; Hussaarts et al. 2011). Ils sont également impliqués dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale (Inoue et al. 2006; Yu Zhang et al. 2012) et dans la protection du cerveau contre les dommages induits par une ischémie (Yingxin Chen et al. 2012).

3.2. Identification des populations de lymphocytes B régulateurs

Actuellement, il n'existe pas de marqueurs spécifiques des Breg. La production d'IL-10 par les cellules CD19⁺ (marqueur des LB) a donc été très utilisée pour caractériser ces cellules. Les recherches réalisées par différents groupes suggèrent qu'il existe diverses populations de Breg. Cependant, certaines molécules telles que le CD1d ou le CD5 semblent communes à des populations de Breg identifiées par différentes équipes de recherche.

Le groupe de Bhan a associé l'expression de la molécule CD1d aux Breg péritonéaux producteurs d'IL-10 (Atsushi Mizoguchi et al. 2002). Ce même marqueur a été retrouvé par l'équipe de C. Mauri qui a mis en évidence une population de LB CD1d^{high}CD21^{high}CD23⁺IgM⁺AA4.1^{int}. Ces cellules présentent un phénotype de cellules immatures, de type précurseur de cellules transitionnelles de la zone marginale (T2-MZP) de la rate. Ces Breg sont capables de diminuer l'arthrite via la production d'IL-10 dans un modèle murin (Evans et al. 2007).

La molécule CD5 a également été associée aux Breg producteurs d'IL-10. L'équipe de T. Tedders a identifié une population de LB producteurs d'IL-10, CD19⁺CD1d^{hi}CD5⁺, qui représente 1-2% et 7-8% des cellules CD45R⁺ (B220) respectivement dans la rate et la cavité péritonéale de souris. Ces Breg sont impliqués dans la régulation de l'inflammation induite par des cellules T (Yanaba et al. 2008) ainsi que dans l'EAE chez la souris (Matsushita et al. 2008).

Chez l'homme, le groupe de C. Mauri a mis en évidence une population de Breg de type transitionnel qui expriment majoritairement les molécules CD1d et CD5 et sont CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi}. Ces Breg prélevés sur des volontaires sains produisent de l'IL-10 suite à une stimulation via le CD40, alors que cette même population prélevée sur des patients avec un SLE est réfractaire à cette stimulation et produit moins d'IL-10 (Blair et al. 2010). Une autre population de Breg a également été identifiée chez l'homme. Elle possède un phénotype mémoire CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ et est présente en faible proportion dans le sang de patients sains. Suite à une stimulation avec du CpG ou du LPS, ces cellules produisent de l'IL-10 et régulent la production de TNF- α par les monocytes (Iwata et al. 2011). Dernièrement, Kessel et ses collègues ont également identifié dans le sang de volontaires sains une population de Breg de type mémoire CD27^{hi}CD25^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi} IL-10^{hi}TGF- β ^{hi} qui possède des propriétés suppressives *in vitro* (Kessel et al. 2012). Enfin, le facteur de transcription Foxp3⁺, classiquement associé aux cellules Treg, semble également exprimé par certaines populations de Breg. Une population de cellules CD19⁺CD5⁺Foxp3⁺ a récemment été identifiée et pourrait

être impliquée dans le maintien de la tolérance. En effet, ces cellules semblent faire défaut lors d'allergies alimentaires (J. Noh et al. 2010; J. Noh et al. 2012; J. Noh & G. Noh 2012).

Les marqueurs ou les groupes de marqueurs associés aux Breg ne sont pas restreints à ces cellules et ne permettent donc pas de les identifier de façon formelle. Des études fonctionnelles *in vivo* ou *in vitro* sont actuellement indispensables pour pouvoir qualifier une population de "Breg".

3.3. Mécanismes de régulation des lymphocytes B régulateurs

Les études réalisées ces dernières années ont donc mis en évidence l'existence de populations lymphocytaires B capables de réguler la réponse immune. Les mécanismes utilisés par ces Breg sont encore peu décrits, mais la littérature commence à voir émerger quelques études sur les Breg rapportant certains mécanismes régulateurs assez similaires à ceux utilisés par les populations de Treg (Figure 10).

(a). *La sécrétion de facteurs solubles*

Les populations de Breg ont surtout été caractérisées par leur production d'IL-10. Cette cytokine est largement décrite pour ses propriétés immuno-régulatrices (Shimon Sakaguchi 2004) et semble également responsable des propriétés régulatrices de certaines populations de Breg. En effet, Fillatreau et ses collègues ont montré que le transfert de LB spléniques stimulés, prélevés chez des souris guéries de l'EAE, ne sont plus capables de diminuer la sévérité de la maladie lorsque les LB ne produisent pas d'IL-10 (IL-10^{-/-}). L'activation des Breg via leur BCR, le CD40 ou les TLR est souvent nécessaire à la production de l'IL-10 qui leur permet d'exercer leur fonction régulatrice (Fillatreau et al. 2002; Mauri et al. 2003; Blair et al. 2010; Iwata et al. 2011). Mizoguchi et ses collègues ont également montré l'importance de la molécule CD1d pour la production d'IL-10 et pour la fonction régulatrice des Breg (Atsushi Mizoguchi et al. 2002). De même, il semble que l'expression de TIM-1 (T-cell Ig mucin 1) par les Breg soit importante pour la sécrétion d'IL-10 et pour le maintien de la tolérance (Xiao et al. 2012). Certaines études suggèrent que l'IL-10 sécrétée par les Breg peut agir en inhibant la différenciation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs Th1, Th2 et Th17 (Evans et al. 2007; N. A. Carter et al. 2011; N. A. Carter et al. 2012) ou en inhibant la sécrétion de cytokines par les DC (Moulin et al. 2000). Les Breg ont également été décrits comme étant capables d'induire l'anergie des cellules T CD8⁺ via l'expression du TGF- β membranaire (Parekh et al. 2003). Ils peuvent également inhiber le diabète en induisant l'apoptose des cellules Th1 et l'inhibition de la fonction des

APC via la sécrétion de TGF- β (J. Tian et al. 2001). Il semble également que les LB puissent entraîner l'apoptose des cellules T via la sécrétion de la galectine-1 (Zuñiga et al. 2001).

(b). Le contact cellulaire

Certaines études suggèrent un rôle régulateur des LB par contact cellulaire, notamment en induisant l'apoptose des cellules via l'expression de la molécule FasL. En effet, les cellules B de souris déficientes pour FasL ne sont plus capables d'induire la tolérance dans un contexte de greffe de peau (Minagawa et al. 2004). De plus, une population de LB CD5⁺ exprimant FasL a été décrite comme entraînant l'apoptose des cellules effectrices CD4⁺ et pourrait être impliquée dans l'échappement des parasites à la réponse immunitaire (Lundy 2009). Les LB présentent aussi des propriétés anergisantes et pro-apoptotiques des cellules T par contact cellulaire, indépendamment de la voie Fas/FasL (Tretter et al. 2008). Morva et ses collègues ont également décrit chez l'homme des LB capables d'inhiber la maturation et la fonction des DC, et ce de façon dépendante d'un contact cellulaire (Morva et al. 2012).

Les Breg sont aussi impliqués dans la différenciation et la prolifération de cellules Treg (P. Reichardt et al. 2007; N. A. Carter et al. 2011). Par exemple, l'équipe de C. Mauri a mis en évidence, dans un modèle murin d'arthrite, une diminution de la quantité de cellules Treg corrélée à une augmentation de la sévérité de la maladie lorsque les LB ne sont plus capables de produire de l'IL-10 (N. A. Carter et al. 2011). De plus, dans un modèle de lupus chez la souris, la production d'IL-10 par les LB est décrite comme nécessaire au maintien de l'expression du facteur de transcription Foxp3⁺ par les cellules Treg CD4⁺CD25⁺, ainsi qu'à la diminution de l'inflammation (Scapini et al. 2011). Suite à une stimulation du TLR2, les LB induisent également la différenciation des cellules régulatrices de type Tr1 (Sayi et al. 2011). L'action des cellules B sur les Treg peut dépendre d'un contact cellulaire. En effet, Reichardt et ses collègues ont notamment montré que des LB naïfs, chargés avec un antigène, permettent l'induction de Treg *in vitro* à partir des cellules T naïves spécifiques de cet antigène et ce, de façon dépendante de la formation d'une synapse immunologique entre ces deux types cellulaires (P. Reichardt et al. 2007; N. A. Carter et al. 2011). De plus, certaines molécules telles que les molécules de costimulation CD40 (Tu et al. 2008) et B7, les molécules du CMH classique, ou encore la molécule CD1d exprimée par les Breg semblent importantes pour l'action de ces cellules sur les Treg. En effet, dans un modèle murin d'EAE, l'équipe de BN. Dittel a mis en évidence l'importance de l'expression de B7 par les LB dans l'infiltration du système nerveux central par des Treg Foxp3⁺ et dans la régulation de la maladie (Mann et al. 2007). Ashour et ses collègues ont également montré, dans un contexte

de tolérance périphérique oculaire, l'implication de cellules B présentant l'antigène sur les CMH de classe I et II dans l'induction de cellules Treg CD8⁺ et CD4⁺ (Ashour & Niederkorn 2006).

Dans différents modèles de MAI, l'expression par les Breg de la molécule CD1d, nécessaire à la présentation de glycolipides et phospholipides aux cellules NKT, semble être importante pour l'induction d'une tolérance immune dépendante des cellules régulatrices NKT (Sonoda & Stein-Streilein 2002; B. Wei et al. 2005).

Dernièrement, la molécule GITRL a également été mise en évidence comme étant impliquée dans la fonction régulatrice des Breg. En effet, chez les souris déficientes en LB, l'équipe de Dittel observe une diminution du nombre de cellules Treg CD4⁺Foxp3⁺ qui est restauré via le transfert de LB exprimant la molécule GITRL (Ray et al. 2012).

(c). Les anticorps protecteurs

Bien que la production d'anticorps par les LB ait été largement associée à l'induction de la réponse immune, il semble que les LB puissent exercer des fonctions régulatrices via la production de ces anticorps. Ces fonctions régulatrices seraient dépendantes de l'interaction des anticorps avec les récepteurs FcγR présents notamment sur les DC et les macrophages (Jankovic et al. 1998; Bayry et al. 2005). En effet, chez les souris μMT déficientes en LB, Moulin et ses collègues observent une augmentation de la production d'IL-12 par les DC, ainsi qu'une diminution de leur capacité à induire la différenciation de type Th2 (Moulin et al. 2000). L'étude d'un modèle d'infection par des parasites chez des souris μMT suggère que le rôle régulateur des LB dépend du récepteur FcγR (Jankovic et al. 1998). D'autre part, il est décrit que les modifications des groupements glycanes portés par la partie Fc des anticorps semblent importantes pour leur fixation à ces récepteurs. En effet, la sialylation des anticorps augmente leur pouvoir anti-inflammatoire (Kaneko et al. 2006). Une étude chez la souris montre que la sialylation des anticorps diminue leur fixation au récepteur FcγR classique et augmente leur affinité pour le récepteur SIGN-R1 (homologue de DC-SIGN humaine) (Anthony, Wermeling, et al. 2008). Ce phénomène semble favoriser l'expression du récepteur inhibiteur FcγRIIb par les macrophages, diminuant ainsi leur capacité pro-inflammatoire (Bruhns et al. 2003). Récemment, Karsten et ses collègues ont mis en évidence que les IgG1 fortement galactosylées, via leur fixation sur le récepteur FcγRIIb, favorisent l'association de celui-ci à la molécule Dectin-1, ce qui induit une inhibition de l'activité pro-inflammatoire du composant C5a du complément (Karsten et al. 2012). Il a également été montré qu'une immunisation répétée par un antigène augmente la fucosylation des anticorps (Gornik et al.

1999), entraînant une diminution du phénomène d'ADCC (Scallon et al. 2007). Enfin, l'existence d'anticorps anti-idiotypes (partie de l'anticorps qui reconnaît l'antigène) dirigés contre les autoanticorps, semble jouer un rôle important dans le maintien de la tolérance en neutralisant les autoanticorps et en inhibant leur sécrétion via la fixation au récepteur FcγRIIb (Hampe 2012). En effet, ce récepteur exprimé notamment par les macrophages, les DC et les LB, transmet un signal inhibiteur à la cellule après l'interaction avec les complexes immuns. Il est impliqué dans la régulation de l'activation des LB en inhibant le signal activateur transduit par le BCR. Il régule négativement la maturation des LB et la survie des plasmocytes en induisant un signal pro-apoptotique à la cellule (Nimmerjahn & Jeffrey V Ravetch 2008).

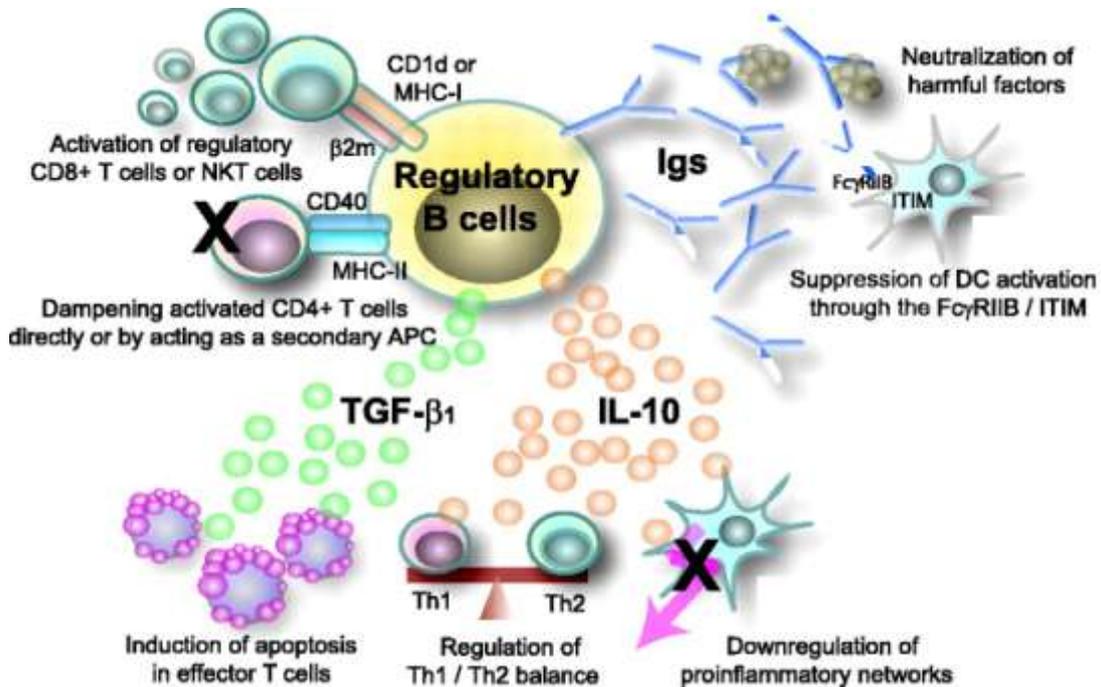


Figure 10: Schéma synthétisant les mécanismes de régulation des Breg à partir de Mizoguchi et al. (Atsushi Mizoguchi & Atul K Bhan 2006).

3.4. Induction de lymphocytes B régulateurs

L'ensemble des études réalisées chez la souris et chez l'homme montrent que les Breg semblent naturellement présents en faible quantité et que leur nombre augmente en cas d'inflammation, comme lors de MAI (Iwata et al. 2011). Diverses études montrent que ces cellules nécessitent une stimulation via le BCR, le CD40 ou le TLR pour exercer leur fonction. Les mécanismes d'induction des Breg sont très peu décrits. L'étude de Qian et ses

collègues montrent que les DC, via le CD40L et la cytokine IFN- β , seraient impliquées dans la différenciation de Breg exprimant le récepteur inhibiteur Fc γ RIIb (L. Qian et al. 2012). De façon intéressante, lors d'une étude clinique de phase I, l'injection de DC autologues tolérogènes chez des patients diabétiques entraîne une augmentation de cellules B qui possèdent des fonctions suppressives démontrées *in vitro* lors de réactions mixtes lymphocytaires (MLR) (Giannoukakis & Trucco 2012). Les résultats de cette étude appuient l'hypothèse que les DC pourraient être impliquées dans l'induction de Breg. D'autre part, il semble que la présence de TNF- α favorise la génération de Breg, comme le suggère l'étude de Schioppa et ses collègues. En effet, à la différence des LB de souris présentant un carcinome, le transfert de LB prélevés chez des souris déficientes pour le TNF- α n'est plus capable de favoriser l'expansion de tumeur (Schioppa et al. 2011).

Le rôle suppresseur des Breg a été rapporté par différentes études qui mettent en évidence le fort potentiel thérapeutique de ces cellules. En effet, la génération et l'expansion de Breg, afin de les injecter aux patients atteints de MAI ou transplantés, pourraient permettre de réguler la réponse immune. Certaines études ont montré qu'il était possible de générer des Breg *ex vivo*. En 2008, Rafei et ses collègues ont mis en évidence la possibilité d'induire des Breg producteurs d'IL-10 à partir de cellules spléniques ou de LB purifiés de souris naïves, traités avec du GIFT15 (molécule de fusion qui associe l'IL-15 et le GM-CSF). Ces GIFT15-Breg capables de supprimer l'EAE expriment des marqueurs (CD21, CD23, CD24, CD1d, IgD, IgM) communs aux cellules Breg T2-MZP. Une autre étude a également mis en évidence la possibilité de générer des cellules Breg à partir de splénocytes de souris naïves en les traitant pendant trois jours avec un anticorps anti-CD40. L'injection de ces Breg à une souris receveuse autologue le lendemain de la greffe permet d'inhiber le rejet chronique d'allogreffe cardiaque via la production d'IL-10 (Mallik et al. résultats non publiés, TTS Berlin 2012). L'utilisation de cellules Breg en thérapie cellulaire semble représenter une nouvelle approche prometteuse afin de réguler la réponse immunitaire dans différentes pathologies.

3.5. Les lymphocytes B régulateurs et la tolérance en transplantation

En transplantation, les LB ont majoritairement été décrits comme producteurs d'anticorps anti-donneur et donc comme étant délétères pour la survie du greffon. Néanmoins, à l'image des cellules T qui possèdent un double rôle effecteur et régulateur en transplantation, les cellules B semblent également participer à ces deux aspects de la réponse immune en transplantation.

(a). Des lymphocytes B nécessaires à l'induction de la tolérance

Le potentiel régulateur des LB a notamment été révélé par l'étude de Deng et ses collègues dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris, induite par un anticorps anti-CD45RB. En effet, l'absence de LB chez la souris receveuse (μ MT) dans ce modèle entraîne le rejet rapide du greffon, mettant en évidence la nécessité des LB dans l'induction de tolérance (Shaoping Deng et al. 2007). L'équipe de M.Sykes a également mis en évidence l'importance de la présence de LB du donneur dans la tolérance induite par la création d'un chimérisme chez la souris (Fehr et al. 2008). De plus, il semble que la tolérance puisse être induite en stimulant directement les LB. En effet, l'administration d'un anticorps de faible affinité dirigé contre la molécule TIM-1, majoritairement exprimée par les cellules B, induit la tolérance à l'allogreffe d'îlots pancréatiques. Les LB TIM-1⁺ de ces animaux tolérants sont capables de transférer la tolérance via la production d'IL-10, à un second animal non traité (Q. Ding et al. 2011; K. M. Lee et al. 2012).

(b). Des anticorps protecteurs

La présence de DSA est classiquement associée à une attaque du greffon par le système immunitaire. Cependant, dans certains modèles de xéno greffe ou d'allogreffe, il est possible d'observer la présence de DSA sans détérioration tissulaire et fonctionnelle du greffon (Koch et al. 2004). Ce phénomène appelé accommodation est généralement observé suite à une inhibition de la réponse lymphocytaire B, suivi d'un retour progressif des anticorps, et est souvent associé à l'expression de molécules cytoprotectrices. En effet, la surexpression de molécules telles que HO-1,IDO, NO, Bcl-2 et Bcl-XL qui protègent les cellules endothéliales du greffon en régulant la réponse immune, l'inflammation et l'apoptose, a été observée dans des greffons tolérés, malgré la présence de DSA (F. H. Bach et al. 1997; Soares et al. 1998; Y.-P. Jin et al. 2005; J. M. Heslan et al. 2006; Marcelo Hill, Zagani, et al. 2007). Il est suggéré que ces anticorps ne seraient pas délétères mais plutôt protecteurs vis-à-vis du greffon (Koch et al. 2004; X Zhang & E F Reed 2009) et pourraient être à l'origine de l'expression des molécules protectrices (Delikouras et al. 2003; Jindra et al. 2006).

(c). Des lymphocytes B associés à la tolérance chez l'homme

Bien qu'aucun protocole d'induction de tolérance (sans immunosuppresseur) chez l'homme ne soit mis en place à ce jour, il existe tout de même de rares patients "opérationnellement tolérants" (TOL) qui présentent une fonction stable de leur greffon après l'arrêt de leur traitement. Récemment, trois études majeures Européennes et Américaines, ont

été réalisées pour comparer les profils transcriptomiques et immunologiques des patients transplantés rénaux TOL avec ceux des patients sous traitements immunosuppresseurs présentant une fonction stable du greffon (STB), présentant des signes de rejet (CR) ou des volontaires sains (HV). Ces études visent à mettre en évidence la présence de biomarqueurs capables de prévenir d'un état propice à la tolérance ou au rejet, afin d'adapter voire de lever le traitement des patients transplantés. L'étude des patients TOL réalisée par l'équipe de notre laboratoire, dirigée par le Pr Souillou et le Dr Brouard, a tout d'abord mis en évidence une augmentation de la fréquence des LB et l'enrichissement de gènes liés aux LB dans le sang des patients TOL par rapport aux patients STB ou CR (Louis et al. 2006; Sophie Brouard et al. 2007). L'accumulation de LB dans le sang de ces patients TOL a été confirmée par une augmentation du nombre absolu des LB. Une analyse phénotypique a permis de mieux caractériser ces cellules comme étant de type mémoire, exprimant des molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40) et de migration (CD62L). Ces LB présentent également un profil inhibiteur, avec un ratio de l'expression des récepteurs activateur et inhibiteur (FcγRIIa/ FcγRIIb) diminué et une surexpression de la molécule BANK-1 impliquée dans l'inhibition de l'activation des cellules B dépendante de la signalisation via la molécule CD40 (Aiba et al. 2006). Les LB des patients TOL possèdent également un profil de LB régulateurs avec une accumulation de cellules CD1d⁺CD5⁺ (Annaick Pallier et al. 2010). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par les deux autres grandes études, qui montrent également une signature de gènes associés aux LB ainsi qu'une accumulation de LB dans le sang des patients TOL (K. A. Newell et al. 2010; Sagoo et al. 2010). Ils montrent que ces cellules B sont de type transitionnel et naïf, et sont capables de produire plus d'IL-10 suite à une stimulation polyclonale en comparaison avec les LB des patients non TOL. Ils ont également constaté une accumulation du transcript de la molécule CD20 (exprimée par les LB) dans les urines des patients tolérants (K. A. Newell et al. 2010). L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle possible des LB dans l'induction ou le maintien de la tolérance chez ces patients opérationnellement tolérants. Une des hypothèses actuelles propose qu'à la suite d'une immunosuppression, la reconstitution du compartiment des LB en présence des alloantigènes pourrait créer un environnement favorable au développement ou au maintien de la tolérance vis-à-vis du greffon. En effet, l'étude de Parsons et ses collègues réalisée chez la souris suggère que la déplétion du compartiment des LB au moment de la transplantation induirait la tolérance en déplaçant les clones B alloréactifs et en remodelant le répertoire des LB (Parsons et al. 2011). De plus, les résultats obtenus lors d'une étude chez l'homme mettent en évidence qu'à la suite de certains traitements immunosuppresseurs, le compartiment des LB est

recolonisé par des populations de LB particuliers, associés dans la littérature à des fonctions régulatrices. En effet, suite à un traitement d'induction à l'Alemtuzumab (anti-CD52), les auteurs observent une augmentation temporaire de la proportion de cellules de type transitionnel présentant un phénotype régulateur et une augmentation permanente de LB naïfs (Heidt et al. 2012). Ces LB présentant des capacités altérées de production d'IgG. Il est probable que ce défaut de réponse participe au maintien de la survie du greffon. Enfin, des résultats similaires ont été obtenus chez le primate non humain suite à une déplétion des LB via le Rituxumab (anti-CD20). La reconstitution du compartiment B par des cellules immatures et transitionnelles a été associée à une survie à long terme des greffes d'îlots pancréatiques (C. Liu et al. 2007).

D. Stratégies d'induction de tolérance en transplantation

Les immunosuppresseurs actuellement utilisés en transplantation ont permis d'améliorer la survie des greffons à court terme. Cependant, l'administration de ces traitements ne permet pas d'améliorer la survie des greffons à long terme. Les immunosuppresseurs sont également responsables de lourds effets secondaires comme la cytotoxicité, l'augmentation du risque d'infections et de cancers. C'est pourquoi, les recherches actuelles en transplantation visent à identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'induire une tolérance à long terme spécifique du greffon. La tolérance se définit par une acceptation du greffon en absence d'immunosuppresseurs, avec le maintien des capacités à induire une réponse immune contre d'autres pathogènes. La possibilité d'induire une tolérance en transplantation fut démontrée pour la première fois par Billingham, Brent et Medawar en 1953 (Billingham et al. 1953). Ils mirent en évidence l'induction d'une tolérance à l'allogreffe de peau chez la souris en exposant le receveur aux antigènes du donneur au stade fœtal. Par la suite, de nombreux autres modèles animaux démontrèrent la possibilité d'induire une tolérance en transplantation. Pourtant, bien qu'il existe quelques rares cas de tolérance dite «opérationnelle» chez l'homme, aucun protocole d'induction de tolérance en transplantation n'est actuellement disponible. En effet, certains protocoles utilisés chez l'animal ne sont pas applicables en clinique et d'autres ne fonctionnent pas. Ces échecs pourraient s'expliquer par la fréquence importante de cellules mémoires chez l'homme comparé à l'animal de laboratoire, peu exposé aux antigènes étrangers (Nadazdin et al. 2011). Différentes études ont pu démontrer le rôle délétère de la présence de lymphocyte T et B mémoires pour la survie de la greffe (Bingaman & Farber 2004). Les cellules mémoires induites avant la transplantation par une immunisation lors de transfusions sanguines, d'une première greffe, d'une grossesse ou encore par des antigènes de l'environnement, entraînent une augmentation du risque de rejet de greffe chez l'homme (P S Heeger et al. 1999; Nickel et al. 2004). Récemment, l'équipe de P.Reinke a mis en place un modèle de transplantation d'allogreffe cardiaque chez le rat qui permet d'étudier le rôle des cellules T mémoires dans le rejet et de tester l'efficacité de nouveaux protocoles d'induction de tolérance en présence de ces cellules mémoires (Siepert et al. 2012).

Enfin, l'induction de tolérance telle qu'elle est définie est difficilement applicable chez l'homme en raison du risque élevé à supprimer les traitements immunosuppresseurs. C'est pourquoi les tests cliniques actuels et futurs portent majoritairement sur l'utilisation de stratégies thérapeutiques qui utilisent de faibles doses d'immunosuppresseurs, afin d'induire

un état partiel de tolérance tout en minimisant les effets secondaires des traitements (Calne et al. 1998).

I- L'induction de chimérisme hématopoïétique

L'induction d'un chimérisme hématopoïétique correspond à la colonisation des organes lymphoïdes primaires du donneur par les cellules du receveur. Ces cellules participant au mécanisme de sélection de la tolérance centrale, les lymphocytes capables de reconnaître les antigènes du donneur sont éliminés de la même façon que les lymphocytes reconnaissant des autoantigènes. Le chimérisme est induit par une greffe de moelle osseuse ou par injection au receveur de cellules souches hématopoïétiques purifiées du donneur. De nombreuses études réalisées chez l'animal mais également chez l'homme mettent en évidence l'induction d'une tolérance à l'allogreffe suite à l'établissement d'un chimérisme hématopoïétique (Sachs et al. 2011). Cependant, l'utilisation de cette stratégie est encore limitée en raison de la toxicité des traitements d'induction (irradiation totale ou thymique...) (Bölling et al. 2011) et du risque de réactions des cellules du donneur contre le receveur, la GVHD (graft versus host disease). Actuellement, seuls les patients atteints d'un cancer et nécessitant une greffe sont potentiellement concernés par ce type de traitements.

II- La déplétion lymphocytaire

Les lymphocytes étant les acteurs majeurs du rejet, ils sont donc la cible de traitements immunosuppresseurs utilisés actuellement chez les patients transplantés. Les traitements déplétants comme l'ATG (anti-thymocyte globulins), l'OKT3 (anti-CD3) qui ciblent les lymphocytes T ou le Rituximab (anti-CD20) qui déplete les LB, sont généralement utilisés comme traitement d'induction, c'est-à-dire, juste après la greffe (parfois avant) afin d'induire une immunosuppression intense et rapide au moment où la réponse immunitaire du receveur est la plus forte.

L'ATG est l'un des plus anciens traitements déplétants utilisés. Il est constitué d'Ig purifiées à partir du sérum d'animaux (lapin, cheval) immunisés avec des lymphocytes humains. L'ATG favorise les Treg *in vitro* (Lopez et al. 2006) et fait actuellement l'objet d'une étude clinique par Markmann et ses collègues. Cette étude consiste à tester l'efficacité de l'utilisation de l'ATG et du Rituximab pour inhiber le rejet d'allogreffes lorsqu'ils sont associés temporairement à des inhibiteurs de calcineurines.

L'anti-CD3, OKT3, bien qu'efficace pour l'inhibition du rejet aigu des greffes de reins, de foies et de cœurs, il peut entraîner de nombreux effets indésirables comme l'induction du syndrome inflammatoire, déclenché par le relargage de cytokines par les lymphocytes T ciblés par l'anticorps. L'OKT3 est donc utilisé exceptionnellement, par exemple lors de rejets résistants aux corticoïdes. Cependant, de nouveaux anticorps anti-CD3, modifiés pour éviter la réponse inflammatoire, ont été générés, comme le Teplizumab. Celui-ci est actuellement soumis à des études cliniques dans le cadre de maladies auto-immunes et pourrait être utilisé par la suite en transplantation (Sherry et al. 2011).

L'anti-CD20 (Rituximab) permet de dépléter l'ensemble des LB à l'exception des plasmocytes et présente l'avantage d'inhiber les LB mémoires. Malgré l'utilisation en routine de ce traitement, son efficacité en transplantation n'a pas encore été démontrée lors d'études contrôlées chez l'homme. Néanmoins, une étude chez le primate non humain a permis de montrer que l'utilisation du Rituximab, associé à l'ATG comme traitement d'induction et à la Rapamycine comme traitement d'entretien, permet d'induire la survie à long terme d'ilots pancréatiques (C. Liu et al. 2007). Dans cette étude, la déplétion lymphocytaire est suivie d'une recolonisation du compartiment des LB par des cellules immatures/transitionnelles qui ont été associées, dans d'autres études, à la tolérance en transplantation. Comme je l'ai mentionné ci-dessus, le Rituximab associé à l'ATG fait actuellement l'objet d'une étude clinique réalisée par Markmann et ses collègues.

L'anti-CD52 (Alemtuzumab ou Campath-1), qui cible à la fois les lymphocytes T et B, semble favoriser l'induction d'une tolérance chez l'homme, comme le montre l'étude de Heidt et ses collègues. En effet, la déplétion par l'Alemtuzumab crée un environnement propice à la tolérance via l'induction de cellules B présentant un profil de cellule régulatrice (Heidt et al. 2012). De plus, le traitement à l'Alemtuzumab semble compatible avec l'utilisation de doses plus faibles de traitements immunosuppresseurs toxiques à long terme, comme les inhibiteurs de calcineurines (Calne et al. 1999; Ellis et al. 2007). Actuellement, des études cliniques sur l'induction de la tolérance sont en cours afin de tester l'efficacité de l'Alemtuzumab associée à d'autres stratégies comme l'injection de cellules régulatrices, de cellules souches du donneur ou à un blocage de la costimulation (Page et al. 2012).

III- Le blocage de la costimulation

Certaines stratégies se basent sur la nécessité d'une costimulation pour l'activation des lymphocytes et sur l'implication de l'absence de cette costimulation dans la génération de cellules anergiques ou régulatrices. En effet, le blocage des voies de costimations comme

stratégie d'immunosuppression a fait ses preuves sur des modèles animaux. Au sein de notre laboratoire, l'utilisation des molécules telles que le CD40-Ig, CTLA4-Ig, ou l'anti-CD28 a permis d'induire la tolérance dans des modèles d'allogreffe. En effet, l'injection le jour de la greffe d'un adénovirus codant pour la molécule CD40-Ig (partie extracellulaire du CD40 associé au fragment Fc d'une Ig) permet de bloquer l'interaction CD40-CD40L et d'induire une survie à long terme de l'allogreffe chez le rat. Cette tolérance est dépendante de la présence de cellules $CD8^+CD45R^{low}$, capables d'induire l'expression par les cellules endothéliales de la molécule protectrice IDO, via la sécrétion d'IFN- γ (Guillonnet et al. 2007). De même le CTLA4-Ig, une molécule qui bloque l'interaction B7/CD28/CTLA4 en se fixant sur les molécules B7, permet d'induire la tolérance dans des modèles d'allogreffes (H. Lin et al. 1993; H. Azuma et al. 1996; Marcelo Hill, Zagani, et al. 2007). Une étude pré-clinique réalisée chez le primate a montré que le Belatacept, une version améliorée du CTLA4-Ig (LEA29Y) ayant une plus forte affinité, induit une survie du greffon similaire à celle obtenue avec d'autres traitements actuellement utilisés, mais permet d'obtenir une fonction rénale améliorée (Larsen et al. 2005). En 2011, le Belatacept a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et son indication est approuvée pour une utilisation combinée à d'autres immunosupresseurs. Enfin, l'équipe de notre laboratoire dirigée par le Dr B.Vanhove a mis en évidence le caractère prometteur du blocage de l'interaction activatrice B7/CD28 et le maintien de l'interaction inhibitrice B7/CTLA-4, en générant un anticorps anti-CD28 (JJ319) capable d'induire la tolérance à l'allogreffe de rein chez le rat (Haspot et al. 2005). Le blocage sélectif de CD28 favorise l'augmentation du nombre de Treg et l'expression de molécules régulatrices comme CTLA-4, IDO, HO-1 et le TGF- β . Suite aux résultats encourageants chez le rongeur, cette équipe a généré un anticorps monovalent antagoniste anti-CD28 chez l'homme (Sc28AT). Cet anticorps permet d'éviter le rejet aigu et chronique d'allogreffe rénale ou cardiaque chez le primate non humain (Nicolas Poirier et al. 2010). Ils ont par la suite généré une version améliorée de cette molécule, le FR104, qui possède une durée de vie augmentée et une meilleure stabilité chimique. De façon dépendante du CTLA-4, cette nouvelle molécule est capable d'inhiber la xéno-GVHD induite chez des souris SCID (severe combined immunodeficiency) humanisées via l'injection de PBMC (peripheral blood mononuclear cell) humaines (N Poirier et al. 2012). L'étude pré-clinique de cette molécule sur le primate non humain en monothérapie ou associée à d'autres immunosupresseurs est actuellement en cours. Malgré les résultats prometteurs de ces études, il est peu probable que l'utilisation seule de molécules bloquant la costimulation puisse induire une tolérance à long terme, en particulier chez l'homme. En effet, différentes études

sur des modèles expérimentaux ont mis en évidence la résistance des cellules T mémoires face à la plupart des traitements basés sur l'inhibition de la costimulation (Valujskikh et al. 2002; Zhai et al. 2002). Or, comme je l'ai évoqué précédemment, la présence de cellules mémoires chez les patients transplantés représente un obstacle à l'acceptation du greffon. Certaines études chez l'animal ont pu démontrer la possibilité de combiner des traitements bloquant la costimulation et des inhibiteurs de molécules d'adhérences, comme l'anti-LFA-1, pour inhiber la fonction des cellules mémoires (Kitchens et al. 2012) et le rejet d'allogreffe (Badell et al. 2010). Ainsi, il semble nécessaire que les études sur les molécules visant à bloquer la costimulation s'intéressent à leur action sur les populations de cellules mémoires et sur leur efficacité lorsqu'elles sont combinées à d'autres traitements.

IV- L'inhibition de la migration cellulaire

La migration des cellules de l'immunité est indispensable à la réponse induite contre le greffon. Dernièrement, l'équipe de P. Bousso a particulièrement bien mis en évidence cette dynamique des cellules qui migrent et interagissent afin d'induire cette réponse immune. En utilisant une nouvelle technique de microscopie biphotonique, ils ont démontré l'importance dans le rejet de l'infiltration rapide des DC et des monocytes du donneur dans le greffon, suivie de leur migration dans les OLS. Ces cellules activent les lymphocytes T alloréactifs qui vont à leur tour migrer au niveau du greffon pour le détruire (Celli et al. 2011). La mobilité des cellules implique un remodelage intracellulaire du cytosquelette d'actine contrôlé notamment par des petites molécules GTPase. Les molécules d'adhésion exprimées par les cellules de l'immunité et les cellules endothéliales sont également importantes pour la migration cellulaire. Elles permettent aux leucocytes de se fixer à la barrière endothéliale du greffon et de la traverser. Elles sont également nécessaires à la stabilité des interactions cellulaires et donc à l'activation des cellules effectrices. Certaines stratégies ciblant la migration et l'adhésion cellulaire ont été utilisées dans des modèles animaux pour réguler la réponse immune en transplantation. L'utilisation d'une combinaison des anticorps anti-LFA-1 et anti-VLA-4, ciblant deux molécules d'adhésion, permet d'induire une prolongation de survie des allogreffes d'îlots pancréatiques chez le rat (H Yang et al. 1995). Ohki et ses collègues ont montré que l'inhibition de la voie Rho GTPase permet de prolonger la survie d'allogreffes cardiaques chez la souris, en limitant la migration leucocytaire au sein du greffon (Ohki et al. 2001). En accord avec ces résultats, une autre étude a mis en évidence l'induction d'une tolérance à l'allogreffe cardiaque de rat via l'inhibition de la GTPase RhoA, qui entraîne une modification du cytosquelette d'actine des cellules T et l'inhibition de leur

infiltration au sein du greffon (Skelton et al. 2010). Un nouvel agent immunosuppresseur, le beta-SQAG9, permet d'induire la tolérance à l'allogreffe de peau chez le rat via l'inhibition de la migration des DC en se liant à la molécule CD62L (Takenouchi et al. 2005). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la migration cellulaire semble être une stratégie qui pourrait potentiellement permettre d'induire la tolérance en transplantation chez l'homme.

V- L'induction et le transfert de cellules régulatrices

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. La thérapie cellulaire utilisant notamment les Treg et les DC tolérogènes est de plus en plus envisagée.

L'utilisation de cellules Treg dans des modèles animaux a déjà permis d'évaluer leur potentiel régulateur en transplantation. Chez la souris, l'injection de Treg CD4⁺CD25⁺ cultivées *ex vivo* permet d'induire une prolongation de la survie d'allogreffes (G. Xia et al. 2008). De même, l'expansion et l'injection de Treg humaines dans des souris humanisées permettent d'inhiber l'alloréponse immune contre des greffes humaines. En effet, Sagoo et ses collègues ont mis en évidence l'induction de la survie d'allogreffes de peaux humaines, via l'injection de cellules Treg spécifiques de l'alloantigène chez des souris humanisées. Au cours de cette étude, ils ont pu mettre en évidence une méthode permettant d'enrichir *ex vivo* une population de Treg en cellules allo-spécifiques. La technique est basée sur la sélection des cellules T régulatrices exprimant les molécules d'activation CD69 et CD71, suite à une stimulation *in vitro* avec des DC allogéniques (Sagoo et al. 2011). L'équipe de K.Wood a également montré la survie d'allogreffes de peaux humaines chez des souris humanisées, en injectant des cellules Treg polyclonales générées et amplifiées *ex vivo* (Issa et al. 2010). Cette stratégie semble aussi efficace pour inhiber le rejet chronique, comme le suggère une autre étude réalisée par la même équipe. En effet, ils ont mis en évidence que l'injection de ces Treg humaines chez les souris humanisées permet d'inhiber l'athérosclérose d'artères humaines greffées, en inhibant la fonction et l'infiltration des cellules effectrices (Satish N Nadig et al. 2010). De plus, ils ont également mis en évidence que le traitement des souris avec de faibles doses de Rapamycine permet d'améliorer l'effet des Treg lorsqu'elles sont injectées en plus faible quantité (J Hester et al. 2012). L'ensemble de ces résultats met en évidence le potentiel thérapeutique des cellules Treg humaines en transplantation. Cependant, l'injection de cellules Treg chez les patients transplantés n'est pas sans risque, en raison de leur plasticité qui leur permettrait dans des conditions particulières de se comporter en

cellules effectrices productrices de cytokines pro-inflammatoires (X. Zhou et al. 2009). Néanmoins, l'utilisation de certains immunosuppresseurs comme la Rapamycine, combinée à l'injection des cellules T régulatrices, pourrait diminuer les risques (Noris et al. 2007).

Dans l'optique d'utiliser les cellules régulatrices pour favoriser la tolérance du greffon, il est important de noter que certains traitements immunosuppresseurs semblent avoir des effets délétères sur les Treg. C'est notamment le cas des inhibiteurs de la calcineurine (Demirkiran et al. 2008; Fourtounas et al. 2010) qui inhibent l'expansion et la fonction des Treg *in vitro* et *in vivo* (W Gao et al. 2007), probablement via l'inhibition de l'expression de Foxp3 (Baan et al. 2005). En revanche, d'autres traitements comme les corticostéroïdes, l'ATG (Anti-Thymocyte Globulin) ou le Campath-1H (anti-CD52, Alemtuzamab), semblent favorables à l'expansion des Treg (Lopez et al. 2006; Minamimura et al. 2006; Noris et al. 2007; X. Feng et al. 2008; Bloom et al. 2008). La Campath-1H et l'ATG ne semblent pas induire la délétion des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ et permettent la différenciation de cellules T CD25⁻ en cellules T CD4⁺CD25⁺ qui présentent alors des fonctions suppressives. De même, la Rapamycine, un inhibiteur de mTOR, favorise l'augmentation de la population des Treg en favorisant leur prolifération et leur génération à partir de cellule CD4⁺ naïves, tout en diminuant la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Baan et al. 2005; Segundo et al. 2006; Battaglia et al. 2006; W Gao et al. 2007; S. A. Long & Buckner 2008). Le choix des traitements IS est donc important afin de favoriser la génération de Treg et de ne pas supprimer cette population, tout en inhibant l'action des T effecteurs.

Une autre population, les DC tolérogènes, est également envisagée en thérapie cellulaire pour induire la tolérance en transplantation d'organes. Leur capacité régulatrice, suite à un transfert, a été mise en évidence dans différents modèles animaux. Par exemple, l'injection de BMDC immatures du donneur au receveur, plusieurs jours avant la transplantation, permet de prolonger la survie d'allogreffes cardiaques chez la souris (Fu et al. 1996; L Lu et al. 1997). Notre équipe a également mis en évidence l'induction d'une tolérance à l'allogreffe cardiaque de rat suite à l'injection au receveur, la veille de la greffe, de BMDC autologues, associée à un cours traitement immunosuppresseur (LF15-0195) en doses sous-optimales (M Hill et al. 2011). La connaissance du donneur avant de générer les cellules n'étant pas nécessaire, l'utilisation de cellules autologues permet d'envisager cette stratégie chez l'homme, non seulement lorsque le greffon vient d'un donneur vivant, mais également lorsque le donneur est décédé. De la même façon que pour les cellules Treg, il n'est pas exclu que les DC tolérogènes puissent se différencier en cellules immunogènes lorsqu'elles seront injectées et exposées à un environnement inflammatoire induit par la greffe. L'association

avec des immunosuppresseurs pourrait également diminuer les risques d'induction d'une réponse immunogène par les DC injectées.

Notre équipe participe actuellement à une étude clinique internationale de phase I/II, *The ONE Study, 7th Frame Program, European Commission*. 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 (DC, Treg...) à des patients transplantés rénaux recevant un traitement immunosuppresseur minimisé. Les résultats sont très attendus et vont permettre de savoir si cette stratégie est efficace et envisageable en routine.

Les stratégies évoquées ne permettent actuellement pas de se passer des immunosuppresseurs. Néanmoins, ils permettent d'envisager une diminution des doses utilisées ou l'utilisation de traitements moins toxiques. Cependant, nombre d'entre elles efficaces chez l'animal pourraient ne pas fonctionner chez l'homme. C'est pourquoi, ne disposant pas actuellement d'une stratégie satisfaisante pour éviter le rejet chronique et l'utilisation d'immunosuppresseurs, il est nécessaire d'améliorer nos connaissances sur l'ensemble des mécanismes immunologiques de la tolérance et du rejet en transplantation.

Résultats

Comme je l'ai décrit en introduction de cette thèse, à l'heure actuelle, l'un des objectifs majeurs en transplantation est l'induction d'une tolérance à long terme, spécifique du greffon. L'utilisation des immunosuppresseurs a permis de mieux contrôler le rejet aigu et d'améliorer considérablement la survie des greffons à court terme. Cependant, ces traitements sont inefficaces contre la perte des greffons à long terme principalement due au rejet chronique. Cette thèse a donc eu pour objectif l'étude des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre, dans le futur, de générer de nouveaux outils pour induire la tolérance à long terme.

Notre équipe a précédemment mis en évidence qu'un court traitement immunosuppresseur, le LF15-0195, permet l'induction d'une tolérance à long terme d'allogreffes cardiaques chez des rats incompatibles pour les molécules du CMH (E Chiffolleau et al. 2002). Afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans cette tolérance, une étude par puce à ADN a préalablement été réalisée par notre équipe pour comparer les gènes exprimés dans les greffons tolérés et ceux développant un rejet chronique (modèle de transfusion de sang du donneur) (J. M. Heslan et al. 2006). L'analyse de ces puces a permis de mettre en évidence la présence de mécanismes régulateurs au sein du greffon avec l'expression de molécules de protection de la cellule endothéliale (J. M. Heslan et al. 2006; P Thebault et al. 2007). Les résultats suggèrent également la présence d'une régulation de la réponse humorale chez les rats tolérants avec une inhibition des gènes associés à la production d'anticorps. C'est pourquoi, en première partie de ces résultats, nous avons tenté de caractériser la réponse lymphocytaire B dans notre modèle de tolérance. De plus, l'analyse des puces à ADN a mis en évidence une molécule inconnue qui est inhibée dans les allogreffes tolérées. Ainsi, en seconde partie, nous avons tenté de caractériser la fonction et la régulation immunologique de cette nouvelle molécule que nous avons nommée LIME (LPS-induced molecule).

A. Modèles d'allogreffes cardiaques chez le rat

L'allogreffe cardiaque est réalisée entre des rats de fond génétique Lewis, d'haplotypes RT1 (système du CMH chez le rat) (Figure 11) incompatibles pour les molécules de CMH. Le greffon est prélevé chez un rat Lewis.1W (RT1u) et transplanté chez un rat Lewis.1A (RT1a). Le donneur et le receveur sont âgés de 8 à 12 semaines. Le cœur est

greffé en position hétérotopique dans la cavité abdominale selon la méthode décrite par Ono et Lindsey (K. Ono & Lindsey 1969). Le suivi du fonctionnement de la greffe se fait par palpation à travers la paroi abdominale. Le rejet est défini par l'arrêt des battements. En absence de tout traitement, l'allogreffe est rejetée $6 \pm 0,6$ jours après la greffe (J. P. Soullillou et al. 1984).

I- Le modèle de tolérance induit par le LF15-0195

Notre équipe a démontré que l'injection, pendant 20 jours d'un traitement immunosuppresseur, le LF15-0195 (3mg/Kg en intrapéritonéale (IP)), un analogue de la déoxyspergualine, permet d'induire une tolérance à long terme des allogreffes cardiaques de rat (E Chiffolleau et al. 2002) (Figure 11).

1.Le LF15-0195

1.1. Propriétés immunosuppressives

Le LF15-0195 (Laboratoires Fournier, Daix, France) est une molécule analogue de la déoxyspergualine (DSG) (Lebreton et al. 1999) qui est un dérivé de la spergualine, une molécule isolée à partir de *Bacillus Laterosporus* (T. Takeuchi et al. 1981). L'étude de la DSG, initialement synthétisée comme agent anti-tumorale, a permis de mettre en évidence ses propriétés immunosuppressives. Par la suite, la DSG a donc été testée dans divers modèles de transplantation chez l'animal. Son efficacité a été démontrée dans la prolongation de la survie d'allogreffes de cœurs, de reins, d'îlots pancréatiques (Dickneite et al. 1986) et de peaux (Nemoto et al. 1987).

La DSG ne présentant pas des propriétés physico-chimiques satisfaisantes, des analogues ont été synthétisés parmi lesquels, le LF15-0195, qui présente une meilleure résistance à l'hydrolyse et au métabolisme oxydatif *in vivo* (Lebreton et al. 1999). Les propriétés immunosuppressives du LF15-0195 ont initialement été testées et confirmées dans un modèle de GVHD chez la souris (Lebreton et al. 1999) puis dans d'autres modèles de rongeurs. Son efficacité a été mise en évidence en transplantation (E Chiffolleau et al. 2002; W.-P. Min et al. 2003; D. Zhou et al. 2003; H. Wang et al. 2003), mais également dans des modèles de maladies auto-immunes, dans l'arthrite (P Ducoroy et al. 2001) et dans l'EAE (Duplan et al. 2006). Suite aux résultats encourageants obtenus chez le rongeur, le LF15-0195 a été testé dans un modèle préclinique et permis une prolongation de survie d'allogreffes rénales chez le primate non humain (Hongji Yang et al. 2003).

1.2.Mécanismes de suppression

(a).Interaction avec l'Hsc70, une molécule de choc thermique

Il a été démontré que le LF15-0195 est capable de se lier à l'Hsc70 (Komesli et al. 1999), une molécule appartenant à la famille des protéines de choc thermique. Ces molécules possèdent plusieurs fonctions comme celle de molécule chaperonne. Elles interagissent avec des peptides ou des protéines, modifient leur conformation et peuvent également faciliter leur translocation entre différents compartiments cellulaires (Gething & Sambrook 1992). De plus, ces molécules ont également été associées au mécanisme de présentation antigénique par les molécules de CMH exprimées par les APC (Srivastava et al. 1994).

(b).Induction de la mort cellulaire

Il semble que l'effet immunosuppresseur du LF15-0195 puisse être dû à son rôle dans l'induction de la mort cellulaire des cellules T. Le LF15-0195 semble favoriser l'élimination de ces cellules en les sensibilisant à la mort cellulaire induite par activation (AICD). Ducoroy et ses collègues ont mis en évidence un rôle pro-apoptotique du LF15-0195, qui favoriserait l'activation des caspases 8 et 10 dans les cellules T, suite à l'engagement de la molécule Fas (CD95). Cette effet fut confirmé par les auteurs dans un modèle de souris dans lequel le LF15-0195 inhibe la GVHD en induisant l'apoptose des cellules T du donneur via un mécanisme dépendant de la voie Fas/FasL (Patrick Ducoroy et al. 2003).

(c).Inhibition de la voie NF-kB et induction de DC tolérogènes

L'étude de Yang et ses collègues a permis de mettre en évidence l'inhibition de la voie NF-kB par le LF15-0195 (Jinming Yang et al. 2003). Le NF-kB est un facteur de transcription nécessaire à l'activation des lymphocytes et des DC. Lorsque les cellules sont au repos, le NF-kB est séquestré dans le cytoplasme par une protéine kinase inhibitrice, IκB, qui en se liant au NF-kB, masque son domaine de translocation nucléaire. Suite à un signal d'activation, d'autres protéines kinases, les IKK, sont phosphorylées et vont à leur tour phosphoryler la molécule IκB. Celle-ci est alors ubiquitinylée et dégradée. Le NF-kB est libéré et migre dans le noyau pour réguler de nombreux gènes en se fixant au domaine KB de leur région régulatrice (Denk et al. 2000). Le LF15-0195 inhibe la phosphorylation d'IκB empêchant la translocation de NF-kB dans le noyau. Yang et ses collègues ont montré que le LF15-0195 peut induire *in vitro* des DC tolérogènes résistantes à la maturation en inhibant la voie NF-kB (Jinming Yang et al. 2003). Min et ses collègues ont également décrit l'induction

de DC tolérogènes via l'inhibition de la voie NF- κ B dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque de souris induit par le LF15-0195 (W.-P. Min et al. 2003).

2. Résultats préalablement obtenus dans le modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat induite par le LF15-0195

L'étude de l'effet direct du LF15-0195 (5 jours après la transplantation) sur les animaux greffés a permis de démontrer que ce traitement induit une forte inhibition de la réponse des anticorps anti-donneurs, de la réponse Th1 ainsi qu'une inhibition de l'infiltrat leucocytaire dans les greffons comparés aux animaux non traités (E Chiffolleau et al. 2002).

Suite à l'arrêt du traitement, l'analyse du sérum des animaux tolérants, 100 jours après la transplantation, montre un retour de la production des anticorps en périphérie (J. M. Heslan et al. 2006). Par ailleurs, la rate et le greffon des animaux tolérants sont fortement infiltrés par des cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ qui représentent 20-25% des cellules CD4⁺ et dont la moitié d'entre elles exprime le facteur de transcription Foxp3⁺ (J.-M. Heslan et al. 2005). Notre équipe a également montré que ces cellules régulatrices sont spécifiques des antigènes du donneur et sont capables de transférer la tolérance à un second receveur syngénique (E. Chiffolleau et al. 2002).

Afin de caractériser les mécanismes responsables de la tolérance, notre équipe a réalisé des analyses comparatives par puce à ADN, du transcriptome des allogreffes tolérées à long terme (Tol) avec celui des allogreffes développant un rejet chronique (CR) (modèle DST: transfusion de sang du donneur) ou de greffes syngéniques (Syng) (J. M. Heslan et al. 2006). Sur les 27000 gènes testés, peu sont différemment exprimés entre les greffons Tol et les greffons CR. De façon intéressante, les gènes surexprimés dans les greffons Tol codent pour des molécules cytoprotectrices comme iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), HO-1, IDO ou encore la chaîne IL27p28. Des gènes codant pour des molécules liées aux cellules T régulatrices comme LAG-3, CCR4, ou encore pour des cytokines comme l'IFN- γ et des chimiokines sont également surexprimés. Ces résultats sont cohérents avec l'infiltrat leucocytaire et l'accumulation de Treg observés dans les greffons Tol. Des molécules de cytotoxicité (Granzyme A, B, perforine) ont également été mises en évidence dans les greffons Tol. L'expression de ces molécules pourrait refléter la présence de cellules effectrices mais également représenter la fonction suppressive des Treg utilisant la voie Granzyme/Perforine pour réguler les cellules effectrices et protéger les cellules endothéliales du greffon (J. M. Heslan et al. 2006).

Par la suite, notre équipe a démontré que certaines molécules protectrices des cellules endothéliales comme IDO étaient exprimées dans les greffons par ces cellules et que les cellules T régulatrices étaient responsables de cette expression via la production d'IFN- γ (P Thebault et al. 2007). L'ensemble de ces résultats confirme que la tolérance dans ce modèle, est un phénomène actif qui permet la mise en place d'un environnement protecteur dans le greffon. Notre équipe a également mis en évidence l'expression de la molécule CLEC-1 (c type lectin like-1) par les cellules endothéliales et myéloïdes des greffons des animaux tolérants (P Thebault et al. 2009). L'étude de CLEC-1 montre qu'elle est induite par des médiateurs immuno-régulateurs et par les cellules T régulatrices. Elle semble impliquée dans l'inhibition de la réponse Th17 au profit des cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ et des cellules Th2 (P Thebault et al. 2009).

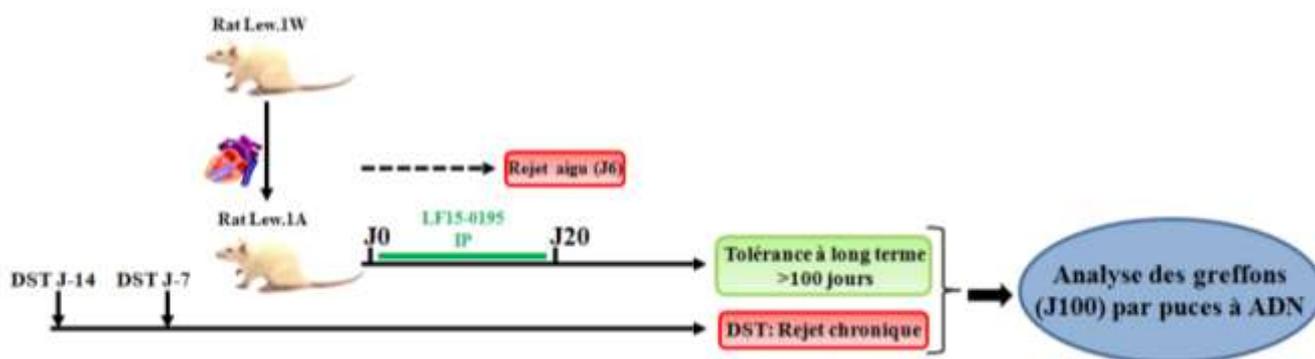


Figure 11: Modèles d'induction de tolérance (LF15-0195) et de rejet chronique (DST) d'allogreffes cardiaques chez le rat

II- Le modèle de rejet chronique (DST)

L'objectif de notre étude est de mettre en évidence et de caractériser des mécanismes immunologiques spécifiques de la tolérance en transplantation. C'est pourquoi, nous réalisons l'analyse de notre modèle de tolérance en le comparant à un modèle de rejet chronique d'allogreffe cardiaque chez le rat, qui implique les mêmes souches de rats et la même combinaison de donneurs et de receveurs (DST= transfusion de sang du donneur).

Dans ce modèle de DST, le rejet chronique est induit par l'injection en intraveineuse d'1ml de sang du donneur (Rat Lewis.1W) au receveur (rat Lewis.1A), 14 et 7 jours avant l'allogreffe (Figure 11). Malgré l'existence de mécanismes régulateurs responsables de l'inhibition du rejet aigu chez les animaux traités par DST, ils ne sont pas suffisants pour empêcher l'apparition du rejet chronique (J. M. Heslan et al. 2006; Ballet et al. 2009).

Les rats du modèle DST présentent une forte alloréponse des cellules T CD4⁺ producteurs d'IFN γ à long terme (J>100). Ces animaux sont également caractérisés par une production rapide d'anticorps anti-CMH de classe I et II du donneur dans le serum, ainsi qu'au sein du greffon. De plus, ceux-ci présentent un dépôt de C4d sur la paroi des capillaires et des artères dès 7 jours après la greffe qui persiste au cours du temps. Ce dépôt est interprété comme une activation de la voie du complément et de la réponse humorale chez ces animaux (Ballet et al. 2009).

Les greffons des animaux du modèle DST présentent des signes histologiques caractéristiques du rejet chronique. Les greffons sont rapidement infiltrés après la transplantation, par des leucocytes (Ballet et al. 2009), principalement des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que des macrophages (J. M. Heslan et al. 2006). Ils présentent également des dommages vasculaires qui apparaissent au cours du temps. Le greffon se fibrose progressivement, les artères s'obstruent suite à l'épaississement de l'intima liée à l'infiltration leucocytaire des endothéliums et à la prolifération myofibroblastique inflammatoire (J. M. Heslan et al. 2006; Ballet et al. 2009) (Figure 12).

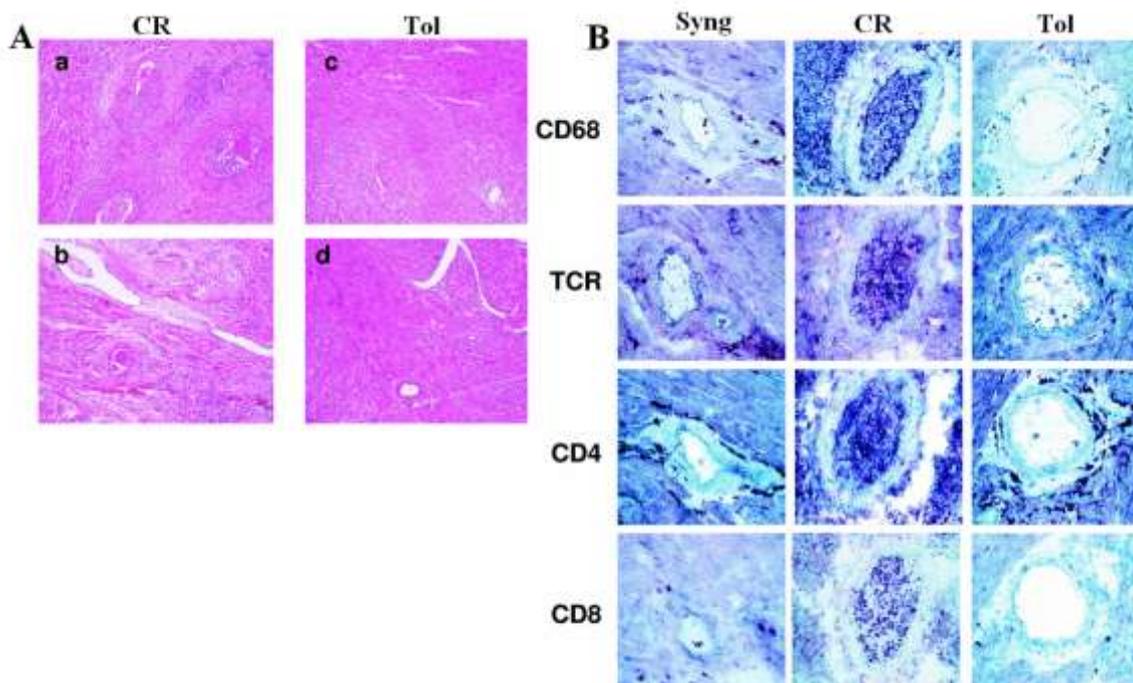


Figure 12: Images représentant les lésions et l'infiltration cellulaire dans des greffes cardiaques (J100) syngéniques (Syng), en rejet chronique (CR) ou tolérées (Tol) à partir de Heslan et al. (J. M. Heslan et al. 2006)

(A) Marquages de coupes de greffons à l'hématoxyline-éosine-safran. Observations: fibrose, lésions tissulaires dans les greffons CR, absence de lésions et de fibrose dans les greffons Tol. (B) Immunomarquages de coupes de greffons à la peroxydase. Observations: absence d'infiltration cellulaire au sein des greffons Syng, forte infiltration et obstruction des artères dans les greffons CR et faible infiltration sans obstruction des artères dans les greffons Tol.

B. Étude de la réponse lymphocytaire B dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat

I-Article 1

“Long-Term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B Cells exhibiting an inhibited profile”

Laëtitia Le Texier, Paméla Thebault, Amélie Lavault, Claire Usal, Emmanuel Merieau, Thibault Quillard, Béatrice Charreau, Jean-Paul Soulillou, Maria Cristina Cuturi, Sophie Brouard et Elise Chiffoleau.

Publié dans "The American Journal of Transplantation" (2011 Mar;11(3):429-38)

Objectif de l'étude

L'objectif des travaux réalisés dans notre équipe est de caractériser les mécanismes mis en place lors de la tolérance en transplantation. Notre équipe a préalablement démontré l'induction d'une tolérance à long terme d'allogreffes cardiaques chez le rat via l'injection d'un cours traitement immunosuppresseur. Afin de mettre en évidence de nouveaux médiateurs de la tolérance, une analyse comparative par puce à ADN a été réalisée sur les greffons tolérés (Tol) ou développant un rejet chronique (CR). L'étude de ces puces a permis de mettre en évidence l'expression de gènes associés aux cellules régulatrices et aux molécules de cytoprotection dans les greffons des animaux tolérants. De façon intéressante, l'équipe a également mis en évidence une diminution de l'expression des gènes associés à la synthèse d'Ig en absence de modification des gènes liés à l'infiltrat des LB (CD20, CD22) dans les greffons Tol par rapport aux greffons CR (J. M. Heslan et al. 2006). Les résultats obtenus suggérant une régulation de la réponse humorale, l'objectif de notre étude a donc été de caractériser la réponse lymphocytaire B chez les animaux tolérants.

Résumé de l'article 1

Nous avons observé une infiltration des allogreffes tolérées par de nombreux LB organisés en "cluster" ainsi qu'une forte inhibition de leur production d'alloanticorps. À la différence des animaux CR dont les LB produisent principalement des alloanticorps d'isotype IgG2b (Th1) et présentent un fort dépôt de C4 sur leur greffon, nous avons observé que les rats tolérants présentent une déviation de la réponse des alloanticorps vers un isotype IgG1 (Th2) et ne possèdent pas de dépôt de C4 sur leur greffon suggérant une absence d'activation du complément. L'équipe a préalablement mis en évidence l'expression de molécules de protection par les cellules endothéliales des greffons tolérés (P Thebault et al. 2007). Dans cette étude, nous montrons, *in vitro*, que les alloanticorps des rats Tol n'entraînent pas d'activation inflammatoire des cellules endothéliales du donneur. Ils induisent ou maintiennent l'expression de molécules de protection comme HO-1, Notch-4 et CLEC-1 alors que les alloanticorps des animaux CR diminuent leur expression. Les anticorps produits chez le rats tolérants semblent être plutôt protecteurs que délétères pour les cellules endothéliales.

De plus, nous avons observé une accumulation de LB dans le sang des rats TOL, associée un phénotype régulé caractérisé par une forte expression de molécules inhibitrices telles que FcγRIIb, BANK-1 et une plus faible expression des molécules activatrices telles que FcγRIIa et CD27.

Enfin, nous avons démontré que le transfert de LB des rats Tol à un second receveur syngénique permet le transfert de la tolérance démontrant la présence de Breg chez les rats tolérants.

Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence une inhibition de la réponse lymphocytaire B associée à la présence des LB régulateurs chez les animaux tolérants. Ces travaux suggèrent un rôle des LB dans la tolérance. Ainsi, l'utilisation des mécanismes de régulation de la réponse B pourrait par la suite servir à générer de nouvelles stratégies d'induction de tolérance.

Long-Term Allograft Tolerance Is Characterized by the Accumulation of B Cells Exhibiting an Inhibited Profile

L. Le Texier, P. Thebault, A. Lavault, C. Usal, E. Merieau, T. Quillard, B. Charreau, J. P. Souillou, M. C. Cuturi, S. Brouard and E. Chiffolleau*

INSERM U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation Urologie Néphrologie, ITUN, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France
*Corresponding author: Elise Chiffolleau, Elise.Chiffolleau@univ-nantes.fr

Numerous reports have highlighted the central role of regulatory T cells in long-term allograft tolerance, but few studies have investigated the B-cell aspect. We analyzed the B-cell response in a rat model of long-term cardiac allograft tolerance induced by a short-term immunosuppression. We observed that tolerated allografts are infiltrated by numerous B cells organized in germinal centers that are strongly regulated in their IgG alloantibody response. Moreover, alloantibodies from tolerant recipients exhibit a deviation toward a Th2 isotype and do not activate *in vitro* donor-type endothelial cells in a pro-inflammatory way but maintained expression of cytoprotective molecules. Interestingly, this inhibition of the B-cell response is characterized by the progressive accumulation in the graft and in the blood of B cells blocked at the IgM to IgG switch recombination process and overexpressing BANK-1 and the inhibitory receptor Fcgr2b. Importantly, B cells from tolerant recipients are able to transfer allograft tolerance. Taken together, these results demonstrate a strong regulation of the alloantibody response in tolerant recipients and the accumulation of B cells exhibiting an inhibited and regulatory profile. These mechanisms of regulation of the B-cell response could be instrumental to develop new strategies to promote tolerance.

Key words: Alloantibodies, B-cell tolerance, tolerance immune

Abbreviations: APCs, antigen-presenting cells; AU, arbitrary unit; DSA, donor-specific antibodies; DST, donor-specific blood transfusion; EC, endothelial cells; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

Received 22 April 2010, revised 22 September 2010 and accepted for publication 11 October 2010

Introduction

Transplantation is the treatment of choice for end-stage organ failure and the introduction of immuno-suppressants has made allo-transplantation a clinical reality with prevention of acute rejection. Nevertheless, most organs are lost at long-term due to the development of chronic rejection that represents the leading cause of late graft failure. Mechanisms of chronic rejection are complex and multifactorial and involved innate and adaptive immunity with a T- and B-cell activation due to persistent alloantigen shedding (1). B cells constitute an important source of antigen-presenting cells (APCs) and as secretors of deleterious alloantibodies they represent a main target in the prevention of chronic rejection (2–6). In the past few years, strategies have been developed to deplete B cells or to reduce alloantibody production, but with contrasting results (7–9).

Induction of donor-specific tolerance would be the solution of choice for long-term graft function and to improve quality of life of patients. Allograft tolerance has been reported in numerous rodent models but also in human in some cases of renal or liver transplantation following immunosuppressive treatment cessation (10,11). Thus, the identification of molecules that could induce, predict or diagnose tolerance in transplantation represents a crucial aim of research for translational application. Numerous studies have highlighted the central role of regulatory T cells in long-term allograft tolerance, but few studies have investigated the B-cell aspect in these models. However, recent large clinical studies have reported a B-cell signature associated with operational tolerance, suggesting that the B cells may contribute to the tolerant state (12–15). Therefore, the comprehension of the mechanisms involved in the modulation of the B-cell response in tolerance models appears to be crucial to develop strategies to induce long-term graft survival in a clinical setting.

We previously described a model of long-term cardiac allograft tolerance in rat induced by a short-term treatment with an immuno-suppressor, LF15-0195, a deoxyspergualine analog (16,17). We showed that tolerated allografts were characterized by the local accumulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells together with the expression of cyto-protective molecules by endothelial cells (EC) (18,19). In this study, we investigated the B-cell aspect in long-term recipients and demonstrate a strong regulation of the alloantibody response and the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile.

Le Texier et al.

Materials and Methods

Animals and transplantation

Rats were purchased by 'Centre d'Elevage Janvier' (Le Genest-Saint-Isle, France) and maintained in an animal facility under standard conditions according to institutional guidelines. The studies were reviewed and approved by the appropriate institutional review committee. Inbred 8-week-old male LEW.1W rats (RT1u) served as heart donors and LEW.1A (RT1a) as allograft recipients. Heterotopic cardiac allografts were performed as previously described (20). For the induction of tolerance, LF15-0195 (Fournier Laboratories, Daix, France), a deoxyspergualine analog was administered to allograft recipients by intraperitoneal injection at 3 mg/kg/day for 20 days starting the day of transplantation (16). For the model of development of chronic rejection, blood was collected by cardiac puncture into a heparinized syringe and allograft recipients were transfused with 1 mL of donor blood 14 and 7 days prior to the transplant [donor-specific blood transfusion (DST)] (18,21,22). For syngenic grafts, LEW.1A rats served as heart donors and recipients. Blood and/or graft of recipients were recovered at day 10, 30 or 100 after transplantation. For *in vivo* transfer experiments, 50×10^6 of splenocytes or 20×10^6 of purified CD4⁺ T or B cells from tolerant recipients were injected *i.v.* into LEW.1A secondary syngenic irradiated recipients [4 Gy, whole-body irradiation (Institut Fédératif de Recherche Thérapeutique 26, Nantes, France) 1 day before transplantation] on the day of LEW.1W cardiac transplantation.

Antibodies

Marm4 (IgM), MARG1.2 (IgG1), MARG2b (IgG2b), FITC- mouse anti-rat Fc IgG F(ab')₂ fragments and secondary antibody FITC goat anti-mouse IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Polyclonal rabbit anti-human/rat C4 antibody was purchased from Santa Cruz (San Diego, CA, USA) and anti-rat-CD27, -CD4-PECy7 (IOX35), -CD45RA-FITC (IOX33), -HIS24-PE and -TCR-Alexa647 from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA).

Immunohistology

Cardiac tissue was snap-frozen in liquid nitrogen after embedding in OCT compound (Tissue Tek-Miles Laboratories, Elkhart, IN, USA). Cryostat sections (7 µm) were fixed in acetone for 10 min. Sections were then labeled with Abs-specific for IgG1, IgG2b or C4 and with DAPI, mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) and observed by fluorescence microscopy (Axioskop2 plus-Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany).

Assessment of circulating donor-specific antibodies (DSA)

LEW.1W splenocytes were incubated with decomplexed diluted sera (1/8) from recipients [dilution in PBS containing 0.5% BSA (Sigma-Aldrich) and 0.02% sodium azide]. Cells were stained with FITC mouse anti-rat Fc IgG F(ab')₂ fragment or mouse anti-rat IgG1 or IgG2b and then with FITC goat anti-mouse IgG. Fluorescent labeling of cells was measured by flow cytometry and data were expressed in geometric mean of fluorescence.

in vitro DSA cytotoxicity

LEW.1W splenocytes were incubated with decomplexed diluted sera (dilution 1/20 in PBS) from recipients. Cells were then incubated 30 min with rabbit diluted sera (Sigma-Aldrich) (dilution 1/3 in PBS). Cells were then stained with propidium iodure (PI) and washed. PI⁺-labeled cells were assessed by flow cytometry and data were expressed in % of cytotoxicity.

Flow cytometry and cell sorting

Fluorescent labeling of cells was measured using a FACS LSR II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo[®] software (Tree Star, Inc., Ashland,

Table 1: Oligonucleotides used in this study

Rat HPRT For	5'CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC3'
Rev	5'TTCGCTGATGACACAAACATGA3'
Rat HO-1 For	5'CCACGCTCGACAGCATGTC3'
Rev	5'GTTTCGCTCTATCTCCTCTTCCA3'
Rat NOTCH-4 For	5'GCGAGGACAACATTGGTCTC3'
Rev	5'GAGGAGGGGTCAGCATGACT3'
Rat VCAM-1 For	5'TGGGAAACTGAAAGAGGAAT3'
Rev	5'CAGGAGCCAAACACTTGACC3'
Rat CLEC-1 For	5'TTTGGTGTGCTCGTTGGC3'
Rev	5'AAGTTCACGACACAGTTTACGG3'
Rat BANK-1 For	5'AATGCTTCCTGTGGCTCTG3'
Rev	5'TCAAGTATAGACCCATTCTTG3'
Rat IgM µ chain C region For	5'ACCGCTCTACCTTCATCGT3'
Rev	5'CTGTGGGAGGGTCTCTTGCT3'
Rat IgG γ chain C region For	5'CATTCCCTGCCCCATC3'
Rev	5'CCGTTTCATCTTCCACTCCG3'
Rat CD27 For	5'AGAGGTGGCAAACACTGTGGA3'
Rev	5'ACTCAGCATTGGCAGTGACC3'
Rat BCMA For	5'CGGTTCTCTGGATCTTCTGG3'
Rev	5'GTCACCAGCCCTGCTCTTAGT3'
Rat Fcgr2a For	5'GATCTCCTCCAGTCCCTCCC3'
Rev	5'TCCATCTCAAACGCCAAC3'
Rat Fcgr2b For	5'GTTTCACCACAGCCTTCGG3'
Rev	5'ACTCACTCCAGGACTGATGG3'

OR, USA). Spleen CD4⁺ T cells or B cells from tolerant recipients were purified by positive selection using a FACSria flow cytometer (BD Biosciences) respectively by TCR plus CD4 staining and by CD45RA plus HIS24 staining. Purity was >99%.

Endothelial cell activation

Rat LEW.1W EC line was isolated as previously described (23) and plated overnight into 12-well plates (NUNC[™]Merck-Eurolab-France) (2×10^5 cells/well) in complete RPMI medium culture with decomplexed and inactivated sera (serial frozen/thawed) from long-term syngenic recipients or recipients that tolerated or develop chronic rejection. Six, 10, 24 or 48 h later, the adherent EC were washed several times and subjected to RNA extraction.

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll. Total RNA from grafts, EC or PBMC were prepared using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed as previously described (24) using a GenAmp 7700 Sequence Detection System and SYBR[®] Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Applied, Courtaboeuf, France). The oligonucleotides used in this study are described in Table 1. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT) was used as an endogenous control gene to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (24,25) and expressed in arbitrary units.

Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using the Student's t-test for unpaired data, and results were considered significant if p values were <0.05. Data are expressed as mean ± SEM. The Kaplan-Meier method was used to calculate the survival curves followed by Mantel-Cox log rank analysis.

Results

Tolerated allograft contained B cells organized in germinal centers and strongly regulated in IgG production

We previously demonstrated that tolerated allografts were infiltrated by numerous CD4⁺CD25⁺ T cells (16). We evaluated here the presence of B cells and observed by IgM staining that B cells were present and organized in germinal centers (Representative picture, Figure 1A). Interestingly, no IgG protein was detectable in these nodules of B cells. This contrasts with the strong expression of IgG protein observed in B-cell nodules in allografts from recipients that develop chronic rejection induced by DST treatment in the same rat allograft combination (Figure 1A) (18). At the transcript level, we observed a similar expression of BCMA, a survival factor and specific marker of B cells (26), in allografts from recipients that tolerated or develop chronic rejection (Figure 1B). However, we observed a low expression of IgG transcripts (relative to BCMA) in tolerated allografts that contrasts with the huge expression observed in allografts from recipients that develop chronic rejection (Figure 1B, n = 5, *p < 0.05). Thus, the ratio IgG/IgM is consequently very low in tolerated allografts compared to the one assessed in allografts from recipients that develop chronic rejection (Figure 1B, n = 5, *p < 0.05). These data suggest that in tolerant recipients, B cells have infiltrated the allografts, formed germinal centers but are strongly inhibited in their IgM to IgG switch.

Deviation of the alloantibody response toward a Th2-related isotype

We previously demonstrated that the total IgG deposit on whole tolerated allografts was lower than the one assessed on allografts that develop chronic rejection (18). We evaluated here the quality of the deposit with the specific IgG1 (Th2-related isotype) and IgG2b (Th1-related isotype) isotypes and the C4 deposit on graft EC. We observed the presence of some IgG1 deposit on graft EC from tolerant recipients but no IgG2b or C4 complement deposit (Representative pictures, Figure 2). This contrasts with the strong deposits of IgG2b, IgG1 and C4 complement observed in allografts that develop chronic rejection. Therefore, tolerated allografts are characterized by the specific deposit of Th2-related antibody isotype on graft EC without C4 complement activation.

DSA do not activate graft EC in a pro-inflammatory way

We evaluated whether this regulation of the antibody response at the graft site was visible in the periphery in the sera. We observed slightly less IgG DSA in sera from tolerant recipients than in the ones from recipients that develop chronic rejection with a lower level of the IgG2b isotype (Th1-related) and a higher level of the IgG1 isotype (Th2-related) DSA (Figure 3A) (n = 10, *p < 0.05, ***p <

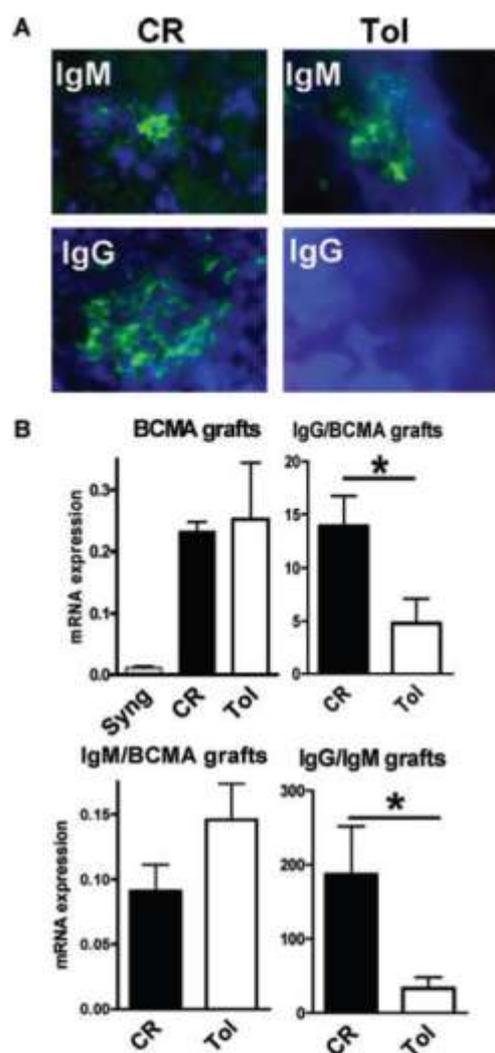


Figure 1: In tolerated allografts, B cells are present but regulated in their IgG expression. (A) Representative pictures of immuno-fluorescence merged staining as described in section 'Material and Methods' for rat IgM and IgG (green) and dapi (blue) of allografts from recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated their allografts (Tol). Merged pictures, original magnification 400x. Pictures are representative of five independent experiments. (B) mRNA expression of BCMA, IgG (γ chain C region) and IgM (μ chain C region) (relative to BCMA expression) was analyzed by quantitative RT-PCR in heart syngeneic grafts (Syng), allografts from recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated their allografts (Tol) as described in section 'Material and Methods' (n = 5). Results are expressed in Arbitrary Unit (AU) of the specific gene/HPRT transcript ratio \pm SEM, *p < 0.05.

0.001). Interestingly, these differences in the peripheral quantity of the DSA and in their isotypes are slight and do not reflect the strong regulation of the antibody response that we observed locally at the graft site.

Le Texier et al.

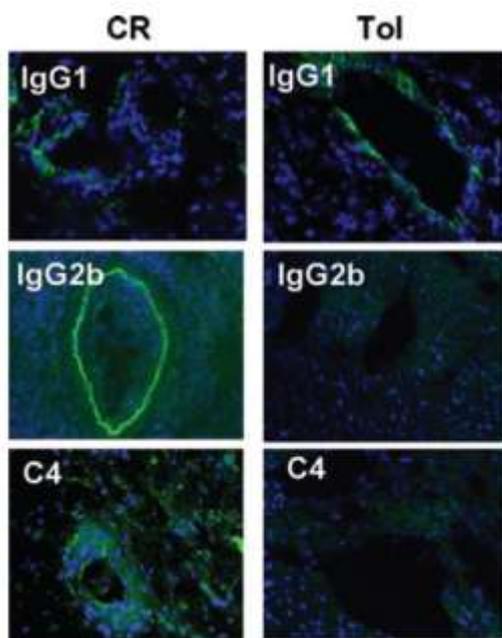


Figure 2: IgG1 antibody but no C4 complement deposit on graft EC from tolerant recipients. Representative pictures of immuno-fluorescence merged staining as described in section 'Material and Methods' for rat IgG1, IgG2b or C4 complement (green) and dapi (blue) of allografts from recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated their allografts (Tol). Merged pictures, original magnification 400x. Pictures are representative of five independent experiments.

We then evaluated the properties of the DSA that are produced in tolerant recipients that may be determinant for the graft outcome. We observed a similar *in vitro* cytotoxicity of the peripheral DSA from tolerant recipients than the ones from recipients that develop chronic rejection demonstrating that *in vitro*, DSA from tolerant recipients are able to fix complement (Figure 3B). Then, we evaluated the properties of these peripheral DSA on *in vitro* activation of donor-type EC. We observed that both sera from recipients that develop chronic rejection or tolerated their allografts induced the expression of the transcripts for VCAM-1, a marker of activation, in donor-type EC (Figure 3C). However, we observed that sera from recipients that develop chronic rejection decreased the mRNA expression of HO-1 and NOTCH-4, two cytoprotective molecules, whereas sera from tolerant recipients maintained or even increased their expressions (Figure 3C, $n = 3$, $*p < 0.05$). Similar results were obtained for the expression of CLEC-1, a molecule that we previously showed to be down-regulated following inflammatory activation (Figure 3C, $n = 3$, $*p < 0.05$) (27). This decrease in the expression of these molecules was not observed on syngeneic EC (data not shown) demonstrating that the effects observed were due to DSA and not to other factors from the sera. These data demonstrate that the properties of the DSA produced in

tolerant recipients are different than the ones produced in recipients that develop chronic rejection because they do not activate in a deleterious/inflammatory way donor-type EC but seem to protect them.

In tolerant recipients, B cells accumulate progressively in the blood and are partially blocked in their IgM to IgG switch

We previously demonstrated in tolerant recipients an accumulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the graft and in the spleen (low in blood) that appears following the 20 day treatment cessation (16,17). We evaluated here the phenotype of B cells and assessed the expression of genes related to B-cell differentiation or activation during (at day 10 after transplantation) or after (at day 30 and 100) immuno-suppressive treatment. We observed a low mRNA expression of CD27, a marker of activation and of memory B cells in allografts and PBMC from tolerant recipients compared to the ones from recipients that develop chronic rejection (Figure 4, $n = 5$, $*p < 0.05$). This has been confirmed by flow cytometry analysis of CD27 expression in B PBMC (Figure 4, $n = 5$, $*p < 0.05$). These data suggest a control of B-cell activation in tolerant recipients.

Interestingly, we observed a higher expression of BCMA transcripts in the PBMC from tolerant recipients than in the ones from recipients that develop chronic rejection or even from the ones of syngeneic recipients (at day 100 after transplantation) (Figure 4, $n = 5$, $*p < 0.05$). This accumulation of B cells in blood of tolerant recipients has been confirmed by flow cytometry analysis of the PBMC composition with a progressive increase following immuno-suppressive treatment cessation (at day 30 and 100 after transplantation) (in both frequency and absolute number) (Figure 4, $n = 5$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$). Moreover, we observed that B cells in the blood of tolerant recipients express a lower ratio of IgG/IgM transcripts (relative to BCMA) than the B cells from recipients that develop chronic rejection (Figure 4, $n = 5$, $**p < 0.01$). This result has been confirmed by Flow cytometry analysis of intracellular IgG staining in PBMC (Figure 4, $n = 5$, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$). Therefore, tolerant recipients are characterized by the progressive accumulation following immuno-suppressive treatment cessation of B cells in the periphery and similarly to what we observed in the graft, these B cells are partially inhibited in their IgM to IgG switch.

In tolerant recipients, B cells exhibit an inhibited profile

We assessed in the blood and in the grafts the expression of BANK-1, a molecule involved in the CD40-mediated signaling that has been described to be overexpressed in blood of patients operationally tolerant to kidney transplant (13,28). Interestingly, we observed also an overexpression of BANK-1 transcripts in PBMC from tolerant recipients

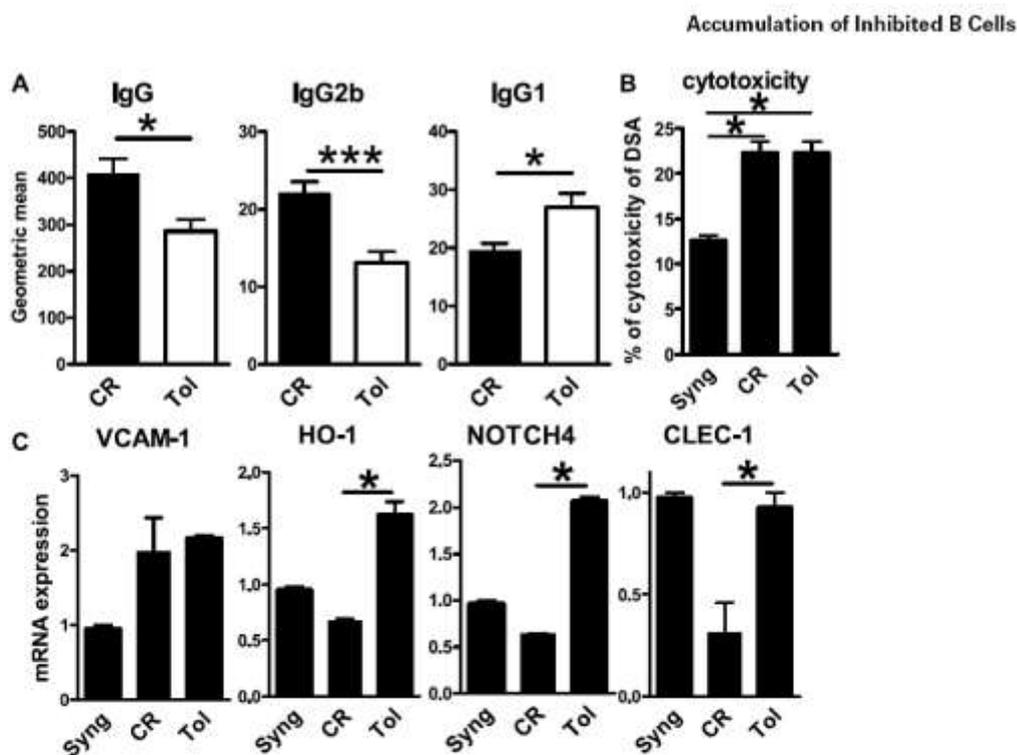


Figure 3: Deviation of the alloantibody response toward a Th2-related isotype that does not activate graft EC in a pro-inflammatory way. (A) Assessment of the donor-specific IgG, IgG2b and IgG1 alloantibodies in the sera of recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated their allografts (Tol) as described in section 'Material and Methods'. Data are expressed in geometric mean fluorescence channel \pm SEM (n = 10, *p < 0.05, ***p < 0.001). (B) Assessment of the *in vitro* cytotoxicity of the DSA for the sera of syngeneic recipients or recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated their allografts (Tol) as described in section 'Material and Methods'. Data are expressed in % of cytotoxicity \pm SEM (n = 10, *p < 0.05). (C) Rat EC line of donor origin (LEW.1W) was incubated with diluted sera of syngeneic recipients (Syng) or recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated their allografts (Tol) as described in section 'Material and Methods'. Ten, 24 or 48 h later, EC were washed and lysed for RNA extraction. HPRT, VCAM-1 (at 10 h), HO-1 (at 10 h), NOTCH-4 (at 24 h) and CLEC-1 (at 48 h) mRNA expression was assessed by quantitative RTPCR in EC and results are expressed in AU of specific gene/HPRT (n = 3, *p < 0.05).

compared to the ones from recipients that develop chronic rejection or from syngeneic recipients (Figure 5, n = 5, *p < 0.05). An overexpression, was also observed in PBMC or grafts from recipients that develop chronic rejection compared to the ones from syngeneic recipients (Figure 5, n = 5, *p < 0.05, **p < 0.01). These data suggest that overexpression of BANK-1 may reflect the presence of B cells at the initiation of the switch process.

We assessed the expression of the activatory receptor Fcgr2a and of its inhibitory counterpart Fcgr2b, expressed by APCs and that reflect their activation state. Interestingly, we observed a strong expression of Fcgr2a in allografts and PBMC from recipients that develop chronic rejection compared to the ones from recipients that tolerated their allografts (Figure 5, n = 5, *p < 0.05, **p < 0.01). The inhibitory receptor Fcgr2b is also highly expressed in the allografts and in the PBMC of recipients that develop chronic rejection but also highly expressed in the PBMC of tolerant

recipients (Figure 5, n = 5, *p < 0.05). Consequently, when we performed the ratio Fcgr2b/Fcgr2a transcripts for each animal, we observed that this ratio is higher in the allografts and in the PBMC from tolerant recipients compared to the ones from recipients that develop chronic rejection, suggesting an inhibitory profile rather an activatory one (Figure 5, n = 5, *p < 0.05).

Therefore, tolerant recipients are characterized by the accumulation of B cells in the periphery that seem to be blocked at the switch process and exhibiting an inhibited profile.

B cells from tolerant recipients are able to transfer tolerance

We previously demonstrated that total splenocytes or spleen CD4⁺ T cells from tolerant recipients were able to transfer tolerance to a subsequent sub-lethally irradiated host ([17, 19] and Figure 6A, n = 4, **p < 0.01). Here, we

Le Texier et al.

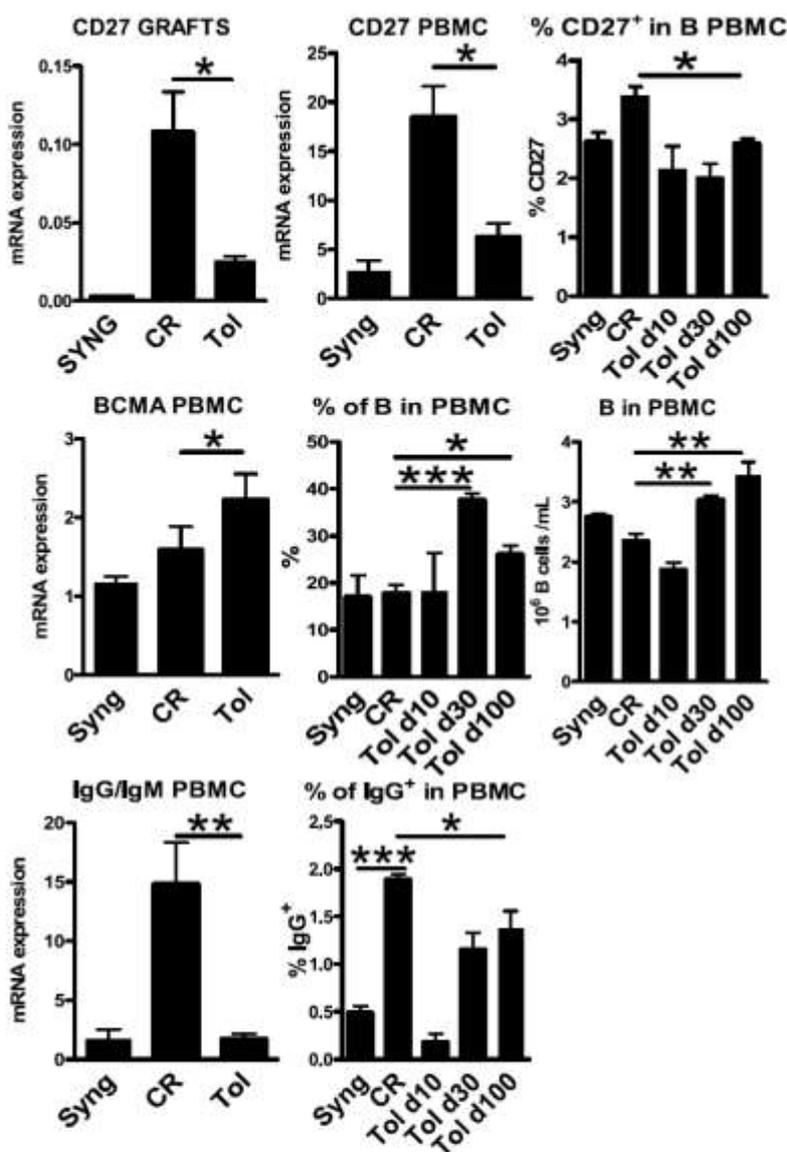


Figure 4: Accumulation of B cells partially blocked at the switch recombination process in blood of tolerant recipients. mRNA expression of CD27, BCMA and IgG/IgM (relative to BCMA) was analyzed by quantitative RT-PCR in PBMC and grafts from syngeneic recipients (Syng), recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated (Tol) their allograft as described in section 'Material and Methods'. Results are expressed in AU of the specific gene/HPRT transcript ratio \pm SEM (n = 5) *p < 0.05, **p < 0.01. Absolute number and % of B in PBMC, IgG⁺ in PBMC and CD27⁺ in B PBMC \pm SEM were assessed by Flow Cytometry as described in section 'Material and Methods' in syngeneic recipients (Syng) or recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated their allograft at day 10, 30 or 100 after transplantation (Tol) (n = 5) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

showed that purified spleen B cells from tolerant recipients (but not from naïve rats, data not shown) were also able to transfer allograft tolerance suggesting the presence of regulatory B cells (Figure 6A, n = 4, *p < 0.05). We evaluated the level of the IgG DSA in the periphery of these transferred recipients and observed a very low level in the ones transferred with tolerant CD4⁺ T cells compared to control rejecting recipients. Importantly, we observed that the preferential isotype of IgG DSA that is produced compared to control rejecting recipients is the IgG1 isotype

(Figure 6B, n = 4, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) (no difference was observed for IgG2a or 2b DSA, data not shown). Therefore, these data demonstrate also a regulation and deviation of the alloantibody response toward a Th2-related isotype in transferred recipients that can be mediated by the transfer of regulatory T cells alone. This suggests that regulatory T cells from tolerant recipients are able by themselves to educate B cells to regulate the alloantibody response and that these mechanisms of regulation are important for long-term allograft tolerance.

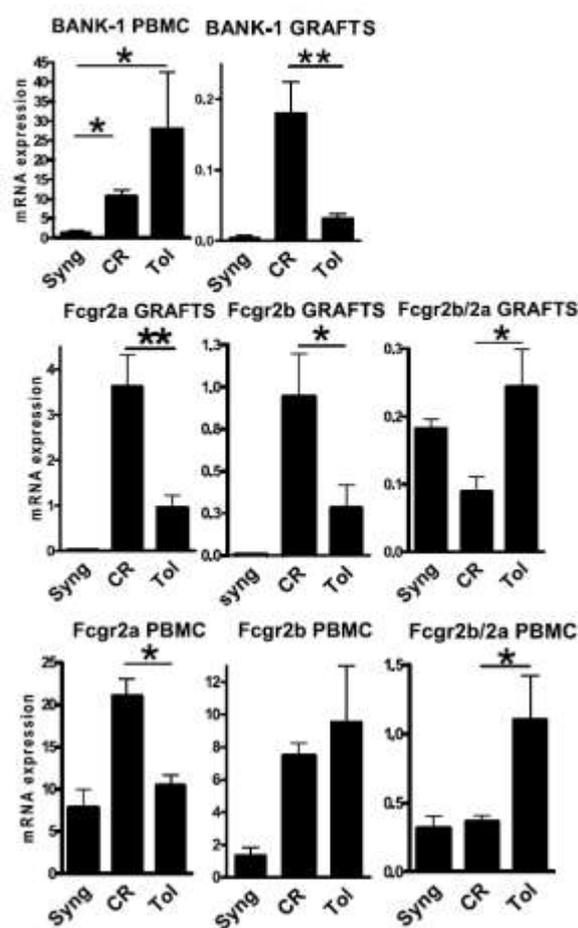


Figure 5: B cells from tolerant recipients exhibit an inhibited profile. mRNA expression of BANK-1, Fcgr2a and Fcgr2b was analyzed by quantitative RT-PCR in PBMC and grafts from syngeneic recipients (Syng), recipients that develop chronic rejection (CR) or tolerated their allograft (Tol) as described in section 'Material and Methods'. Results are expressed in AU of the specific gene/HPRT transcript ratio \pm SEM (n = 5) *p < 0.05, **p < 0.01.

Discussion

Deciphering the mechanisms of allograft tolerance in rodent and the identification of molecules that could induce or diagnose stable tolerance or at contrary predict deterioration of the graft represents a crucial aim of research in transplantation.

We previously demonstrated in a rodent model of long-term allograft tolerance induced by a short-term immunosuppression, the expansion of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells that accumulate in the spleen and at the graft site following treatment cessation (16–18). Moreover, we showed the expression of immuno-regulatory molecules suggest-

Accumulation of Inhibited B Cells

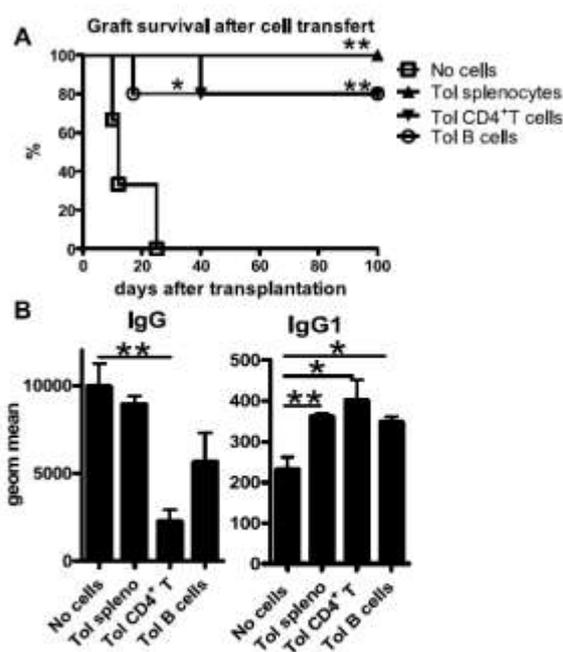


Figure 6: B and CD4⁺ T cells from tolerant recipients transfer allograft tolerance and the control of the B-cell response. 50×10^6 of total splenocytes or 20×10^6 of purified CD4⁺ T or B cells from tolerant recipients were transferred to a secondary irradiated host as described in section 'Materials and Methods'. (A) Survival curve of allografts in transferred recipients (n \geq 4, *p < 0.05, **p < 0.01). (B) Thirty days after transfer, IgG or IgG1 DSA were assessed in the sera as described in section 'Material and Methods'. Data are expressed in geometric mean fluorescence channel \pm SEM (n \geq 4, *p < 0.05, **p < 0.01).

ing active mechanisms of regulation and a local immune privilege state (16–18).

In this study, we have investigated the B-cell aspect in long-term tolerance. We showed the presence of nodules of B cells in grafts of tolerant recipients with a deviation of the alloantibody response toward a Th2-phenotype. The presence of germinal centers in grafts and a Th2-type B-cell response have often been associated with the development of chronic rejection (29–31). However, we showed here in our model that the B cells from tolerant recipients are strongly regulated in their IgG production especially at the graft site and that the specific deposit of the Th2-related isotype antibodies on graft EC does not activate C4 complement. Indeed, this contrasts with the strong deposits of Th1-related isotype antibody and C4 complement observed in allografts from recipients that develop chronic rejection by DST-treatment or in the 10% of immuno-suppressor treated animals that develop chronic rejection at long-term (data not shown). However, interestingly, this control of the alloantibody response is only slightly reflected in the periphery by the

Le Texier et al.

assessment of the DSA in the sera when compared to recipients that develop chronic rejection. Indeed, in recipients that develop chronic rejection, the level of DSA in the circulation may be underestimated due to their massive absorption by the organ graft. Alternatively, DSA that accumulate in the circulation of tolerant recipients may represent antibodies with a low affinity that will not cause tissue damage. In clinic, presence of circulating anti-HLA antibodies is associated with increased graft failure; however, about 25% of patients producing posttransplant DSA have normal appearance of their grafts (5,6). Moreover, C4d complement deposit on the graft is not systematically observed in patients developing chronic rejection and a recent study demonstrates that changes in endothelial transcripts are better to prognostic or identify kidneys experiencing antibody-mediated injury (32). Indeed, DSA can elicit EC injury via complement-dependent mechanisms but also through complement-independent mechanisms by stimulating pro-inflammatory and pro-proliferation signals (33,34). We showed here in our model that DSA from tolerant recipients do not activate donor-type EC in an pro-inflammatory way because they maintained or even increased the expression of HO-1, NOTCH4 and CLEC-1 molecules that we showed to exert protective roles (27,35–37). Interestingly, these *in vitro* data are concordant with what we previously demonstrated *in vivo* with a high expression of HO-1, NOTCH4 and CLEC-1 by graft EC in tolerant recipients and a down-expression in the ones of recipients that develop chronic rejection (19,27,36). Indeed, it has been shown that depending on their isotype, their dose, their affinity or their fucosylation, DSA may be deleterious for graft EC or in contrast protect them by inducing expression of protective molecules (38,39).

Interestingly, we observed following immuno-suppressive treatment cessation an accumulation of B cells in PBMC of tolerant recipients and a phenotype of inhibited B cells partially blocked at their IgM to IgG switch and overexpressing the inhibitory receptor Fcgr2b. Because of lack of specific antibodies to phenotype B cells in rat, we have not been able to determine their differentiation step and whether these cells represent different subpopulations. This accumulation of inhibited B cells may be an epiphenomenon of LF15-0195 immuno-suppressive treatment that has been shown to block NF- κ B signaling (40). However, we showed no accumulation of B cells under LF15-0195 treatment and B cells from tolerant recipients are able to mature by *in vitro* TLR stimulation suggesting that B cells are not hypo-responsive (data not shown). Interestingly, an accumulation of B cells, an overexpression of BANK-1 and an increased Fcgr2b/Fcgr2a transcript ratio have also been observed in PBMC of patients that spontaneously develop operational tolerance to kidney transplant after cessation of immunosuppressive treatment (12–15,28). BANK-1 is an adapter protein involved in B-cell receptor-mediated signaling that negatively regulates CD40-mediated AKT activation and subsequent B-cell responses (41,42). Therefore,

IgM-bearing B cells may utilize BANK-1 to decrease the signal strength, thereby preventing hyper-IgM responses at the switch process (42). Interestingly, expression of BANK-1 variants have been shown to contribute to sustained B-cell-receptor signaling and B-cell hyperactivity characteristic of systemic lupus erythematosus (SLE) (43). We also observed an overexpression of Fcgr2b, an inhibitory receptor that has been shown to be a potent regulator of B-cell division, class switching and maturation to plasma cells. Fcgr2b may play a prominent role in the maintenance of peripheral tolerance and its polymorphism is also significantly associated with SLE in multiple ethnic groups (44). In our model, the overexpression of BANK-1 and of the Fcgr2b/Fcgr2a ratio may reflect an accumulation of inhibitory or inhibited B cells blocked at their switch process. These blocked B cells may not have proceeded to somatic hyper-mutation and therefore may produce DSA of low affinity (45).

We observed a control of the B-cell response in tolerant recipients with a preferential switch of DSA toward a Th2-related isotype. We showed by transfer experiments that this regulation may be mediated by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells that accumulate in tolerant recipients. Indeed, regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells have been shown to not only regulate the T cell response but also to regulate B-cell activation by reducing considerably IgG antibody production and isotype changes (46). Interestingly, B cells from tolerant recipients are able by themselves to transfer allograft tolerance suggesting that a subpopulation of regulatory B cells have developed. Recent studies have demonstrated the existence of subpopulation of regulatory B cells exhibiting a particular phenotype and/or expressing IL10 and their depletion has sometimes been observed to exacerbate inflammatory diseases (47–49). We did not observe the accumulation of IL10 expressing B cells in PBMC of tolerant recipients (data not shown), suggesting that these B cells are different from the regulatory B cells or pro-B10 described in the literature (47–49).

In conclusion, we demonstrate a strong regulation of the B-cell response in long-term tolerant recipients with a deviation of the alloantibody response toward a Th2-related profile that is certainly important for the graft EC protection. Moreover, we showed the accumulation in the blood of a particular phenotype of B cells exhibiting an inhibited profile, which may represent as described in clinical studies (13–15), a useful signature of tolerance. In addition, we showed the expansion of B cells in tolerant recipients able to transfer tolerance. Therefore, in clinic, therapies that aim to reduce alloantibody production by targeting B cells may prevent the regulatory role of B cells important for long-term protection of the graft. Therefore, the comprehension of the mechanisms involved in the deviation of the alloantibody response and the interplay between pathogenic and regulatory B cells appear important to elucidate.

Acknowledgments

Funding sources: Le Texier L. was supported by a fellowship from the 'Ministere de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' and Lavault A. by 'Fondation CENTAURE'.

Disclosure

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

References

- Libby P, Pober J. Chronic rejection. *Immunity* 2001; 14: 387–397.
- Mauillyedi S, Pelle PD, Saidman S et al. Chronic humoral rejection: Identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 574–582.
- Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2532–2541.
- Einecke G, Sis B, Reeve J et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2520–2531.
- Piazza A, Poggi E, Borrelli L et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: Posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 2001; 71: 1106–1112.
- Harrigan A, Kiangkitwan B, Kukuruga D et al. The impact of c4d pattern and donor-specific antibody on graft survival in recipients requiring indication renal allograft biopsy. *Am J Transplant* 2009; 9: 2758–2767.
- Billing H, Rieger S, Ovens J et al. Successful treatment of chronic antibody-mediated rejection with IVIG and rituximab in pediatric renal transplant recipients. *Transplantation* 2008; 86: 1214–1221.
- Everly MJ, Everly JJ, Susskind B et al. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation* 2008; 86: 1754–1761.
- Zarkhin V, Chalasani G, Sarwal MM. The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplant Rev (Orlando)*; 24: 67–78.
- Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 736–746.
- Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; 118: 2845–2857.
- Louis S, Braudeau C, Giral M et al. Contrasting CD25hiCD4+ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 398–407.
- Pallier A, Hillion S, Danger R et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int* 2010; 78: 503–513.
- Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1848–1861.
- Newell KA, Asare A, Kirk AD et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1836–1847.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T cell differentiation. *Am J Transplant*. 2002; 2: 745–757.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol*. 2002; 168: 5058–5069.
- Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, Chiffolleau E. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1185–1193.
- Thebault P, Condamine T, Heslan M et al. Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am J Transplant* 2007; 7: 2472–2482.
- Ono K, Lyndsey ES. Improved technic of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968; 57: 225–229.
- Souillou J-P, Blandin F, Günther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984; 38: 63–67.
- 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* 2009; 9: 697–708.
- Charreau B, Cassard A, Tesson L et al. Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation* 1994; 58: 1222–1229.
- Louvet C, Heslan JM, Merieau E, Souillou JP, Cuturi MC, Chiffolleau E. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 2004;78:1259–1266.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method. Methods* 2001;25:402–406.
- Benson MJ, Dillon SR, Castigli E et al. Cutting edge: The dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol* 2008;180:3655–3659.
- Thebault P, Lhermite N, Tilly G et al. The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. *J Immunol* 2009;183:3099–3108.
- Sivozhelezov V, Braud C, Giacomelli L et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplants recipients. Part II. Non-statistical gene microarray analysis. *J Cell Biochem* 2008; 103: 1693–1706.
- Koshiba T, Kitade H, Van Damme B et al. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 2003; 76: 588–596.
- Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, Li Q, Ruddle NH, Lakkis FG. Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am J Transplant* 2005; 5: 510–516.
- Thaunat O, Field AC, Dai J et al. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: Evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 14723–14728.
- Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; 9: 2312–2323.

Le Texier et al.

33. Wehner J, Morrell CN, Reynolds T, Rodriguez ER, Baldwin WM, 3rd. Antibody and complement in transplant vasculopathy. *Circ Res* 2007; 100: 191–203.
34. Coupel S, Leboeuf F, Boulay G, Souillou JP, Charreau B. RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: An alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2429–2439.
35. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 1015–1026.
36. Quillard T, Coupel S, Coulon F et al. Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: Implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2258–2265.
37. Kinderlerer AR, Pombo Gregoire I, Hamdulay SS et al. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: A role for increased bilirubin and ferritin. *Blood* 2009; 113: 1598–1607.
38. Chang AT, Platt JL. The role of antibodies in transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; 23: 191–198.
39. Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009; 9: 2459–2465.
40. Yang J, Bernier SM, Ichim TE et al. LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 438–447.
41. Yokoyama K, Su IH, Tezuka T et al. BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP(3) receptor. *Embo J* 2002; 21: 83–92.
42. Aiba Y, Yamazaki T, Okada T et al. BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. *Immunity* 2006; 24: 259–268.
43. Kozyrev SV, Abelson AK, Wojcik J et al. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2008; 40: 211–216.
44. McGaha TL, Karlsson MC, Ravetch JV. FcgammaRIIB deficiency leads to autoimmunity and a defective response to apoptosis in Mrl-MpJ mice. *J Immunol* 2008; 180: 5670–5679.
45. Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991; 67: 1121–1129.
46. Ludwig-Portugall I, Hamilton-Williams EE, Gotot J, Kurts C. CD25+ Tregl specifically suppress auto-Ab generation against pancreatic tissue autoantigens. *Eur J Immunol* 2009; 39: 225–233.
47. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* 2007; 178: 7868–7878.
48. 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.
49. Rafei M, Hsieh J, Zehntner S et al. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med* 2009; 15: 1038–1045.

C.Étude d'une nouvelle molécule, LIME, impliquée dans la fonction des DC

I-Article 2

“LIME, a new molecule associated with cytoskeleton is involved in stimulatory properties of DC.”

Laëtitia Le Texier, Amélie Lavault, Philippe Hulin, Olivier Collin, Yvan Le Bras, Maria-Cristina Cuturi et Elise Chiffoleau.

En révision dans "European Journal of Immunology"

Objectif de l'étude

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de l'étude des mécanismes et des molécules qui pourraient être impliqués dans la tolérance en transplantation. L'analyse préalable par puces à ADN des greffons tolérés à long terme (modèle LF15-0195) ou en rejet chronique (modèle DST) (J. M. Heslan et al. 2006), a notamment permis de mettre en évidence la sous-expression du gène RGD1310371 dans les greffons Tol par rapport aux greffons CR. Ce gène code pour une molécule non-décrite jusqu'à présent, que nous avons nommée LIME. L'objectif de cette étude a donc été de caractériser la régulation et la fonction immunologique de cette molécule inconnue.

Résumé de l'article 2

Nous avons commencé notre étude en quantifiant le transcript de LIME par RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) quantitative dans les greffons Tol, en rejet aigu (AR, rats non traités) ou CR. Nous avons observé une faible expression du transcript de LIME dans les greffons Tol par rapport aux greffons AR, 5 jours après la greffe, et par rapport aux greffons CR, 100 jours après la greffe. Cette faible expression est également observée dans le sang des rats Tol comparé au sang des rats CR, confirmant l'inhibition de LIME chez les animaux tolérants et la forte induction chez les rats rejetant leur greffe.

Afin de caractériser cette nouvelle molécule, nous avons étudié l'expression de son transcript dans divers types cellulaires du système immunitaire. Les résultats indiquent qu'elle est exprimée dans les DC et les macrophages stimulés. L'analyse de la cinétique de son expression dans des BMDC révèle que c'est une molécule rapidement induite après une stimulation pro-inflammatoire. À l'inverse, son expression est diminuée par l'IL-10, une cytokine immuno-régulatrice. De plus, l'étude fonctionnelle de LIME nous a permis de mettre en évidence son implication dans la capacité des DC à stimuler les lymphocytes T. L'ensemble de ces résultats pourrait expliquer la surexpression de LIME dans le rejet d'allogreffe qui implique la présence de DC activées et de cytokines pro-inflammatoires pour induire une réponse immune contre le greffon. Au contraire, les mécanismes régulateurs qui caractérisent les animaux tolérants pourraient être à l'origine de l'inhibition de l'expression de LIME chez ces animaux.

L'étude de la localisation cellulaire de LIME, par microscopie confocale, nous a permis d'observer que cette molécule est organisée en réseau dans le cytoplasme des cellules. Elle semble également colocalisée avec l'actine au niveau de protrusions membranaires. De

façon intéressante, l'étude de la structure prédictive de LIME suggère un lien entre cette molécule et les protéines de la famille "Trefoil". Cette famille regroupe diverses protéines caractérisées par un domaine "Trefoil" et une structure en "trèfle". Cependant, LIME ne contient pas ce domaine "Trefoil" mais présente une structure similaire à celle des protéines de cette famille. Certains membres de la famille "Trefoil", comme les molécules Fascines (Fascine-1, Fascine-3), sont connus pour jouer un rôle majeur dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (A. Li et al. 2010). De plus, nous avons constaté que le gène de LIME est encadré par deux gènes codant pour des molécules qui se lient au cytosquelette, l'IL-16 et Mesdc-1 (mesoderm development candidate 1). En effet, ces molécules se lient respectivement à la myosine et à l'actine et sont impliquées dans la mobilité et la motilité cellulaire. D'autre part, dans la littérature, le gène de LIME a été associé aux cellules ciliées (McClintock et al. 2008). Or, dans notre étude, nous observons une très forte expression du transcript de LIME dans les testicules, la trachée et les poumons, des organes riches en cellules ciliées dont la fonction est fortement dépendante du cytosquelette. L'ensemble de ces résultats suggère que LIME pourrait être associée au cytosquelette, qui joue un rôle majeur dans la motilité et la mobilité cellulaire mais également dans la formation de synapses immunologiques.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence une nouvelle molécule qui pourrait, dans le futur, servir de cible thérapeutique pour réguler l'activation des lymphocytes T par les APC et ainsi moduler la réponse immunitaire.

LIME, a new molecule associated with cytoskeleton is involved in stimulatory properties of DC.

Laëtitia Le Texier¹, Amélie Lavault¹, Philippe Hulin², Olivier Collin³, Yvan Le Bras³, Maria-Cristina Cuturi¹ and Elise Chiffolleau¹

¹INSERM, U1064, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

²Plateforme MicroPICell, SFR santé, Nantes, F44000 France.

³Plateforme GenOuest, IRISA-INRIA, Campus de Beaulieu, Rennes, F35042 France.

Key words: dendritic cell, cytoskeleton, immune regulation, transplantation, graft rejection.

Corresponding author: Elise Chiffolleau, elise.chiffolleau@univ-nantes.fr

INSERM UMR 1064 – ITUN, CHU Hotel-Dieu

30 Bd Jean Monnet 44093 Nantes

Tel : +33 (0)2.40.08.75.96

Fax : +33 (0)2.40.08.74.11

Abbreviations:

LIME: LPS-Induced Molecule

BMDC: Bone Marrow-derived Dendritic Cells

RNAi: RNA interference

NCBI: National Center for Biotechnology Information database

LEW: LEWIS

NES: Nuclear Export Signal

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are sentinels of the immune system distribute throughout the body that following danger signals will migrate to secondary lymphoid organs to induce effector T cell response. We identified in a model of graft rejection, a new molecule that we named LIME (RGD1310371) and that is strongly up regulated in DCs following inflammatory stimuli. Importantly, we showed that LIME is involved in the T cell stimulation property of DCs. We observed that LIME is expressed as network in the cytoplasm and co-localized with actin notably at membrane protrusions. Interestingly, LIME protein structure prediction reveals a link with molecules of trefoil family such as the actin-bundling molecule Fascin. Moreover, LIME gene is flanked of the two cytoskeleton-binding proteins IL-16 and MESDC-1. In addition, LIME is highly expressed in testis, trachea and lung that are rich in highly ciliated cells. Taken together, all these data suggest a role for LIME in specialized structures of cytoskeleton that are important for dynamic cellular events such as motility, mobility or immune synapse formation. In the future, LIME may represent a new target to reduce the capacity of DCs to stimulate T cells and to regulate an immune response.

INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) are central actors of the immune response. Localized at the interface with the external environment, DCs are sensors of pathogen penetration in the organism and are involved in both innate and adaptative immune responses. DCs detect microorganism components via pattern recognition receptors (PRRs), that transduce danger signals and induce their activation and maturation [1]. Moreover, DCs are professional antigen-presenting cells (APCs) able to capture and process antigen to present antigenic peptide on class I and class II MHC to activate CD8⁺ and CD4⁺ T cells [2]. The fine-tuning of the maturation state of DCs is important to maintain the balance between immunity and tolerance. Under steady-state conditions, DCs remain in an immature state and do not mount an immune response against circulating self-antigens in the periphery, which maintains a state of tolerance. By contrast, foreign antigens result in maturation of DCs that will migrate and activate T cells. This balance is required as any disturbance due to infections or tissue injury may result in chronic inflammation or autoimmunity.

Maturation of DC is accompanied by numerous changes that are correlated with a reorganization of microfilaments and microtubules and an altered expression of specialized actin- and tubulin-associated proteins. Indeed, reorganization of the cytoskeleton is needed to allow dissolution of adhesion structures such as podosomes and acquisition of migratory ability [3]. Shape remodeling of DCs is also important allowing acquisition of an elongated shape, extending and retracting long dendrites to form dynamic clusters with CD4⁺ T cells for efficient immune synapse formation and T cell activation [2],[4]–[6].

Comprehension of mechanisms involved in DC maturation represents a crucial aim of research to be able to develop new strategies to manipulate immune response. Immune properties of DCs arouse interest due to their involvement in various pathologies such as infectious diseases, cancer, autoimmunity and graft rejection. As part of a study of identification of genes associated with allograft rejection or tolerance in transplantation, we identified a new molecule that we named LIME and that we found to be over-expressed in graft and blood of rats developing chronic rejection. In this study, we attempted to characterize the immune regulation and the function of this new molecule.

RESULTS

Identification of an uncharacterized molecule over-expressed in graft rejection.

In an attempt to identify new genes that could be involved in the development of chronic rejection or tolerance in transplantation, we applied pan genomic DNA chip. We compared in a rat MHC fully mismatched cardiac allograft model, whole allografts that develop chronic rejection with allografts that are tolerated by a short-term treatment with an immunosuppressor [7]. We previously described extensively these models and showed that DNA chip enable the identification of molecules involved in these complex phenomena [7],[8]. Among the genes up-regulated in chronically rejected versus tolerated allografts, we identified the rat gene ID 308794 (RGD1310371). This gene encodes for a predictive molecule not characterized so far and that was only shown to be highly expressed by ciliated cells [9]. We arbitrary named this molecule "LIME" for "LPS-Induced Molecule". We confirmed by quantitative RT/PCR the over-expression of LIME mRNA in chronically rejected allografts compared to syngenic grafts and also observed a peak of expression in acutely rejected allografts (Fig. 1A, n=5, *p<0.05 and **p<0.01). Interestingly, we observed a higher mRNA expression of LIME also in blood of recipients developing chronic rejection compared to the one from syngenic or tolerant recipients (Fig. 1A, n=5, **p<0.01 and ***p<0.001).

LIME is highly expressed in activated myeloid cells and in testis, trachea and lung.

In order to characterize this new molecule, we analyzed its expression in different rat cell types. Quantification of LIME mRNA showed a very low expression in resting spleen DCs, alveolar macrophage lineage (NR83 83), B, T and endothelial cells (EC) (Fig. 1B). However, we observed that LIME mRNA expression was strongly induced (up to 50 fold) following inflammatory stimulation in DCs and alveolar macrophage lineage but not in B, T and ECs (Fig. 1B). We performed a LIME mRNA expression kinetic analysis in bone marrow derived DCs (BMDCs) and observed that LIME was strongly induced (up to 100 fold) at 12 hours after stimulation with the different inflammatory stimuli tested (LPS, IFN γ , CpG or Poly(I:C)) and then rapidly decreased. Interestingly, LIME mRNA expression was decreased at 12 hours after stimulation with the immuno-regulatory cytokine IL-10 (Fig. 1C). We analyzed LIME mRNA expression in human monocyte-derived DCs and also observed a strong up-regulation (up to 45 fold) following LPS-stimulation suggesting similar regulation of LIME expression across species (Fig. 1D, n=3, **p<0.01). We then analyzed LIME mRNA expression in different organs or tissues from naive rats. We denoted a huge expression in the testis and a

strong expression in the trachea and lung. The expression was lower in the other organs or tissues tested (skeletal muscle, aorta, thymus, lymph nodes, small intestine, brain, spleen, heart, colon, bone marrow, liver, skin, and kidney) (Fig. 1E, n=3).

LIME is involved in the stimulatory properties of DCs.

To determine the function of LIME, we used specific LIME reformed-type small interfering RNA (RNAi) that allow efficient and long-term inhibition of the gene [10]. Two non overlapping RNAi specific for LIME were tested in rat LPS stimulated BMDC and compared with a control RNAi. We previously demonstrated that this technology efficiently transfected most of the rat BMDCs (up to 80% of the cells were transfected with a fluorescent RNAi) [8]. With LIME specific RNAi, we obtained an efficient inhibition of LIME mRNA expression in LPS-stimulated BMDCs compared to control RNAi (up to 70%) (Fig. 2A, n=3, *p<0.05 and ***p<0.001). We first analyzed whether LIME inhibition modified LPS-induced maturation of these cells. We did not observe any effect of LIME inhibition on the expression of activation molecules such as class I and class II MHC, CD80 or CD86 (data not shown). We did not observe either an effect of LIME inhibition on the LPS-induced cytokine production of IL-12p70, IL-6 or IL-10 (data not shown). Then, we investigated whether inhibition of LIME in matured BMDC affected their ability to promote T cell proliferation. In a fully allogeneic mixte leukocyte reaction (MLR), we observed a diminution of T cell proliferation when LIME was inhibited in the stimulatory BMDCs (Fig. 2B, n=3, *p<0.05). We observed also a lower production of IFN γ by these allogeneic T cells (Fig. 2C, n=3, *p<0.05).

We then used a more relevant and sensitive system of T cell stimulation with CD8⁺ T cells from OT-I transgenic mice TCR transgenic for ovalbumin (OVA). First, we evaluated the efficiency of transfection of mice BMDCs with specific fluorescent RNAi. We observed that almost all the cells (up to 97%) were transduced with RNAi (Representative Picture, Fig. 2D). We confirmed inhibition of LIME mRNA expression in mouse BMDCs (up to 70%) with two different LIME specific RNAi (Fig. 2E, n=3, *p<0.05 and ***p<0.001). Similar to what we observed in rat BMDCs, this inhibition did not modify the expression of activation molecules in mice DCs (class I and class II MHC, CD80 or CD86) (data not shown). However, LIME inhibition in OVA loaded BMDCs strongly reduced their ability to stimulate the transgenic CD8⁺ T cells (Fig. 2F, n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). The reduction of proliferation was observed with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide or OVA protein loaded DCs demonstrating that this decrease was not due to a default in antigen processing. Importantly, the same defect of

specific CD8⁺ T cell proliferation was also observed *in vivo*, following footpad injection of LIME inhibited OVA loaded BMDCs (less proliferation and recovering of specific CD8⁺ T cells in the draining lymph node; Fig 2G, n=4, **p<0.01). Taken together, these data demonstrate a role for LIME in the stimulatory properties of DCs.

LIME co-localized with the cytoskeleton.

To determine the intracellular localization of LIME, we analyzed its amino-acid (AA) sequence by using different predictive Software as PSORTII [11], TMHMM2.0 [12], NMT tools [13], TargetP1.1 [14] and NetNES [15]. Results revealed no transmembrane domain and a high probability for LIME to be located in the cytoplasm (data not shown). We detected a Nuclear Export Signal domain (NES) from AA 100 to 110 (I-K-A-Q-L-N-D-D-L-E-I), suggesting that LIME circulates between nucleus and cytoplasm.

To determine its exact cellular localization, we attempted to generate anti-rat LIME polyclonal antibodies by immunizing rabbit with LIME specific peptides. Unfortunately, we obtained no efficient immunization suggesting that LIME is highly conserved between species. Therefore, we transfected eukaryote cells with plasmid encoding the rat LIME full-length sequence and containing the V5 tag. Confocal microscopy analysis revealed expression of the V5 tag associated LIME protein largely in the cytoplasm and at lower extent in the nucleus. Interestingly, in the cytoplasm, tagged LIME protein appeared to be organized as network as some cytoskeleton filament proteins (Fig 3A, representative picture). Therefore, we performed co-staining of LIME protein with polymerized actin by using phalloïdin. Interestingly, we observed that LIME co-localized with actin and particularly at some areas under the cell plasma membrane (at specific cytoskeleton organized structures or protrusions) (Fig 3B, representative merged picture). To determine the exact nature of the co-localization between LIME and actin, the profiles of the fluorescent intensities for LIME and actin were plotted at two different cell membrane locations (transept white lines) (Fig 3B i) ii). Representative histograms showed a largely overlapping staining and parallel fluctuations of LIME and actin intensities suggesting a close relationship between these proteins.

LIME exhibit structure homology with “trefoil” molecules.

In the literature, nothing was described on LIME gene except its high expression by mouse ciliated cells [9]. To obtain more information about LIME and notably to determine whether this new molecule could be linked with a specific family, we made *in silico* analysis of LIME

sequence in collaboration with the GenOuest bioinformatics core facility (Rennes, France). First, NCBI blast (National Center for Biotechnology Information database) of rat LIME sequence revealed 71% and 88% of identity respectively with the human and mouse sequences demonstrating that LIME is highly conserved between species (Fig. 4A). Any specific signals characteristic of a known family protein or specific patterns were revealed with InterProScan portal [16]. Moreover, sequence alignment algorithms such as “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) [17] and PSI-BLAST [18] could not detect a homolog of LIME from the protein databank.

As the biological function of protein molecules is determined by their 3D shape (which dictates how the protein interacts with ligands or other protein molecules), one of the most common motivations for predicting the protein function is to use the structural information. We used “gene3D”[19], the “Iterative Threading ASSEmbly Refinement” (I-TASSER) [20] and “Protein Homology/analogy Recognition Engine” (PHYRE) [21],[22] web servers that applied for finding of homology modeling and tertiary structure prediction. Interestingly, results from these 3 different web servers revealed a high probability of link between LIME and trefoil protein family. For example, the nine first hits extracted from PHYRE exhibit a % of confidence >94% and a % of identity ranging from 14% to 24% (with 6 exhibiting a % of identity \geq 20%, the threshold to consider homology). By their structure, these proteins are linked to trefoil molecule family. Trefoil molecules are characterized by a rich cystein domain, named trefoil domain and by their “three-leaf” structure [23]–[25]. Although LIME does not contain a rich cystein domain, it is related to trefoil molecule family by its predictive structure. Figure 4B illustrates the predicted LIME 3D modeling by PHYRE software. As an example, 176 residues (58% of LIME sequence) have been modeled with 99,8% confidence by the highest scoring template d1tf9 protein, a protein of unknown function and exhibiting 18% of identity with LIME (Fig. 4B).

We also observed that LIME gene exhibit shared synteny with preserved co-localization of the following genes Tmc3, Stard5, IL-16, LIME (RGD1310371), Mesdc1 (mesoderm development candidate 1) and Mesdc2 on rat, mouse and human chromosomes (Data not shown). Interestingly, LIME gene is flanked of IL-16 and Mesdc-1, two genes that have been described to bind respectively the cytoskeleton proteins myosin [26] and actin [27],[28]. Genes of similar structure or linked functions are often grouped in locus/complex of genes or supergenes on chromosome as it is the case for the NK or MHC gene complex [29],[30]. Therefore, the proximity of LIME with these genes may suggest the presence of a locus/complex of genes sharing similar properties or functions related to cytoskeleton.

DISCUSSION

In this study, we characterized a molecule not described so far that we named LIME, and that we identified as over-expressed in blood and graft of recipients developing rejection. We showed that LIME expression is associated with the pro-inflammatory status of myeloid cells notably, DCs. In contrast, LIME expression is decreased by the immuno-regulatory cytokine IL-10 and has been reported to be inhibited by the anti-inflammatory agent arbutin [31],[32]. This regulation of expression could explain accumulation of LIME in recipients developing rejection versus tolerance. Indeed, rejection is combined with expression of pro-inflammatory cytokines and activation of myeloid cells that infiltrate the graft, uptake donor-antigens and migrate to the secondary lymphoid organs to stimulate T cells [33]. In contrast, tolerance is associated in our model with a strong inhibition of inflammation and cell activation and by the over-expression of immuno-regulatory factors [34]–[37].

A body of evidence suggests a role for LIME in dynamic cellular structure of the cytoskeleton. Indeed, LIME protein expression appeared to be organized in network and we observed a co-localization with actin notably at some membrane protrusions. Moreover, LIME is highly expressed in activated myeloid cells and in testis, trachea and lung that are rich in highly ciliated cells suggesting its involvement in dynamic cell extensions. Furthermore, LIME gene is flanked of the two genes encoding IL-16 and *Mesdc-1* that have been described to bind respectively the cytoskeleton proteins myosin [26] and actin [27],[28], and to play a role in cell mobility and motility. LIME and its neighboring genes may form a locus/complex of molecules sharing the common feature of being associated with the cytoskeletal network.

Interestingly, LIME predictive structure study indicated similarity of structure with trefoil proteins that interact for some of them with actin. Among them, are the actin filament (F-actin) bundling proteins Fascins [38] that exhibit the same expression profile of LIME with a high expression in activated DCs (Fascin-1) [6] and a high expression in testis (Fascin-3) [39]. Fascin-1 is involved in the formation of filopodia, dendrites and invadopodia [40]–[42] that play critical roles in maturation-associated DC functions such as migration, cytokine production and interaction and activation of T cells [43]–[45]. Fascin-3 as LIME is highly expressed in testis at the spermatid stage ([39] and GEO profiles, data not shown). During spermiogenesis, round spermatids are remodeled into the fusiform shape of mature spermatozoa. Significant morphological changes occur and are correlated with a reorganization of microfilaments and microtubules in the head and tail regions of elongating

spermatids by the expression of specialized actin- and tubulin-associated proteins [39]. Fascin and LIME may function in microfilament rearrangements that accompany fertilization. The role of these molecules sharing the common feature of being associated with the cytoskeletal network is important to decipher. Indeed, Fascin has received a lot of attention among cytoskeletal proteins because multiple clinical studies have implicated its expression in cancer progression and metastasis [40]. We observed LIME protein also in the nucleus and identified a NES signal that allows molecule exchange between the cytoplasm and nucleus through nuclear pore complex. Similarly to actin that contains two NES [46], LIME might shuttle between the cytoplasm and nucleus to play a role in both compartments. Indeed, in addition to play a fundamental role in cytoplasm, actin has been described to binds RNA polymerase and to promote chromatin remodeling [47]–[50].

We observed that LIME inhibition in DCs reduces their ability to stimulate T cells. However, we did not observe an effect of LIME inhibition on DC migration in chemotaxis experiments (data not shown). This does not exclude a role for LIME in cytoskeleton rearrangement important for motility or mobility. Alternatively, LIME that is strongly up-regulated in DCs following inflammatory maturation could be required for immune synapse formation with T cells and efficient T-cell priming. Indeed, it has been shown that BMDC deficient for the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP), a regulator of the cytoskeletal actin reorganization, present no alteration of maturation and of antigen endocytose and processing but have a reduced ability to stimulate specific T cells due to an alteration in the immune synapse structure [45].

To conclude, we described in this study a new molecule, LIME that could be involved in the dynamic function of specialized structure of the cytoskeleton important for cell adhesion, migration, motility or immune synapse formation. In the future, LIME may represent a new therapeutic target to regulate DCs activity and immune response.

MATERIALS AND METHODS

Animals and transplantation

MHC fully mismatched LEW.1A (RT1a) and LEW.1W (RT1u) rats and C57Bl/6 mice were purchased from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Transgenic mice S/SOPF B6.OT-I were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Rodents were maintained in an animal facility under standard conditions according to our institutional guidelines. The studies were reviewed and approved by the appropriate institutional review committee. Syngenic LEW.1A to LEW.1A or allogeneic LEW.1W to LEW.1A heart allografts were performed as previously described [51]. Allografts in untreated recipients were acutely rejected in 7 days. Allograft tolerance was induced as previously described by a short-term treatment (20 days, 3 mg/kg/day) with an immune-suppressor, LF15-0195 (Fournier Laboratories), a deoxyspergualine analog [52]. Chronic allograft rejection was induced by two donor blood transfusions (DST) before transplantation as previously described [7]. Graft function was assessed by scoring pulsations through the abdominal wall and acute or chronic rejection was confirmed by respectively heart beating cessation or the presence of vascular lesions (Histology). Graft and blood were harvested at day 5 or 100 after transplantation. PBMC were extracted from whole blood using ficoll (GE Healthcare).

Cell purification, culture, and activation

-Rat splenic DCs, T and B cells from naive rats were purified by positive selection using a FACSAria flow cytometer respectively by OX62⁺/classII MHC⁺, TCR⁺ and OX33⁺/HIS24⁺ stainings. DCs, T and B cells were cultured in complete medium and stimulated for 12h with respectively LPS (1µg/ml) (Sigma-Aldrich), plate-bound anti-CD3 (1µg/ml) anti-CD28 (1µg/ml) antibodies (BD Biosciences) or Cpg 2006 (5µM) (InvivoGen).

-Rat alveolar macrophage lineage NR8383 [53] cells were cultured in Ham's F12 medium completed with 10% endotoxin-free Fetal Bovine Serum (Perbio Science), 2 mM l-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 1 mM HEPES, and 5×10⁻⁵ M 2-ME, penicillin-streptomycin (100U/ml; 100µg/ml respectively) (all from Sigma-Aldrich) and stimulated 6h with rat IFN-γ (50 U/ml) (Serotec).

-Rat endothelial cell (EC) line of LEW.1W origin was isolated as previously described [54], plated into 12-well plates (Nunc; Merck/Eurolab France) (1 million cells/well) in complete RPMI medium and stimulated 6h with rat IFN-γ (50 U/ml) (Serotec).

-Rat BMDCs were obtained as previously described [55]. Briefly, bone marrow cells were cultured in complete RPMI 1640 medium supplemented with rat IL-4 (0.4 ng/ml) and murine GM-CSF (1.5 ng/ml). At day 8, rat BMDCs were collected, plated (2 million/ml) and stimulated with LPS (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich), recombinant rat IFN-γ (50 U/ml) (Serotec), CpG 2006 (5µM) (InvivoGen), poly (I:C) (25 µg/ml) (InvivoGen) or recombinant rat IL-10 (20 ng/ml) (R&D Systems) for 6, 12, 24 and 48h.

-Human DCs were generated as previously described [56]. Briefly, monocytes were enriched by elutriation (>85% CD14⁺) and cultured for 6 days in complete medium supplemented with human GM-CSF (200 IU/ml) (CellGenix) and IL-4 (1000 IU/ml) (CellGenix). Then, DCs were harvested and stimulated at 1 million cells/ml 24h with LPS (1 µg/ml). Ethical Committee approval was received for the study and the informed consent of all participating subjects was obtained. All cells were cultured at 37°C and 5% CO₂, recovered and subjected to RNA extraction.

-For mouse BMDC generation, only murine GM-CSF (0,15 ng/ml) was added to complete RPMI medium during culture of bone marrow cells.

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA from organs, tissues or cells was prepared using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative RT-PCR was performed as previously described [57] by using a step one plus instrument (Applied Biosystems) and SYBR Green PCR Master mix reagent (Applied Biosystems). Oligonucleotides used in this study were for rat (r), mouse (m) and human (h): rHPRT (Up-CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC, Lo-TTCGCTGATGACACAAACATGA), rLIME (Up-GTGTGACTGCTGTGCCGA, Lo-CCAGACAGAAGTCCTGCCC), mGAPDH (Up-CTACAGCAACAGGGTGGTGG, Lo-TATGGGGGTCTGGGATGG), mLIME (Up-GCCCAGATGAAGTTAAAGCG, Lo-GCCCATAGACAACCACTTGG), hHPRT (Up-CGAGATGTGATGAAGGAGATGG, Lo-CCTGTTGACTGGTCATTACAATAGC), hLIME (Up-GCAGTTCAAGCCAAGACCC, Lo-AAATCCTCCTGTTATCCCCAG). Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used as an endogenous control gene to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [57],[58].

Bioinformatics analysis

Rat, mouse and human LIME amino-acid (AA) sequence were analyzed with NCBI blast (National Center for Biotechnology Information database). To study cellular localization, rat LIME AA sequence was analyzed using the AA sequence-based predictors PSORTII [11], TargetP1.1 [14] and NetNES [15]. The probability of LIME to be associated with the membrane was checked by the presence of alpha-helix with TMHMM 2.0 [12] and NMT tools [13]. The presence of specific signals or link with known family protein according to the predictive secondary structure or predictive 3D structure, were analyzed by InterProScan portal [16], Gene3D [19], PHYRE [21],[59] and I-TASSER [20],[60] web servers.

Plasmid construction and transfection

Full-length rat LIME mRNA sequence was cloned from rat cDNA testis by PCR with the specific primers: rLIME (Up-ACGCGGATCCATGGCGCGGAATGTGTATGGTCC, Lo-ATAGTTTAGCGGCCCGCCCTGTATTGATGCCCATGGCCTGCTC) (Eurofins MWG) and insert in pcDNA6 vector (Invitrogen). 6×10^4 COS (CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40) fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue were plated on Microscope Cover glasses (Marienfeld GmbH & Co.KG) in 12-wells plate (Nunc; Merck/Eurolab France) during 24h. Cells were transfected with pcDNA6 plasmid with lipofectamin (Invitrogen) and Plus reagent (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. Cells were stained 24h after transfection.

Immunohistology

COS cells were fixed with paraformaldehyde (4%) (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA) and stained with anti-V5 antibody (11 μ g/ml) (Invitrogen), alexa fluor 568 anti-mouse antibody (4 μ g/ml) (Invitrogen) and FITC phalloïdin (0,4U/ml, Invitrogen). Cover glasses were mounted in Prolong Gold DAPI mounting medium (Invitrogen), and observed by fluorescence microscopy (*Nikon A1 R Si Confocal microscope*). Images were purchased (X60 Plan Apo N.A: 1.4, zoom 2.) with sequential mode and analyzed by using Metamorph and Image J program.

RNAi BMDC transfection, activation and T cell stimulation

Non-overlapping LIME specific Stealth RNAi (Stealth Select RNAi; Invitrogen) duplexes were designed and purchased by Invitrogen: Rat RNAi-1 (5'-CCACUGGAUGCUGGUUACUGGAAAU-3'), rat RNAi-2 (5'-

CAUGCAGACAUCUCUAAACCUAUU-3'), mouse RNAi-1 (5'-GCGAAAUGGGCCAAGUGGUUGUCUA-3') and mouse (RNAi-2 5'-UAGACAACCACUUGGCCCAUUUCGC-3'). At day 8 of culture, 2 million adherent rat or mouse BMDCs were transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) and with 200 pmol of control RNAi (medium GC content Stealth RNAi negative universal control, Invitrogen) or LIME specific RNAi. Cells were stimulated 48 h with LPS (0.5 µg/ml).

-For rat mixed leukocyte reaction (MLR), LEW.1A BMDCs were harvested 2 days following transfection and plated in 96-wells plate ($6,25 \times 10^4$ cells/ml) with allogeneic LEW.1W lymph node-derived T cells (20×10^4 cells/ml) in complete RPMI medium. Three days later, cells were pulsed for 8h with 0.5 µCi/well [methyl-³H]thymidine (Amersham) and ³H incorporation was measured using a scintillation counter (TopCount NXT; PerkinElmer). INFγ production was assessed in the MLR supernatant 5 days later by ELISA according to the manufacturer instructions (BD Biosciences).

-For mouse experiments, efficiency of mouse BMDCs RNAi transfection was tested by transfecting cells with Alexa fluor Red Oligo (Invitrogen) with the same protocol and then subjecting cells to FACS analysis.

-For in vitro antigen-specific T cell stimulation assay, 8-days transfected BMDC (1×10^4 cells) were plated in 96-wells plate, loaded with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (0,1ng/ml) or ovalbumin protein (500µg/ml), stimulated with LPS (0.5 µg/ml) for 24 hours, washed and then incubated with CFSE-labeled (Invitrogen) lymph node purified OT-I CD8⁺ T cells (10×10^4 cells) (Miltenyi kit). At day 5 of culture, cells were stained with anti-CD3 (BD Biosciences) and anti-CD8 (BD Biosciences) and T cell proliferation (CFSE dilution) was analyzed by flow cytometry.

-For in vivo antigen-specific T cell stimulation, 5×10^6 CFSE stained splenocytes from B6 OT-I ly5.1 mice were injected (i.v) in B6 ly5.2 mice. 24 hours later, 1×10^5 mouse BMDCs transfected with control or LIME specific RNAi were loaded with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (5µg/ml) and injected in the footpad. Poplite lymph nodes were recovered and stained with anti-CD45.1, CD3 and CD8 antibodies (BD Biosciences) and % of proliferation (CFSE dilution) and recovering of CD45.1 CD8⁺ T cells were analyzed by Flow cytometry.

Flow cytometry analysis

Fluorescent labeling was measured using a FACS LSR II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo Software.

Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using Student's *t* test for unpaired data, and results were considered significant if *p* values were <0.05. Data were expressed as mean ± SEM.

Acknowledgements

This work was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to L.L.T.) and by Fondation Centaure (to A.L.).

Conflict of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. **Medzhitov R, Janeway C Jr.** Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 2000; **343**:338–344.DOI: 10.1056/NEJM200008033430506.
2. **Trombetta ES, Mellman I.** Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; **23**:975–1028.DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538.
3. **van Helden SFG, Krooshoop DJEB, Broers KCM, Raymakers RAP, Figdor CG, van Leeuwen FN.** A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 2006; **177**:1567–1574.
4. **Watts C, Zaru R, Prescott AR, Wallin RP, West MA.** Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; **19**:73–78.DOI: 10.1016/j.coi.2006.11.014.
5. **Nobile C, Lind M, Miro F, Chemin K, Turret M, Occhipinti G, Dogniaux S, et al.** Cognate CD4+ T-cell-dendritic cell interactions induce migration of immature dendritic cells through dissolution of their podosomes. *Blood.* 2008; **111**:3579–3590.DOI: 10.1182/blood-2007-08-107755.
6. **Yamashiro S.** Functions of fascin in dendritic cells. *Crit. Rev. Immunol.* 2012; **32**:11–21.
7. **Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi M-C, Chiffolleau E.** New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation.* 2006; **82**:1185–1193.DOI: 10.1097/01.tp.0000236573.01428.f3.
8. **Thebault P, Lhermite N, Tilly G, Le Texier L, Quillard T, Heslan M, Anegon I, et al.** The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. *J. Immunol.* 2009; **183**:3099–3108.DOI: 10.4049/jimmunol.0803767.
9. **McClintock TS, Glasser CE, Bose SC, Bergman DA.** Tissue expression patterns identify mouse cilia genes. *Physiol. Genomics.* 2008; **32**:198–206.DOI: 10.1152/physiolgenomics.00128.2007.
10. **Klatt AR, Klinger G, Zech D, Paul-Klausch B, Renno JH, Schmidt J, Malchau G, et al.** RNAi in primary human chondrocytes: efficiencies, kinetics, and non-specific effects of siRNA-mediated gene suppression. *Biologicals.* 2007; **35**:321–328.DOI: 10.1016/j.biologicals.2006.12.003.
11. **Nakai K, Horton P.** PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 1999; **24**:34–36.
12. **Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL.** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 2001; **305**:567–580.DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315.
13. **Eisenhaber F, Eisenhaber B, Kubina W, Maurer-Stroh S, Neuberger G, Schneider G, Wildpaner M.** Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-Pi, NMT and PTS1. *Nucleic Acids Res.* 2003; **31**:3631–3634.
14. **Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G.** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 2000; **300**:1005–1016.DOI: 10.1006/jmbi.2000.3903.
15. **la Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S.** Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* 2004; **17**:527–536.DOI: 10.1093/protein/gzh062.
16. **Zdobnov EM, Apweiler R.** InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics.* 2001; **17**:847–848.
17. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; **215**:403–410.DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
18. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25**:3389–3402.

19. **Yeats C, Maibaum M, Marsden R, Dibley M, Lee D, Addou S, Orengo CA.** Gene3D: modelling protein structure, function and evolution. *Nucleic Acids Res.* 2006; **34**:D281–284.DOI: 10.1093/nar/gkj057.
20. **Roy A, Kucukural A, Zhang Y.** I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010; **5**:725–738.DOI: 10.1038/nprot.2010.5.
21. **Bennett-Lovsey RM, Herbert AD, Sternberg MJE, Kelley LA.** Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins.* 2008; **70**:611–625.DOI: 10.1002/prot.21688.
22. **Kelley LA, Shrimpton PJ, Muggleton SH, Sternberg MJE.** Discovering rules for protein-ligand specificity using support vector inductive logic programming. *Protein Eng. Des. Sel.* 2009; **22**:561–567.DOI: 10.1093/protein/gzp035.
23. **Baker ME.** Oestrogen-induced pS2 protein is similar to pancreatic spasmolytic polypeptide and the kringle domain. *Biochem. J.* 1988; **253**:307–309.
24. **Thim L.** A surprising sequence homology. *Biochem. J.* 1988; **253**:309.
25. **Thim L.** A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett.* 1989; **250**:85–90.
26. **Bannert N, Vollhardt K, Asomuddinov B, Haag M, König H, Norley S, Kurth R.** PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**:42190–42199.DOI: 10.1074/jbc.M306669200.
27. **Tatarano S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, Hidaka H, Nohata N, et al.** Novel oncogenic function of mesoderm development candidate 1 and its regulation by MiR-574-3p in bladder cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 2012; **40**:951–959.DOI: 10.3892/ijo.2011.1294.
28. **Gingras AR, Bate N, Goult BT, Patel B, Kopp PM, Emsley J, Barsukov IL, et al.** Central region of talin has a unique fold that binds vinculin and actin. *J. Biol. Chem.* 2010; **285**:29577–29587.DOI: 10.1074/jbc.M109.095455.
29. **Yokoyama WM, Plougastel BFM.** Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; **3**:304–316.DOI: 10.1038/nri1055.
30. **Martínez-Borra J, López-Larrea C.** The emergence of the major histocompatibility complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; **738**:277–289.DOI: 10.1007/978-1-4614-1680-7_16.
31. **Cheng S-L, Liu RH, Sheu J-N, Chen S-T, Sinchaikul S, Tsay GJ.** Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *J. Biomed. Sci.* 2007; **14**:87–105.DOI: 10.1007/s11373-006-9130-6.
32. **Lee H-J, Kim K-W.** Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.].* 2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487852> [Accessed June 25, 2012].DOI: 10.1007/s00011-012-0474-2.
33. **Celli S, Albert ML, Bousso P.** Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat. Med.* 2011; **17**:744–749.DOI: 10.1038/nm.2376.
34. **Chiffolleau E, Bériou G, Dutartre P, Usal C, Soullillou J-P, Cuturi MC.** Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am. J. Transplant.* 2002; **2**:745–757.
35. **Chiffolleau E, Bériou G, Dutartre P, Usal C, Soullillou J-P, Cuturi MC.** Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J. Immunol.* 2002; **168**:5058–5069.
36. **Thebault P, Condamine T, Heslan M, Hill M, Bernard I, Saoudi A, Josien R, et al.** Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction ofIDO in endothelial cells. *Am. J. Transplant.* 2007; **7**:2472–2482.DOI: 10.1111/j.1600-6143.2007.01960.x.

37. **Le Texier L, Thebault P, Lavault A, Usal C, Merieau E, Quillard T, Charreau B, 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.DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03336.x.
38. **Ponting CP, Russell RB.** Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J. Mol. Biol.* 2000; **302**:1041–1047.DOI: 10.1006/jmbi.2000.4087.
39. **Tubb B, Mulholland DJ, Vogl W, Lan Z-J, Niederberger C, Cooney A, Bryan J.** Testis fascin (FSCN3): a novel paralog of the actin-bundling protein fascin expressed specifically in the elongate spermatid head. *Exp. Cell Res.* 2002; **275**:92–109.DOI: 10.1006/excr.2002.5486.
40. **Machesky LM, Li A.** Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Commun Integr Biol.* 2010; **3**:263–270.
41. **Li A, Dawson JC, Forero-Vargas M, Spence HJ, Yu X, König I, Anderson K, et al.** The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr. Biol.* 2010; **20**:339–345.DOI: 10.1016/j.cub.2009.12.035.
42. **Vignjevic D, Kojima S, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, Borisy GG.** Role of fascin in filopodial protrusion. *J. Cell Biol.* 2006; **174**:863–875.DOI: 10.1083/jcb.200603013.
43. **West MA, Wallin RPA, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren H-G, Prescott AR, et al.** Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science.* 2004; **305**:1153–1157.DOI: 10.1126/science.1099153.
44. **Lämmermann T, Renkawitz J, Wu X, Hirsch K, Brakebusch C, Sixt M.** Cdc42-dependent leading edge coordination is essential for interstitial dendritic cell migration. *Blood.* 2009; **113**:5703–5710.DOI: 10.1182/blood-2008-11-191882.
45. **Bouma G, Mendoza-Naranjo A, Blundell MP, de Falco E, Parsley KL, Burns SO, Thrasher AJ.** Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. *Blood.* 2011; **118**:2492–2501.DOI: 10.1182/blood-2011-03-340265.
46. **Wada A, Fukuda M, Mishima M, Nishida E.** Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J.* 1998; **17**:1635–1641.DOI: 10.1093/emboj/17.6.1635.
47. **Grummt I.** Actin and myosin as transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006; **16**:191–196.DOI: 10.1016/j.gde.2006.02.001.
48. **Hu P, Wu S, Hernandez N.** A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* 2004; **18**:3010–3015.DOI: 10.1101/gad.1250804.
49. **Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, et al.** Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* 2004; **6**:1094–1101.DOI: 10.1038/ncb1182.
50. **Qi T, Tang W, Wang L, Zhai L, Guo L, Zeng X.** G-actin participates in RNA polymerase II-dependent transcription elongation by recruiting positive transcription elongation factor b (P-TEFb). *J. Biol. Chem.* 2011; **286**:15171–15181.DOI: 10.1074/jbc.M110.184374.
51. **Ono K, Lindsey ES.** Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1969; **57**:225–229.
52. **Chiffolleau E, Bériou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou J-P, Cuturi MC.** Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am. J. Transplant.* 2002; **2**:745–757.
53. **Helmke RJ, Boyd RL, German VF, Mangos JA.** From growth factor dependence to growth factor responsiveness: the genesis of an alveolar macrophage cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1987; **23**:567–574.
54. **Charreau B, Cassard A, Tesson L, Le Mauff B, Navenot JM, Blanchard D, Lublin D, et al.** Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation.* 1994; **58**:1222–1229.

55. **Pêche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi MC.** Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation.* 2003; **76**:1503–1510.DOI: 10.1097/01.TP.0000092494.75313.38.
56. **Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M.** Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol. Immunother.* 2001; **50**:417–427.
57. **Louvet C, Heslan J-M, Merieau E, Souillou J-P, Cuturi M-C, Chiffolleau E.** Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation.* 2004; **78**:1259–1266.
58. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; **25**:402–408.DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
59. **Kelley LA, Sternberg MJE.** Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc.* 2009; **4**:363–371.DOI: 10.1038/nprot.2009.2.
60. **Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y.** A protocol for computer-based protein structure and function prediction. *J Vis Exp.* 2011:e3259.DOI: 10.3791/3259.

FIGURES

Figure 1

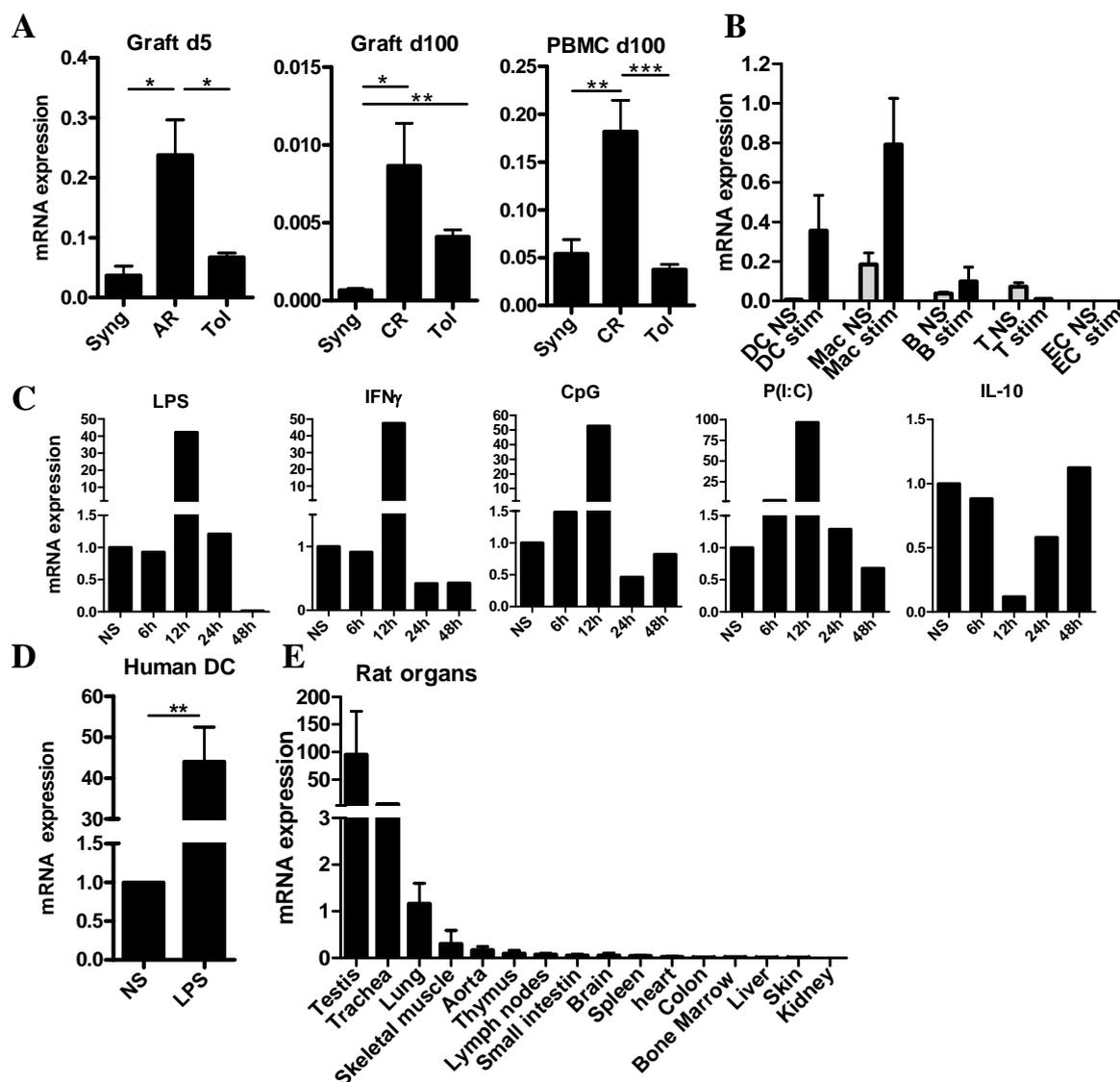


Figure 1: LIME mRNA expression in transplantation models, cell subtypes and organs. LIME mRNA expression in (A) cardiac grafts and PBMC of rat syngenic recipients (Syng), allograft recipients developing acute (AR) or chronic rejection (CR), or allograft tolerant recipients (Tol) at day 5 or 100 after transplantation (n=5), (B) Splenic DCs, alveolar macrophage lineage (Mac) (NR8383), B, T and EC, stimulated (stim) or not (NS) with respectively LPS, IFN γ , CpG, anti-CD3/CD28 or IFN γ for 12 hours (n=3), (C) rat BMDCs stimulated or not (NS) with LPS, IFN γ , CpG, Poly(I:C) or IL-10 for 6, 12, 24 or 48h (graphs were representative of three independent experiments), (D) HmoDCs stimulated or not (NS) with LPS for 12 hours (n=3) and in (E) different organs from naive rats as indicated (n=3).

Quantitative RT-PCR results were expressed in Arbitrary Unit (AU) of LIME/HPRT transcript ratio \pm SEM * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Figure 2

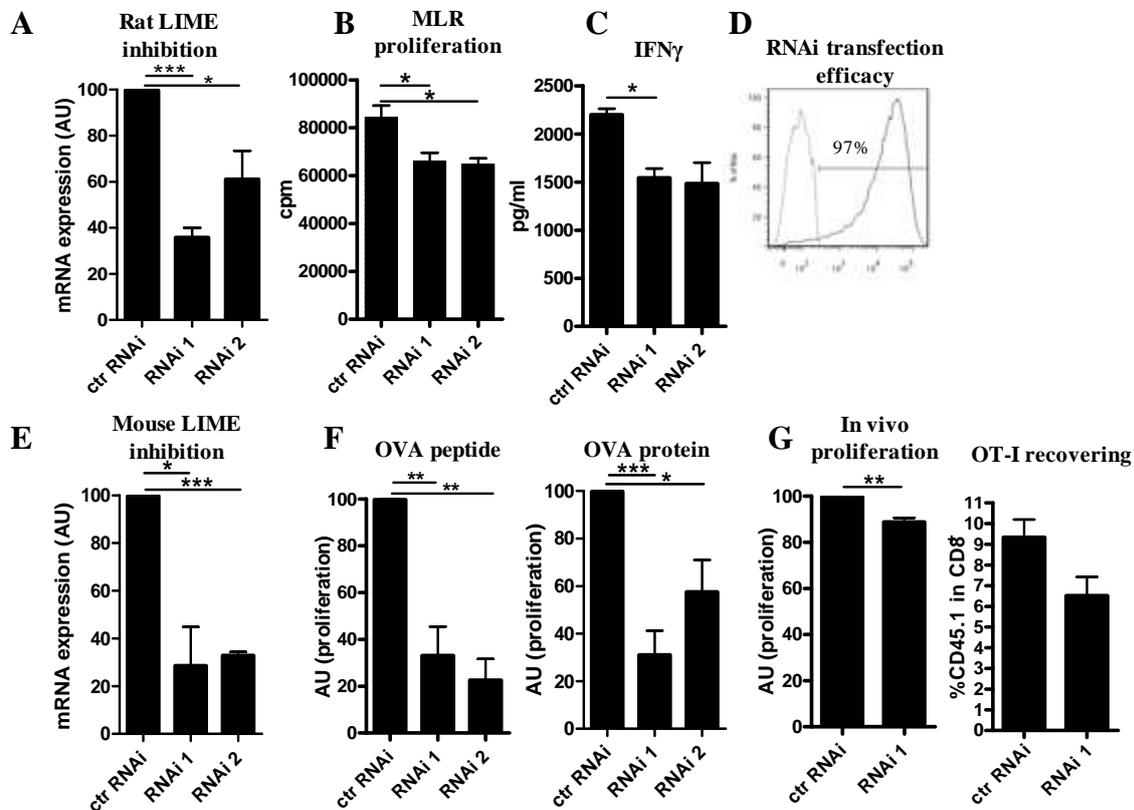


Figure 2: LIME function in stimulatory properties of BMDCs.

(A) LIME mRNA expression in rat BMDCs transfected with control or two LIME specific RNAi. Quantitative RT-PCR results were expressed in Arbitrary Unit (AU) of LIME/HPRT transcript ratio \pm SEM (n=3, * p <0.05, *** p <0.01). (B) Proliferation by ^3H incorporation (cpm) of allogeneic T cells stimulated by transfected control or two LIME specific RNAi BMDCs (MLR) for 4 days (n=3, * p <0.05). (C) IFN γ quantification in MLR supernatant by ELISA (n=3, * p <0.05). (D) Representative histograms (flow cytometry) of stimulated mouse BMDCs transfection efficiency (with red Fluorescent control RNAi (plain line) or untransfected control (dotted line)). (E) LIME mRNA expression in mouse BMDCs transfected with control or two LIME specific RNAi. Quantitative RT-PCR results were expressed in Arbitrary Unit (AU) of LIME/GAPDH transcript ratio \pm SEM (n=3, * p <0.05, *** p <0.01). (F) Proliferation of OT-I CD8 $^+$ T cell stimulated by OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (0,1 ng/ml) or OVA protein (500 μ g/ml) loaded mouse BMDCs (transfected with control or two LIME specific RNAi) (4 days). Data were expressed in AU of CFSE dilution compared to

control=100 (n=3, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05). (G) In vivo proliferation and recovering of CD45.1 OT-I CD8⁺ T cells previously inoculated to CD45.2 congenic mice and stimulated by OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (5 µg/ml) loaded mouse BMDCs (transfected with control or LIME specific RNAi) for 3 days. Data were expressed in AU of CD8⁺ T cell CFSE dilution (compared to control=100) and in % of CD45.1 CD8⁺ T cells recovered in the draining lymph node (n=4, **p<0.01).

Figure 3

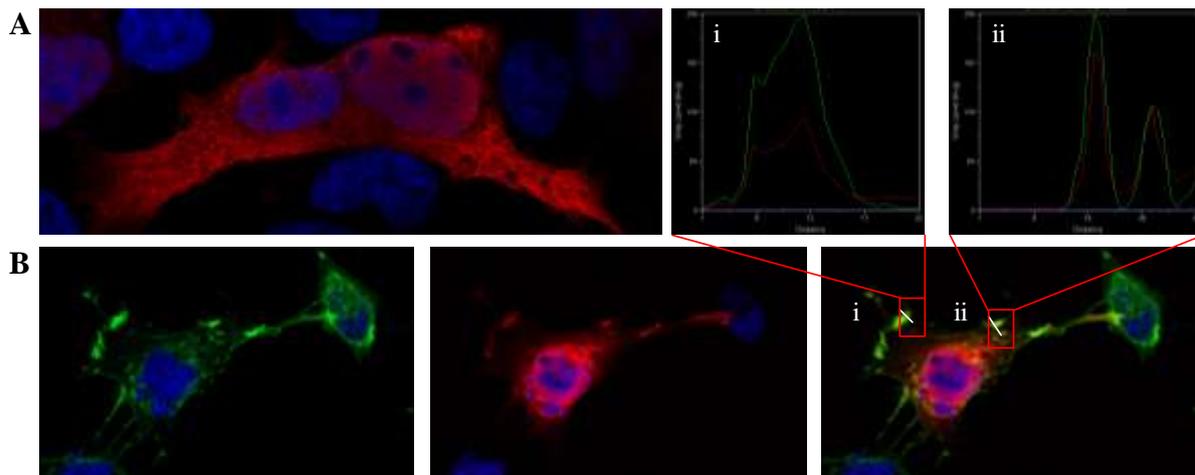


Figure 3: Cellular localization of LIME protein.

Representative pictures of immuno-fluorescence staining of COS transfected with plasmid encoding full length rat LIME protein and containing the V5 tag (red) with (A) DAPI (blue) and (B) DAPI and phalloïdin (polymerized actin) (green). Original magnification x1200 (Plan Apo N.A: 1.4 zoom 2.). (Bi,Bii) Representative histograms of intensity fluorescence (AU) detected in pixels along the transept white lines graphed with linescan function of Metamorph Image Processing Software. Pictures were representative of three independent experiments.

Figure 4

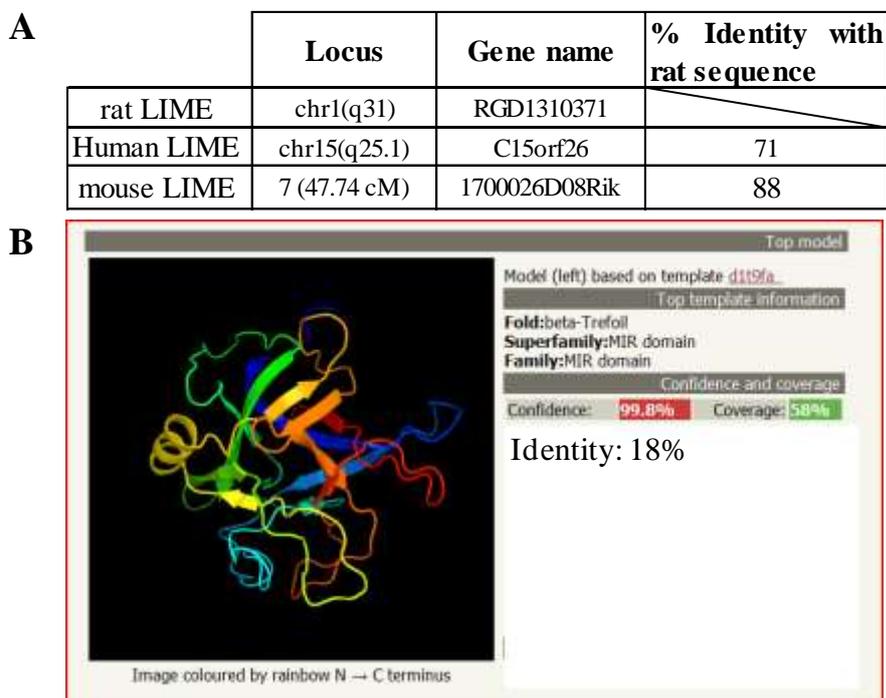


Figure 4: In silico LIME analysis.

(A) Multiple AA sequence alignment of rat, human and mouse LIME (NCBI blast). Results were expressed in % of identity with rat sequence. (B) Picture of LIME 3D modeling based on the highest scoring template by PHYRE web server. Results demonstrated identity of LIME structure with the β -trefoil family protein d1t9 (99.8 % of confidence with 58% of coverage of LIME sequence with the template) with 18% identity of sequence.

Discussion/perspectives

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse ont eut pour objectif l'étude des mécanismes impliqués dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. Pour cela, ces travaux se basent sur les résultats précédemment obtenus par notre équipe lors de l'étude comparative par puce à ADN des greffons tolérés (Tol) et des greffons développant un rejet chronique (CR).

L'analyse des puces suggérant une inhibition de la réponse humorale chez les animaux tolérants, l'objectif de la première partie de notre étude a donc été de caractériser la réponse lymphocytaire B chez les rats tolérants.

Nous avons débuté nos recherches par une analyse de ces cellules dans les greffons tolérés ou développant un rejet chronique, via des immuno-marquages d'IgG et d'IgM. Nous avons constaté la présence de LB organisés en "clusters" dans les deux types de greffons Tol et CR. Ces "clusters" de cellules B pourraient correspondre à la formation de centres germinatifs parfois observés dans des organes sujets à une réponse auto-immune chronique ou à des d'infections chroniques lors desquelles, il est possible d'observer une néogénèse lymphoïde (Aloisi & Pujol-Borrell 2006). Dans la littérature, ce type de formations lymphoïdes, appelées organes lymphoïdes tertiaires, est également associé à la production d'alloanticorps et au rejet chronique d'allogreffes (Baddoura et al. 2005; Thaunat et al. 2005). Cependant, dans notre étude, le marquage des IgG et la quantification de leurs transcripts met en évidence une production d'IgG uniquement par les "clusters" des greffons CR, suggérant une absence ou une très faible production d'anticorps par les LB dans les greffons Tol. De plus, nous observons une plus forte expression des transcripts d'IgM dans ces greffons Tol, suggérant la présence de LB dont la production d'IgG est inhibée et la production d'IgM est maintenue ou augmentée. Ces résultats pourraient s'expliquer par la présence de mécanismes régulateurs de la fonction des LB qui pourraient entraîner une inhibition du processus de commutation de classe des Ig au sein des "clusters" présents dans les greffons Tol. De plus, une récente étude suggère que la formation des organes lymphoïdes tertiaires au sein des allogreffes de rein peut être associée à la tolérance chez la souris (K. Brown et al. 2011). La présence d'une néogénèse lymphoïde pourrait donc être favorable à la survie du greffon. Par la suite, il serait donc intéressant de confirmer l'organisation de centres germinatifs au sein des greffons en réalisant des marquages histologiques des différents types cellulaires qui les composent (cellules T CD4⁺, CD8⁺ et DC). De plus, il faudrait confirmer l'inhibition du

processus de recombinaison de classe des Ig en étudiant notamment l'expression de molécules impliquées dans ce phénomène telle que l'enzyme AID. Des études préalablement réalisées par notre équipe ont mis en évidence l'accumulation chez les animaux tolérants de cellules Treg CD4⁺CD25⁺ capables de transférer la tolérance à un second receveur syngénique (E. Chiffolleau et al. 2002). Nous pourrions tenter de déterminer si ces cellules Treg participent à l'inhibition des LB au sein des greffons en analysant les LB et leur production d'anticorps dans les greffons des animaux transférés avec les cellules Treg.

Malgré l'inhibition de production d'IgG au sein du greffon, nous avons observé un dépôt d'IgG sur les vaisseaux des allogreffes tolérées. L'analyse des isotypes de ces Ig par des immuno-marquages montre uniquement un dépôt d'IgG1 (Th2) sur les greffons Tol, ce qui contraste avec le dépôt important d'IgG2b (Th1) et d'IgG1 (Th2) observé sur les greffons CR. De plus, nous observons une plus forte quantité de DSA circulants de type IgG1 et une plus faible quantité de type IgG2b, chez les animaux Tol par rapport aux animaux CR. Ces résultats soulignent une déviation de la réponse des anticorps anti-donneurs vers un isotype associé aux Th2 chez les animaux tolérants. Dans la littérature, l'observation d'une réponse de type Th2 a été associée au rejet chronique (Koshiba et al. 2003; Illigens et al. 2009). Cependant, dans notre modèle de tolérance, les DSA ne semblent pas activer le complément comme en témoigne l'absence de dépôt de C4 sur l'endothélium des allogreffes. À l'inverse, un important dépôt de C4 est observé sur les greffons CR.

La quantification de la totalité des IgG anti-donneurs, dans le sérum des animaux, confirme la régulation de la production des DSA chez les animaux tolérants. Néanmoins, la différence de production de l'ensemble d'IgG anti-donneurs en périphérie entre les deux groupes d'animaux ne reflète que faiblement la forte régulation observée dans les greffons Tol. Il est probable que le niveau de DSA produits chez les rats CR soit sous-estimé en raison d'un recrutement massif de ces anticorps au sein du greffon. Bien que la présence de DSA circulants soit le signe d'un mauvais pronostic de la survie du greffon chez l'homme, certains patients possédant des DSA ne présentent pas d'altération de la fonction de leur greffon (A. Piazza et al. 2001; Haririan et al. 2009). À l'inverse, malgré une forte corrélation entre la présence du dépôt de C4 et l'activation de la réponse humorale anti-donneur, l'absence de ce dépôt n'exclut pas la possibilité d'une réponse humorale contre le greffon. Une récente étude suggère que la modification de l'expression des gènes associés à l'activation des cellules endothéliales dans les greffons semble être un meilleur marqueur pronostic de l'activation de la réponse humorale anti-donneur (Sis et al. 2009). En effet, les anticorps peuvent agir via des

mécanismes indépendants du complément et induire des signaux pro-inflammatoires dans les cellules endothéliales (Wehner et al. 2007). Cependant, dans notre étude, les DSA des animaux tolérants n'entraînent pas, *in vitro*, d'activation inflammatoire des cellules endothéliales du donneur. Au contraire, ils favorisent ou maintiennent l'expression de molécules protectrices telles que HO-1, Notch 4 et CLEC-1, alors que les DSA des rats CR la diminuent. Ces résultats concordent avec l'expression de molécules cytoprotectrices telles queIDO, iNOS et HO-1 par les cellules endothéliales des greffon tolérés, observée dans une étude précédemment réalisée par notre équipe (P Thebault et al. 2007). Ces résultats suggèrent que les DSA des animaux tolérants possèdent des propriétés différentes de ceux provenant des animaux en rejet chronique. Ils pourraient contribuer, comme le suggèrent certaines études, à protéger les cellules endothéliales du greffon (Koch et al. 2004; X Zhang & E F Reed 2009). Différents facteurs agissent sur les propriétés cytotoxiques des anticorps tels que leur concentration, leur spécificité ou leur affinité (A. T. Chang & Platt 2009; X Zhang & E F Reed 2009). Par la suite, il serait donc intéressant de caractériser les DSA produits chez les rats tolérants en étudiant ces différents paramètres. De plus, les groupements glycanes portés par les anticorps semblent importants pour leur propriété cytotoxique. La sialylation des anticorps diminue leur capacité pro-inflammatoire en régulant leur fixation sur les RFc (Kaneko et al. 2006; Kaneko et al. 2006). De plus, il a été montré que la galactosylation des anticorps IgG1 leur confère des propriétés anti-inflammatoire via l'inhibition de l'effet du composant C5a du complément (Karsten et al. 2012). Nous pourrions donc évaluer la sialylation et la galactosylation des DSA présents chez les rats tolérants afin de déterminer si la présence de ces groupements glycanes peut être associée à la tolérance dans notre modèle. Les résultats obtenus lors de l'étude de ces anticorps pourraient contribuer à une meilleure connaissance des anticorps dans la tolérance et dans le futur, permettre de diagnostiquer un profil protecteur ou délétère des anticorps produits chez les patients transplantés.

Au cours de notre étude, nous avons également mis en évidence une accumulation des LB dans le sang des rats Tol par rapport aux rats CR. L'analyse par cytométrie et par RT-PCR montrent que les LB des animaux Tol sont inhibés dans leur production d'Ig et que l'induction du mécanisme de commutation de classe des Ig pourrait être bloquée.

Afin d'étudier le phénotype des LB chez le animaux Tol, nous avons analysé, dans le greffon et le sang, l'expression de molécules associées aux LB. Chez les animaux tolérants, nous observons une plus faible expression de la molécule d'activation CD27 par les LB, un ratio de l'expression des transcrits des récepteurs inhibiteur et activateur (FcγRIIb/FcγRIIa)

augmenté, ainsi qu'une accumulation du transcript de la molécule BANK-1 en périphérie. Le récepteur inhibiteur Fc γ RIIb est un régulateur négatif de la division cellulaire des LB, de la commutation de classe des Ig et de la différenciation en plasmocyte (Nimmerjahn & Jeffrey V Ravetch 2006). BANK-1 est impliquée dans l'inhibition de l'activation des cellules B dépendante de la signalisation via la molécule CD40 (Aiba et al. 2006). L'ensemble des résultats suggère que les LB des greffons et du sang des animaux Tol présentent un phénotype régulé. De façon intéressante, des résultats similaires ont été mis en évidence dans le sang des patients opérationnellement tolérants présentant une accumulation de LB avec un ratio Fc γ RIIb/Fc γ RIIa augmenté et une accumulation de la molécule BANK-1 (Annaick Pallier et al. 2010). Ces résultats soulignent la présence de mécanismes similaires entre l'homme et le rat.

Notre équipe avait préalablement mis en évidence la capacité des splénocytes totaux et des lymphocytes CD4⁺ purifiés des animaux tolérants à transférer la tolérance (E. Chiffolleau et al. 2002). Dans cette étude, nous avons démontré que les LB des animaux tolérants sont également capables de transférer la tolérance à des receveurs syngéniques. Ces résultats révèlent la présence d'une population de LB régulateurs parmi les LB des rats tolérants. Récemment, différentes équipes de recherche ont mis en évidence un rôle régulateur des LB en démontrant l'existence de Breg importants pour la régulation de la réponse immune et particulièrement dans les maladies auto-immunes. La caractérisation de ces LB montre qu'ils présentent un phénotype immature/transitionnel (Vitale et al. 2010). La plupart des populations de Breg identifiées exercent leur fonction régulatrice via la production d'IL-10 (Evans et al. 2007; Mann et al. 2007). Dans notre étude, des analyses préliminaires par cytométrie des LB du sang des animaux tolérants ne révèlent pas d'accumulation de LB producteurs d'IL-10 par rapport à ce qui est observé chez les rats CR. Ces résultats suggèrent que les Breg, mis en évidence dans notre modèle de tolérance, sont différents de ceux décrits dans la littérature. Toutefois, il est nécessaire de réaliser des analyses supplémentaires sur les LB de la rate dans laquelle nous avons détecté les Breg. De plus, il est probable que cette population régulatrice ne représente qu'un faible pourcentage de cellules au sein de la population de LB totale, ce qui rend difficile la mise en évidence de ces Breg. Par la suite, il serait donc intéressant d'identifier le phénotype des Breg afin de mieux les caractériser et d'étudier leur mode d'action. Dans la littérature, différents marqueurs comme le CD1d et le CD5 (Vitale et al. 2010) ont été associés aux Breg ainsi que les molécules CD21, CD23, CD24 (Evans et al. 2007; Blair et al. 2010; Kessel et al. 2012) ou encore le facteur de transcription Foxp3 récemment mis en évidence dans des Breg impliqués dans la tolérance

orale (J. Noh et al. 2010; J. Noh et al. 2012; J. Noh & G. Noh 2012). Bien que les mécanismes de régulation utilisés par les Breg soient encore peu connus, certaines études ont révélé que d'autres facteurs que l'IL-10 tels que le TGF- β ou la galectine-1, peuvent être utilisés par les Breg. Il serait donc intéressant de tester la production de ces molécules par les LB présents chez les rats tolérants de notre modèle. De plus, il a été démontré que les Breg sont capables d'induire des cellules T régulatrices. Or, les rats tolérants présentent une accumulation de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ au niveau de la rate et du greffon. Afin de déterminer si les Breg participent à l'induction des Treg, nous pourrions utiliser les rats déficients pour les LB (KO pour les IgM), disponibles au sein de notre laboratoire, et déterminer si l'absence de cellules B est associée à une inhibition de la génération de Treg lors d'un traitement par le LF de rats KO greffés. De plus, nous pourrions tenter de déterminer si les cellules B sont indispensables à l'induction de la tolérance dans notre modèle.

En conclusion, dans cette première partie, nous mettons en évidence une forte régulation de la réponse lymphocytaire B associée à une déviation de réponse de type Th2 chez les animaux tolérants. Nous montrons également une accumulation de LB présentant un phénotype régulé et la présence de LB régulateurs suite à une forte immunosuppression. Comme le suggèrent de récentes études, la recolonisation du répertoire lymphocytaire B en présence des alloantigènes, suite à une immunosuppression, peut permettre de créer un environnement propice à la tolérance en générant des populations de LB régulateurs (Heidt et al. 2012). Ce phénomène pourrait donc être à l'origine, dans notre modèle et chez les patients opérationnellement tolérants, de cette accumulation de LB au profil inhibé et/ou inhibiteur qui favoriserait la tolérance des greffons en absence de traitements immunosuppresseurs.

Notre étude permet donc de souligner l'importance de la compréhension des mécanismes de régulation des LB qui pourrait permettre la mise en place de nouvelles stratégies d'induction de tolérance.

Dans la seconde partie de notre étude des mécanismes impliqués dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat, nous nous sommes intéressés à une nouvelle molécule non décrite jusqu'à présent, que nous avons nommée LIME (LPS-induced molecule). En effet, l'analyse des puces à ADN a permis d'identifier le gène codant pour cette nouvelle molécule comme étant inhibé dans le greffon des rats Tol. Après la confirmation par RT-PCR quantitative de l'inhibition du transcript de LIME dans les greffons ainsi que dans le sang des

rats Tol par rapport aux animaux CR, notre objectif a été de caractériser la régulation et la fonction immunologique de LIME.

Lors de l'analyse de la régulation de LIME, nous avons montré que son transcript est exprimé dans les DC et les macrophages suite à une stimulation pro-inflammatoire. À l'inverse, son expression est diminuée par la cytokine immuno-régulatrice IL-10 et par l'arbutine, un agent anti-inflammatoire (S.-L. Cheng et al. 2007; H.-J. Lee & K.-W. Kim 2012). Cette régulation de l'expression de LIME dans ces cellules pourrait expliquer sa forte expression chez les rats CR par rapport aux animaux Tol. En effet, le rejet d'allogreffe implique la présence de cytokines pro-inflammatoires et l'infiltration de DC activées dans les greffons, qui vont capter les antigènes du donneur et migrer dans les ganglions drainants pour activer les lymphocytes alloréactifs (Celli et al. 2011). En revanche, l'inhibition de LIME chez les animaux tolérants pourrait refléter la régulation de l'inflammation et de l'activation cellulaire, ainsi que la présence de facteurs immuno-régulateurs observés lors de la tolérance (E Chiffolleau et al. 2002a; J. M. Heslan et al. 2006; P Thebault et al. 2007; L Le Texier et al. 2011).

Au cours de la caractérisation de LIME, nous avons pu mettre en évidence divers arguments en faveur de son association avec le cytosquelette. En effet, l'étude de la localisation cellulaire de LIME via des immuno-marquages dans des cellules COS sur-exprimant LIME et une analyse *in silico*, suggère que c'est une molécule exprimée dans le cytoplasme, dans lequel elle est organisée en réseau. Nous avons également observé une colocalisation de LIME avec l'actine polymérisée dans les protrusions membranaires. De plus, dans la littérature, le gène de LIME a été associé aux cellules ciliées de souris (McClintock et al. 2008). En accord avec ces résultats, nous avons montré que le transcript de LIME est fortement exprimé dans les testicules, la trachée et les poumons qui sont des organes riches en cellules ciliées, dont la forme et la fonction dépendent fortement du cytosquelette (Griffiths et al. 2010). Nous supposons donc que LIME pourrait être impliquée dans la formation de protrusions ou d'extensions membranaires impliquant le cytosquelette. Cependant, il sera important, par la suite, de confirmer la localisation cellulaire de LIME dans des conditions plus physiologiques dans des DC de rats, et de réaliser des expériences supplémentaires telles que des immunoprécipitations, afin de confirmer l'interaction de LIME avec l'actine.

Par ailleurs, nous avons constaté que le gène de LIME est encadré par deux gènes codant pour les molécules IL-16 et Mesdc-1, décrites comme jouant un rôle dans la mobilité et la motilité cellulaire en se liant à des molécules du cytosquelette comme la myosine

(Bannert et al. 2003) et l'actine (Gingras et al. 2010; Tatarano et al. 2012). Or, les gènes possédant des structures ou des fonctions similaires peuvent être regroupés dans un même locus ou complexe de gènes sur le chromosome. C'est le cas notamment pour les complexes de gènes NK ou codant les molécules du CMH (Yokoyama & Plougastel 2003; M Martínez-Llordella et al. 2007). Le gène de LIME pourrait donc faire partie d'un "cluster" de gènes qui codent pour des molécules associées au cytosquelette. L'ensemble de ces résultats renforce l'idée d'un lien entre LIME et le cytosquelette.

De façon intéressante, l'analyse *in silico* de LIME suggère une forte similarité de structure entre LIME et les protéines de la famille Trefoil. Or, certains membres de cette famille, tels que les molécules Fascines (Ponting & R. B. Russell 2000), sont connus pour interagir avec l'actine. De plus, elles présentent un profil d'expression similaire à celui de LIME, en étant fortement exprimées dans les DC activées (Fascin-1) et dans les testicules (Fascin-3). Fascin-1 est impliquée dans la formation de filopodes, d'invadopodes et de dendrites (Vignjevic et al. 2006; L. M. Machesky & A. Li 2010; A. Li et al. 2010), nécessaires à la migration et à l'interaction des DC matures avec les cellules T (West et al. 2004; Lämmermann et al. 2009; Bouma et al. 2011). Fascin-3, comme LIME, est exprimée dans les testicules par les cellules de la spermatogénèse à l'étape des spermatides (Tubb et al. 2002) (données Geo profiles). Afin de donner au futur spermatozoïde sa forme allongée, les spermatides subissent un réarrangement des microfilaments et des microtubules du cytosquelette. Ce réarrangement est associé à la modification de l'expression de molécules liées à la tubuline ou à l'actine. Ainsi, LIME et Fascin-3 pourraient jouer un rôle dans le réarrangement du cytosquelette qui accompagne le développement des spermatozoïdes, et donc être nécessaires à l'acquisition de ses propriétés de motilité et de mobilité. Un défaut d'expression de LIME pourrait donc être la cause de pathologies telles que l'infertilité qui peut être due à une déficience de la mobilité ou de la motilité cellulaire (Beauchamp et al. 1984; Ortega et al. 2011). Différentes études ont également associé l'expression de Fascin à la progression du cancer et au processus métastatique, pour lesquels la migration cellulaire est un facteur important (L. M. Machesky & A. Li 2010). LIME pourrait également participer à ce type de processus et donc être impliquée dans des pathologies telles que le cancer en influençant le mécanisme de migration des métastases.

Nous avons également observé l'expression de LIME dans le noyau des cellules ainsi que la présence d'un signal d'export nucléaire (NES) dans sa séquence d'acides aminés. Les

NES permettent aux molécules qui les possèdent, de passer du noyau au cytoplasme via les pores nucléaires. De la même manière que l'actine, LIME pourrait aussi jouer un rôle à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. En effet, l'actine, qui possède deux NES, est également présente au niveau du noyau dans lequel elle participe au remodelage de la chromatine et se lie aux RNA polymérase (de Lanerolle & Serebryanny 2011). Par la suite, il serait intéressant d'évaluer, par des immuno-marquages de l'actine non polymérisée, si LIME interagit avec celle-ci dans le noyau.

Afin d'étudier la fonction de LIME, nous avons inhibé son expression dans des DC stimulées. Les résultats de l'analyse de ces DC suggèrent que LIME est impliquée dans la capacité de ces cellules à stimuler les lymphocytes T. Cependant, elle ne semble pas intervenir au niveau de la production de cytokines, de l'expression des molécules de maturation (CMH de classe I et II, CD80 et CD86) et du processus d'apprêtement des antigènes par les DC. LIME semble donc agir sur un autre mécanisme important pour la fonction des DC activées. L'activation des DC est induite par des signaux de danger qui sont captés par les PRR tels que les TLR qu'elles expriment. Ces signaux déclenchent une cascade d'événements intracellulaires aboutissant à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la DC. Ces modifications incluent la réorganisation du cytosquelette, impliquant le réarrangement des microtubules et du réseau d'actine, et donc une régulation de l'expression des molécules associées à la tubuline et à l'actine. Le remodelage du cytosquelette est indispensable afin que la DC acquière les propriétés de mobilité, de motilité et de sécrétion de cytokines nécessaires à l'activation des cellules T. Dans des expériences de chimiotaxie utilisant le CCL19 ou du sérum pour attirer les cellules à travers des transwells, nous n'avons pas observé de modification de la migration des DC lorsque LIME est inhibée. Cependant, les expériences réalisées n'excluent pas complètement un rôle de LIME dans la mobilité ou la motilité cellulaire des DC. En effet, il serait intéressant de réaliser ces mêmes expériences dans un système tenant compte de la nécessité pour les cellules, en condition physiologique, de former des protrusions membranaires telles que les invadopodes. Dans l'organisme, les cellules forment ces protrusions afin d'induire la dégradation de la matrice extracellulaire et de migrer efficacement (L. M. Machesky & A. Li 2010). Ainsi, des expériences de chimiotaxie utilisant des transwells recouverts d'une couche de collagène pourraient permettre d'étudier l'implication de LIME dans l'invasion et la migration de DC.

Le remodelage du cytosquelette des DC est également impliqué dans la formation de synapses immunologiques entre les DC et les cellules T, ce qui permet une activation efficace de ces cellules (Watts et al. 2007; Yamashiro 2012). En effet, un défaut d'expression des molécules impliquées dans le réarrangement du cytosquelette d'actine, comme la molécule WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), peut entraîner une altération de la capacité des DC à stimuler les cellules T, en inhibant la formation des synapses immunologiques (Bouma et al. 2011). WASP est une molécule impliquée dans la polymérisation de l'actine au sein des cellules myéloïdes. Elle a été identifiée comme étant déficiente dans le syndrome Wiskott-Aldrich qui entraîne une immunodéficience chez les personnes atteintes de cette pathologie (Derry et al. 1994). Ces personnes présentent également une organisation anormale du cytosquelette et une absence de formation des podosomes dans les cellules myéloïdes, ce qui altère la migration de ces cellules (Siobhan Burns et al. 2004). LIME, comme WASP, en interagissant avec le cytosquelette, pourrait être impliquée dans la formation des synapses immunologiques nécessaires à l'activation des cellules T par les DC. De plus, comme je l'ai décrit précédemment, LIME est associée aux cellules ciliées. Or, ces cellules présentent de fortes similitudes morphologiques avec les synapses immunologiques. La formation des cellules ciliées nécessite un remodelage particulier du cytosquelette impliquant, la translocation du centrosome au niveau de la membrane, ce qui est également nécessaire à la formation de la synapse immunologique (Griffiths et al. 2010). L'implication de LIME dans les fonctions du cytosquelette pourrait donc expliquer sa forte expression dans les cellules ciliées et son rôle dans les DC. Par la suite, nous pourrions tenter de déterminer si LIME est réellement impliquée dans la formation de synapses immunologiques entre les DC et les cellules T en étudiant, par des expériences de time-lapse, leur interaction lorsque LIME est inhibée.

En perspective, l'identification des partenaires moléculaires de LIME semble être une étape importante pour essayer de définir la fonction exacte de LIME dans le cytosquelette. Ceci contribuerait à déterminer si elle participe effectivement à la formation de protrusions membranaires telles que les dendrites, les lamellipodes, les filopodes ou encore les synapses immunologiques. Ces protrusions font intervenir différentes molécules du cytosquelette et sont impliquées dans la migration ainsi que dans la fonction des DC. Pour faciliter les futures investigations sur la molécule LIME, il semble nécessaire de générer de nouveaux outils tels qu'un anticorps anti-LIME, ce qui faciliterait l'étude précise de sa localisation cellulaire dans des systèmes plus physiologiques, ainsi que l'étude de ses partenaires moléculaires par des expériences d'immunoprécipitation. L'étude de la fonction de LIME serait également facilitée

par l'utilisation d'un rat déficient pour cette molécule, notamment pour déterminer si l'absence de LIME influence l'organisation du cytosquelette des DC et confirmer le rôle de LIME dans la fonction de ces cellules. Ainsi, nous pourrions tenter d'identifier les mécanismes par lesquels LIME intervient dans l'activation des cellules T. Enfin, LIME étant fortement exprimée chez les animaux en rejet chronique, il serait intéressant d'évaluer si elle est impliquée dans l'induction de ce rejet en observant l'effet de son inhibition sur l'apparition du rejet chronique.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence une nouvelle molécule impliquée dans la capacité des DC à stimuler les cellules T et qui pourrait agir en interagissant avec le cytosquelette de la cellule. Cependant, de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour déterminer la fonction exacte de LIME et son implication dans le rejet. Les premiers résultats obtenus suggèrent que LIME pourrait être une cible thérapeutique afin de réguler l'activation des cellules T par les DC et de moduler la réponse immunitaire en transplantation, mais également dans d'autres pathologies comme le cancer ou les infections.

Schéma bilan

Notre équipe a montré qu'un court traitement immunosuppresseur permet l'induction d'une tolérance à long terme d'allogreffes cardiaques chez le rat. L'objectif de nos travaux a été de caractériser les mécanismes impliqués dans la tolérance de ce modèle. La figure 13 ci-dessous illustre l'ensemble des mécanismes régulateurs mis en évidence par les études réalisées précédemment ainsi que les nouveaux mécanismes observés au cours de cette thèse.

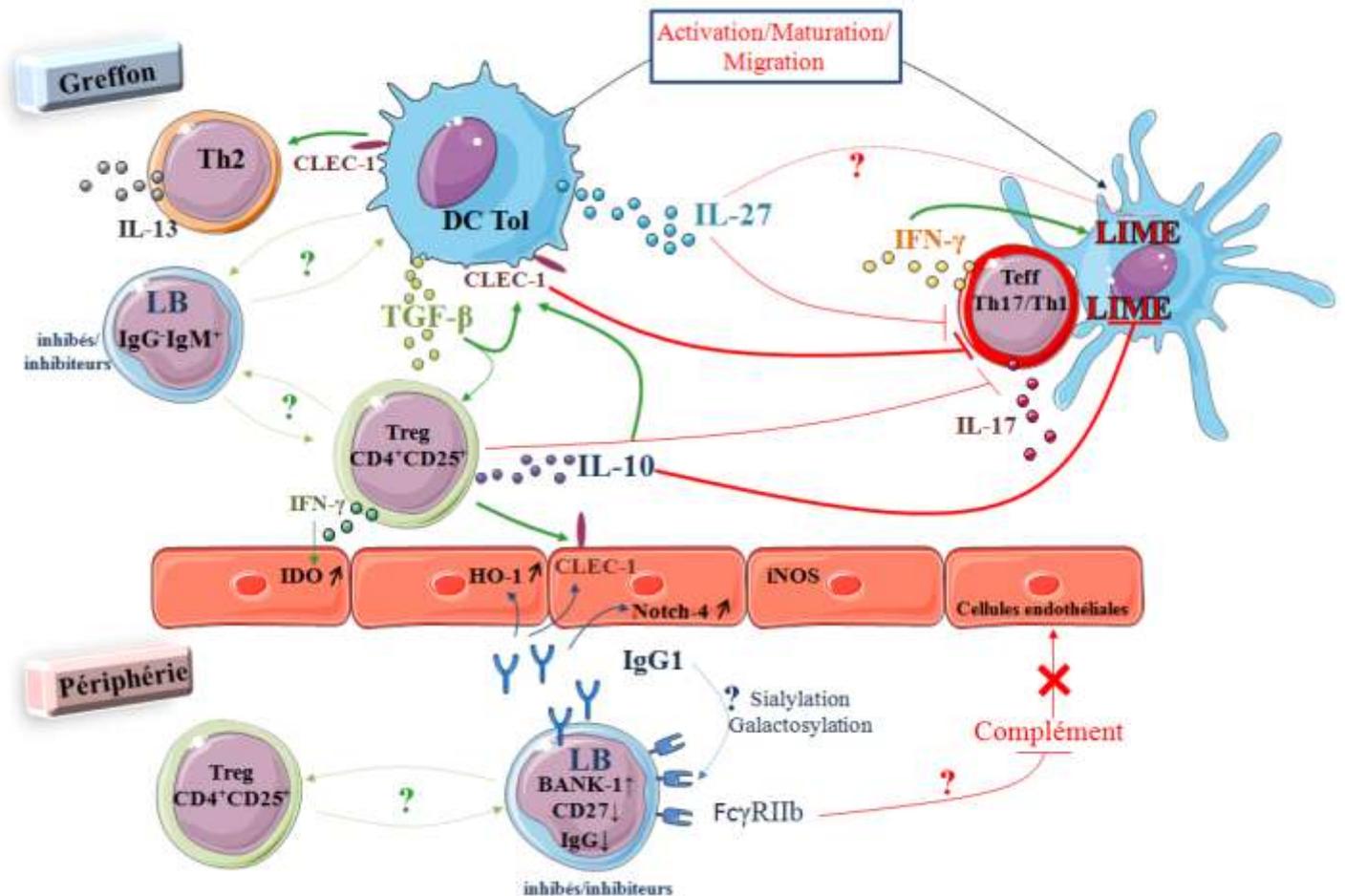


Figure 13: Schéma récapitulatif des principaux mécanismes observés dans le modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat

Les différentes études préalables ont permis de montrer que cette tolérance est caractérisée par une accumulation de cellules Treg $CD4^+CD25^+$ au sein du greffon et de la rate des animaux tolérants ainsi que par l'expression de molécules protectrices telles que iNOS, IDO et HO-1 par les cellules endothéliales du greffon (J.-M. Heslan et al. 2005). Par la suite, notre équipe a montré que le transfert de cellules Treg $CD4^+CD25^+$ provenant de rats tolérants à un second receveur syngénique permet d'induire une tolérance à l'allogreffe cardiaque chez ces animaux. Cette tolérance est également associée à l'infiltration des

greffons par des Treg CD4⁺CD25⁺ et à l'expression d'IDO par les cellules endothéliales. L'étude *in vitro* montre que les Treg CD4⁺CD25⁺ des animaux tolérants induisent l'expression d'IDO par des cellules du donneur, et ce via la production d'IFN γ . De plus, la neutralisation *in vivo* de l'IFN γ ou d'IDO entraîne une inhibition du transfert de la tolérance par les Treg. Ainsi, les Treg semblent jouer un rôle important dans la tolérance, via la production d'IFN γ et l'induction d'IDO (P Thebault et al. 2007).

La tolérance induite par le LF15-0195 se traduit également par la présence de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 ou encore le TGF- β et l'IL-27, produites par les cellules myéloïdes. Notre équipe a montré que le transfert de la tolérance par les Treg est inhibé par l'injection d'un anticorps bloquant le TGF- β , soulignant l'importance de cette cytokine dans la tolérance (Le Texier et al. 2012). En effet dans la littérature, le TGF- β a été décrit comme participant à l'induction de Treg ainsi qu'à leur fonction suppressive (Regateiro et al. 2011). La cytokine régulatrice IL-27 a quant à elle été décrite comme inhibant la différenciation des cellules effectrices Th1, Th2 et Th17 et altérant la capacité stimulatrice des DC (Karakhanova et al. 2011). Notre équipe a pu mettre en évidence le rôle régulateur de l'IL-27 en transplantation, en montrant que l'injection d'un AAV codant pour cette cytokine associée à un court traitement immunosuppresseur permet de prolonger la survie des allogreffes (Le Texier et al. 2012).

Notre équipe a également mis en évidence la présence d'une autre molécule régulatrice, le récepteur lectine "like" de type C, CLEC-1, exprimé par les cellules endothéliales et les DC des greffons Tol. Ce récepteur est induit par les Treg et les molécules immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- β . Il permet d'inhiber la réponse effectrice TH17 et de favoriser les réponses TH2 et Treg. En effet, l'étude de ce récepteur a permis de montrer que son inhibition dans des DC entraîne, lors de MLR, une augmentation de la prolifération des cellules effectrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ et de la production d'IL17 ainsi qu'une inhibition de la production d'IL-13 et de la prolifération des cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. De plus, la forte expression de CLEC-1 dans les greffons Tol est associée à une inhibition de l'expression des transcrits de l'IL-17, comparée à celle observée dans des greffons développant un rejet chronique dans lesquels CLEC-1 est très faiblement exprimée (P Thebault et al. 2009).

Les travaux de cette thèse ont permis de mettre en évidence différents mécanismes pouvant également contribuer à la tolérance dans ce modèle. En effet, nous avons montré l'existence d'une nouvelle molécule LIME qui est exprimée par les DC suite à une activation,

et inhibée par des facteurs immunorégulateurs tels que l'IL-10. Cette molécule semble importante pour la capacité stimulatrice des DC. Notre étude révèle que LIME est inhibée dans les greffons tolérés. Nous supposons que cette inhibition pourrait être induite par les cytokines immunorégulatrices (TGF- β , IL-27, IL-10) ou par les Treg. Ces facteurs immunorégulateurs, qui sont également à l'origine de l'expression de CLEC-1 par les DC, pourraient donc conférer un statut tolérogène aux DC dans le greffon des animaux Tol, en induisant l'expression de CLEC-1 et en inhibant celle de LIME. En effet, l'inhibition de LIME pourrait contribuer à l'induction ou au maintien de la tolérance en régulant la capacité des DC à activer les cellules T.

D'autre part, nous avons observé la présence dans le greffon de "clusters" de LB inhibés qui produisent peu ou pas d'anticorps, ainsi qu'une déviation de la réponse anticorps vers l'isotype IgG1 (TH2) en périphérie. Notre étude montre également que les anticorps présents dans le sang des rats tolérants favorisent l'expression de molécules protectrices (HO-1, Notch4, CLEC-1) par les cellules endothéliales du greffon. Ces anticorps peuvent donc, avec les Treg qui induisent IDO et CLEC-1, participer à la protection de ces cellules. De façon intéressante, nous n'avons pas observé de dépôt de C4 sur le greffon suggérant l'absence d'activation du complément. De plus, les LB des rats tolérants présentent un profil inhibé avec une faible expression de CD27 et une accumulation des transcripts codant la molécule BANK-1, associé à une forte expression du ratio des transcripts codant pour les récepteurs inhibiteurs et activateurs Fc γ RIIb/Fc γ RIIa. Enfin, nos résultats montrent la présence, dans la rate des animaux tolérants, de LB régulateurs capables de transférer la tolérance.

À partir de ces données, plusieurs hypothèses que j'ai évoquées précédemment peuvent être émises et pourront être testées par la suite. En effet, nous pourrions étudier si les Treg sont à l'origine des Breg ou de l'inhibition des LB. À l'inverse, les LB pourraient participer à l'induction des Treg comme il est suggéré dans la littérature (P. Reichardt et al. 2007; N. A. Carter et al. 2011). Les DC de ce modèle de tolérance qui semblent présenter un phénotype tolérogène (CLEC-1⁺, LIME⁻, IL27⁺, TGF- β ⁺) pourraient également induire l'inhibition des LB ou permettre de générer des Breg (L. Qian et al. 2012). Mais comme le décrit Morva et ses collègues, les LB pourraient eux-mêmes être à l'origine de la régulation des DC en inhibant leur maturation et leur fonction (Morva et al. 2012). Ils pourraient même être à l'origine de l'inhibition de l'expression de la molécule LIME et contribuer à la régulation de l'activation des cellules T par les DC. Enfin, la fonction protectrice des

anticorps que nous avons observée chez les rats tolérants pourrait être due à la présence de sialylations ou de galactosylations sur leur fragment Fc. Ces groupements glycanes peuvent réguler les propriétés inflammatoires des anticorps via la fixation aux récepteurs FcγRIIb (Bruhns et al. 2003; Anthony, Wermeling, et al. 2008) qui peut induire un signal tolérogène aux cellules ou, en association avec Dectin-1, entraîner l'inhibition des effets pro-inflammatoires du complément (Karsten et al. 2012).

La tolérance dans ce modèle semble être le résultat d'une accumulation de mécanismes régulateurs actifs qui créent un environnement protecteur au sein du greffon. La connexion entre ces différents mécanismes reste à définir afin de déterminer quels sont ceux qui peuvent être déclencheurs. Ceci permettrait de définir quelle stratégie thérapeutique serait la plus pertinente à utiliser chez les patients transplantés pour induire une tolérance à long terme.

Bibliographie

- Aaltonen, J. et al., 1994. An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21. *Nature genetics*, 8(1), p.83-87.
- Aerts, N.E. et al., 2008. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cellular immunology*, 251(2), p.109-115.
- Afzali, B., Lechler, R I & Hernandez-Fuentes, M P, 2007. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*, 69(6), p.545-556.
- Agrawal, S., Gupta, S. & Agrawal, A., 2010. Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming Th17, cytotoxic CD8 T and B cell responses. *PloS one*, 5(10), p.e13418.
- Aiba, Y. et al., 2006. BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. *Immunity*, 24(3), p.259-268.
- Akimova, T. et al., 2011. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PloS one*, 6(8), p.e24226.
- Aliberti, J. et al., 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nature immunology*, 1(1), p.83-87.
- Allen, C.D.C. et al., 2007. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5811), p.528-531.
- Aloisi, F. & Pujol-Borrell, R., 2006. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology*, 6(3), p.205-217.
- Amarnath, S., Chen, Hao, et al., 2011. Host-based Th2 cell therapy for prolongation of cardiac allograft viability. *PloS one*, 6(4), p.e18885.
- Amarnath, S., Mangus, C.W., et al., 2011. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Science translational medicine*, 3(111), p.111ra120.
- Anderson, G., Partington, K.M. & Jenkinson, E.J., 1998. Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(12), p.6599-6603.
- Anderson, M.S. et al., 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5597), p.1395-1401.
- Anthony, R.M., Wermeling, F., et al., 2008. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), p.19571-19578.
- Anthony, R.M., Nimmerjahn, F., et al., 2008. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5874), p.373-376.
- Antonysamy, M.A. et al., 1999. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(1), p.577-584.
- Apetoh, L. et al., 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nature immunology*, 11(9), p.854-861.
- Aschenbrenner, K. et al., 2007. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nature immunology*, 8(4), p.351-358.
- Ashour, H.M. & Niederkorn, J.Y., 2006. Peripheral tolerance via the anterior chamber of the eye: role of B cells in MHC class I and II antigen presentation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(10), p.5950-5957.

- Awasthi, A. et al., 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature immunology*, 8(12), p.1380-1389.
- Azuma, H. et al., 1996. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), p.12439-12444.
- Baan, C.C. et al., 2005. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation*, 80(1), p.110-117.
- Baan, C.C., Dijke, I.E. & Weimar, W., 2009. Regulatory T cells in alloreactivity after clinical heart transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 14(5), p.577-582.
- Bach, F.H. et al., 1997. Accommodation of vascularized xenografts: expression of « protective genes » by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nature medicine*, 3(2), p.196-204.
- Baddoura, F.K. et al., 2005. Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(3), p.510-516.
- Badell, I.R. et al., 2010. LFA-1-specific therapy prolongs allograft survival in rhesus macaques. *The Journal of clinical investigation*, 120(12), p.4520-4531.
- Baliga, P. et al., 1994. CTLA4Ig prolongs allograft survival while suppressing cell-mediated immunity. *Transplantation*, 58(10), p.1082-1090.
- Ballet, C. et al., 2009. Indirect CD4+ TH1 response, antidonor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long-term recipients conditioned by donor antigens priming. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(4), p.697-708.
- Banchereau, J. et al., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18, p.767-811.
- Banchereau, J. & Steinman, R M, 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), p.245-252.
- Bannert, N. et al., 2003. PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits. *The Journal of biological chemistry*, 278(43), p.42190-42199.
- Bardel, E. et al., 2008. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(10), p.6898-6905.
- Bashuda, H. et al., 2005. Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *The Journal of clinical investigation*, 115(7), p.1896-1902.
- Battaglia, M. et al., 2006. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes*, 55(1), p.40-49.
- Batten, M. et al., 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology*, 7(9), p.929-936.
- Bayry, J. et al., 2005. Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(1), p.15-20.
- Beauchamp, P.J., Galle, P.C. & Blasco, L., 1984. Human sperm velocity and postinsemination cervical mucus test in the evaluation of the infertile couple. *Archives of Andrology*, 13(2-3), p.107-112.
- Belkaid, Y. et al., 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*, 420(6915), p.502-507.
- Benichou, G, 1999. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 4, p.D476-480.

- Bennett, C.L. et al., 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*, 27(1), p.20-21.
- Bennett, W.M. et al., 1996. Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation. *Transplantation proceedings*, 28(4), p.2100-2103.
- Benoist, C & Mathis, D, 1989. Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell*, 58(6), p.1027-1033.
- Bensinger, S.J. et al., 2001. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*, 194(4), p.427-438.
- Benson, M.J. et al., 2008. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(6), p.3655-3659.
- Benvenuti, F., Hugues, S. & Amigorena, Sebastian, 2005. [Dendritic cell cytoskeleton mobilization to enhance antigen presentation]. *Médecine sciences: M/S*, 21(1), p.13-15.
- Bettelli, E. et al., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), p.235-238.
- Beverly, B. et al., 1992. Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *International immunology*, 4(6), p.661-671.
- Billingham, R.E., BRENT, L. & MEDAWAR, P.B., 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, 172(4379), p.603-606.
- Bingaman, A.W. & Farber, D.L., 2004. Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 4(6), p.846-852.
- Blair, P.A. et al., 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(1), p.129-140.
- Bloom, D.D. et al., 2008. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells increase de novo in kidney transplant patients after immunodepletion with Campath-1H. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(4), p.793-802.
- Bodor, J. et al., 2001. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *Journal of leukocyte biology*, 69(6), p.1053-1059.
- Bölling, T. et al., 2011. Retrospective, monocentric analysis of late effects after Total Body Irradiation (TBI) in adults. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]*, 187(5), p.311-315.
- Bonifaz, L. et al., 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 196(12), p.1627-1638.
- Bopp, T. et al., 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), p.1303-1310.
- Borsellino, G. et al., 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), p.1225-1232.
- Bouma, G. et al., 2011. Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. *Blood*, 118(9), p.2492-2501.

- Bouneaud, C., Kourilsky, P. & Bousso, P., 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*, 13(6), p.829-840.
- Brandt, C. et al., 2010. Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(7), p.607-613.
- Braudeau, Cécile et al., 2007. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 20(10), p.845-855.
- Braun, M.Y. et al., 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(1), p.177-182.
- Brouard, Sophie et al., 2007. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), p.15448-15453.
- Brown, K., Sacks, S.H. & Wong, W., 2011. Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *European journal of immunology*, 41(1), p.89-96.
- Bruder, D. et al., 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *European journal of immunology*, 34(3), p.623-630.
- Bruhns, P. et al., 2003. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity*, 18(4), p.573-581.
- Brunkow, M.E. et al., 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*, 27(1), p.68-73.
- Brunner, T. et al., 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, 373(6513), p.441-444.
- Buckwalter, M.R. & Albert, M.L., 2009. Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Current biology: CB*, 19(9), p.R355-361.
- Burchill, M.A. et al., 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(1), p.280-290.
- Burns, S et al., 2001. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*, 98(4), p.1142-1149.
- Burns, Siobhan et al., 2004. Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood*, 104(12), p.3454-3462.
- Calne, R. et al., 1999. Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation*, 68(10), p.1613-1616.
- Calne, R. et al., 1998. Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet*, 351(9117), p.1701-1702.
- Caminschi, I. et al., 2012. Antibody responses initiated by Clec9A-bearing dendritic cells in normal and Batf3(-/-) mice. *Molecular immunology*, 50(1-2), p.9-17.
- Carrier, Y. et al., 2007. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(1), p.179-185.

- Carter, N.A. et al., 2011. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(10), p.5569-5579.
- Carter, N.A., Rosser, E.C. & Mauri, C., 2012. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy*, 14(1), p.R32.
- Castiello, L. et al., 2011. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 60(4), p.457-466.
- Caux, C. et al., 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *The Journal of experimental medicine*, 184(2), p.695-706.
- Cella, M. et al., 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine*, 5(8), p.919-923.
- Celli, S., Albert, M.L. & Bousso, Philippe, 2011. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nature medicine*, 17(6), p.744-749.
- Chan, T.D. et al., 2009. Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(5), p.3139-3149.
- Chang, A.T. & Platt, J.L., 2009. The role of antibodies in transplantation. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)*, 23(4), p.191-198.
- Chang, C.C. et al., 2002. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nature immunology*, 3(3), p.237-243.
- Chaturvedi, V. et al., 2011. Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(12), p.6661-6666.
- Chen, W. et al., 2003. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(4), p.1846-1853.
- Chen, Y et al., 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5176), p.1237-1240.
- Chen, Yingxin et al., 2012. Intrastriatal B-cell administration limits infarct size after stroke in B-cell deficient mice. *Metabolic brain disease*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22618587> [Consulté juillet 30, 2012].
- Cheng, S.-L. et al., 2007. Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *Journal of biomedical science*, 14(1), p.87-105.
- Chiffolleau, E et al., 2002. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2(8), p.745-757.
- Chiffolleau, E. et al., 2002. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(10), p.5058-5069.
- Chin, J.T. et al., 2011. A novel cardioprotective agent in cardiac transplantation: metformin activation of AMP-activated protein kinase decreases acute ischemia-reperfusion injury and chronic rejection. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(4), p.423-432.
- Cimmino, L. et al., 2008. Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(4), p.2338-2347.

- Cobbold, S.P. et al., 2004. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(10), p.6003-6010.
- Codarri, L. et al., 2007. Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4+CD25+CD45RO+IL-7Ralphahigh cell population in solid organ transplant recipients. *The Journal of experimental medicine*, 204(7), p.1533-1541.
- Collison, L.W. et al., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), p.566-569.
- Colovai, Adriana I et al., 2003. Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Human immunology*, 64(1), p.31-37.
- Colvin, Robert B & Smith, R Neal, 2005. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Reviews. Immunology*, 5(10), p.807-817.
- Conlon, T.M. et al., 2012. Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(6), p.2643-2652.
- Coombes, J.L. et al., 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*, 204(8), p.1757-1764.
- Cortesini, Raffaello et al., 2002. Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells. *Human immunology*, 63(11), p.1010-1018.
- Cosmi, L. et al., 2003. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood*, 102(12), p.4107-4114.
- Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J., 2002. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Current opinion in immunology*, 14(6), p.771-778.
- Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J., 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30(5), p.626-635.
- Cyster, J G, Hartley, S B & Goodnow, C C, 1994. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature*, 371(6496), p.389-395.
- D'Elios, M.M. et al., 1997. Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney international*, 51(6), p.1876-1884.
- Dardalhon, V. et al., 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology*, 9(12), p.1347-1355.
- Darrasse-Jèze, G. et al., 2009. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 206(9), p.1853-1862.
- Delamarre, L. & Mellman, Ira, 2011. Harnessing dendritic cells for immunotherapy. *Seminars in immunology*, 23(1), p.2-11.
- Delikouras, A. et al., 2003. Endothelial cell cytoprotection induced in vitro by allo- or xenoreactive antibodies is mediated by signaling through adenosine A2 receptors. *European journal of immunology*, 33(11), p.3127-3135.
- Demirkiran, A. et al., 2008. Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation*, 85(6), p.783-789.
- Deng, Shaoping et al., 2007. Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), p.6028-6032.

- Denk, A., Wirth, T. & Baumann, B., 2000. NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine & growth factor reviews*, 11(4), p.303-320.
- DePaz, H.A. et al., 2003. Immature rat myeloid dendritic cells generated in low-dose granulocyte macrophage-colony stimulating factor prolong donor-specific rat cardiac allograft survival. *Transplantation*, 75(4), p.521-528.
- Derbinski, J. et al., 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *The Journal of experimental medicine*, 202(1), p.33-45.
- Derry, J.M., Ochs, H.D. & Francke, U., 1994. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, 78(4), p.635-644.
- Dharnidharka, V.R., Stablein, D.M. & Harmon, W.E., 2004. Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 4(3), p.384-389.
- Dhodapkar, M V et al., 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 193(2), p.233-238.
- Dhodapkar, Madhav V & Steinman, Ralph M, 2002. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood*, 100(1), p.174-177.
- Dickneite, G. et al., 1986. The influence of (+/-)-15-deoxyspergualin on experimental transplantation and its immunopharmacological mode of action. *Behring Institute Mitteilungen*, (80), p.93-102.
- Ding, Q. et al., 2011. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(9), p.3645-3656.
- Du, W. et al., 2006. TGF-beta signaling is required for the function of insulin-reactive T regulatory cells. *The Journal of clinical investigation*, 116(5), p.1360-1370.
- Ducoroy, P et al., 2001. The immunosuppressant LF 15-0195 prevents collagen-induced arthritis with IL-10 down-regulation. *Transplantation proceedings*, 33(3), p.2142-2145.
- Ducoroy, Patrick et al., 2003. LF 15-0195 immunosuppressive agent enhances activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level. *Blood*, 101(1), p.194-201.
- Duddy, M. et al., 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), p.6092-6099.
- Duplan, V. et al., 2006. LF 15-0195 treatment protects against central nervous system autoimmunity by favoring the development of Foxp3-expressing regulatory CD4 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(2), p.839-847.
- Ellis, D. et al., 2007. Renal transplantation in children managed with lymphocyte depleting agents and low-dose maintenance tacrolimus monotherapy. *Transplantation*, 83(12), p.1563-1570.
- Eschbach, C. et al., 2011. Efficient generation of B lymphocytes by recognition of self-antigens. *European journal of immunology*, 41(8), p.2397-2403.
- Essery, G., Feldmann, M. & Lamb, J.R., 1988. Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunology*, 64(3), p.413-417.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A., 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420(6916), p.629-635.
- Evans, J.G. et al., 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(12), p.7868-7878.

- Eyerich, S. et al., 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation*, 119(12), p.3573-3585.
- Fahlén, L. et al., 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*, 201(5), p.737-746.
- Fallarino, F. et al., 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology*, 4(12), p.1206-1212.
- Fangmann, J., Dalchau, R. & Fabre, J.W., 1992. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *The Journal of Experimental Medicine*, 175(6), p.1521-1529.
- Fantini, M.C. et al., 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(9), p.5149-5153.
- Fazilleau, N. et al., 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*, 30(3), p.324-335.
- Fehr, T. et al., 2008. Rapid deletional peripheral CD8 T cell tolerance induced by allogeneic bone marrow: role of donor class II MHC and B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(6), p.4371-4380.
- Feng, X. et al., 2008. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. *Blood*, 111(7), p.3675-3683.
- Fife, B.T. et al., 2009. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nature immunology*, 10(11), p.1185-1192.
- Fillatreau, S. et al., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology*, 3(10), p.944-950.
- Fink, P.J. & Bevan, M.J., 1978. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *The Journal of experimental medicine*, 148(3), p.766-775.
- Fischer, K. et al., 2005. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*, 105(7), p.2828-2835.
- Fitzgerald, D.C. et al., 2007. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nature immunology*, 8(12), p.1372-1379.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4), p.330-336.
- Ford McIntyre, M.S. et al., 2008. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(4), p.2271-2275.
- Fourtounas, C. et al., 2010. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. *American journal of nephrology*, 32(1), p.1-9.
- Frauwirth, K.A. & Thompson, Craig B, 2002. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *The Journal of clinical investigation*, 109(3), p.295-299.
- Frey, A.B. & Rao, T.D., 1999. NKT cell cytokine imbalance in murine diabetes mellitus. *Autoimmunity*, 29(3), p.201-214.
- Fu, F. et al., 1996. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation*, 62(5), p.659-665.
- Gao, W et al., 2007. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *American journal of transplantation: official journal of*

- the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(7), p.1722-1732.
- Garside, P. et al., 1998. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5373), p.96-99.
- Gaudin, E., Rosado, M., et al., 2004. B-cell homeostasis, competition, resources, and positive selection by self-antigens. *Immunological reviews*, 197, p.102-115.
- Gaudin, E., Hao, Y., et al., 2004. Positive selection of B cells expressing low densities of self-reactive BCRs. *The Journal of experimental medicine*, 199(6), p.843-853.
- Gauthier, L. et al., 2002. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), p.13014-13019.
- Gautreau, L. et al., 2011. Modulation of regulatory T cell-Th17 balance by plasmacytoid dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 90(3), p.521-527.
- Gavanescu, I. et al., 2007. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), p.4583-4587.
- Gay, D. et al., 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 177(4), p.999-1008.
- Gershon, R.K. et al., 1972. Suppressor T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 108(3), p.586-590.
- Gershon, R.K. & Kondo, K., 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5), p.723-737.
- Gershon, R.K. & Kondo, K., 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 21(6), p.903-914.
- Gething, M.J. & Sambrook, J., 1992. Protein folding in the cell. *Nature*, 355(6355), p.33-45.
- Giannoukakis, N. & Trucco, M., 2012. A role for tolerogenic dendritic cell-induced B-regulatory cells in type 1 diabetes mellitus. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 19(4), p.279-287.
- Gingras, A.R. et al., 2010. Central region of talin has a unique fold that binds vinculin and actin. *The Journal of biological chemistry*, 285(38), p.29577-29587.
- Glysing-Jensen, T. et al., 1997. Chronic blockade of CD28-B7-mediated T-cell costimulation by CTLA4Ig reduces intimal thickening in MHC class I and II incompatible mouse heart allografts. *Transplantation*, 64(12), p.1641-1645.
- Goldrath, A.W. & Bevan, M.J., 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, 402(6759), p.255-262.
- Goldstein, D.R., 2006. Toll like receptors and acute allograft rejection. *Transplant Immunology*, 17(1), p.11-15.
- Gondek, D.C. et al., 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(4), p.1783-1786.
- Goodnow, Christopher C et al., 2010. Control systems and decision making for antibody production. *Nature immunology*, 11(8), p.681-688.
- Gornik, I. et al., 1999. Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis. *Clinical biochemistry*, 32(8), p.605-608.

- Gotot, J. et al., 2012. Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), p.10468-10473.
- Gratwohl, A. et al., 2008. H-Y as a minor histocompatibility antigen in kidney transplantation: a retrospective cohort study. *Lancet*, 372(9632), p.49-53.
- Green, E.A. et al., 2003. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), p.10878-10883.
- Greenwald, R.J. et al., 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*, 14(2), p.145-155.
- Grewal, I.S. & Flavell, R A, 1996. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunology today*, 17(9), p.410-414.
- Griesemer, A.D., Sorenson, E.C. & Hardy, M.A., 2010. The role of the thymus in tolerance. *Transplantation*, 90(5), p.465-474.
- Griffiths, G.M., Tsun, A. & Stinchcombe, J.C., 2010. The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *The Journal of cell biology*, 189(3), p.399-406.
- Le Gros, G. et al., 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine*, 172(3), p.921-929.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., et al., 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9), p.2840-2848.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., et al., 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21(4), p.589-601.
- Groux, H et al., 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652), p.737-742.
- Guillonneau, C. et al., 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(4), p.1096-1106.
- Halloran, P.F., 2004. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 351(26), p.2715-2729.
- Hampe, C.S., 2012. Protective role of anti-idiotypic antibodies in autoimmunity--lessons for type 1 diabetes. *Autoimmunity*, 45(4), p.320-331.
- Hara, M. et al., 2001. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(6), p.3789-3796.
- Haribhai, D. et al., 2011. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity*, 35(1), p.109-122.
- Haririan, A. et al., 2009. The impact of c4d pattern and donor-specific antibody on graft survival in recipients requiring indication renal allograft biopsy. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(12), p.2758-2767.
- Hartley, S B et al., 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell*, 72(3), p.325-335.
- Haspot, F. et al., 2005. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *American journal of transplantation:*

- official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(10), p.2339-2348.
- Heeger, P S et al., 1999. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(4), p.2267-2275.
- Hegazy, A.N. et al., 2010. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity*, 32(1), p.116-128.
- Heidt, S. et al., 2012. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naïve B cells. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(7), p.1784-1792.
- van Helden, S.F.G. et al., 2006. A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(3), p.1567-1574.
- Helft, J. et al., 2010. Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunological reviews*, 234(1), p.55-75.
- Heslan, J.M. et al., 2006. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation*, 82(9), p.1185-1193.
- Heslan, J.-M. et al., 2005. Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vbeta7-TCR rearrangements in tolerated allografts. *Transplantation*, 80(10), p.1476-1484.
- Hester, J et al., 2012. Low-dose rapamycin treatment increases the ability of human regulatory T cells to inhibit transplant arteriosclerosis in vivo. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(8), p.2008-2016.
- Hill, M et al., 2011. Cell Therapy With Autologous Tolerogenic Dendritic Cells Induces Allograft Tolerance Through IFN- γ and EB13. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21794083> [Consulté septembre 27, 2011].
- Hill, Marcelo, Tanguy-Royer, S., et al., 2007. IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *European journal of immunology*, 37(11), p.3054-3062.
- Hill, Marcelo, Zagani, R., et al., 2007. Nitric oxide and indoleamine 2,3-dioxygenase mediate CTLA4Ig-induced survival in heart allografts in rats. *Transplantation*, 84(8), p.1060-1063.
- Hippen, B.E. et al., 2005. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(9), p.2248-2252.
- Hogquist, K.A. & Bevan, M.J., 1996. The nature of the peptide/MHC ligand involved in positive selection. *Seminars in immunology*, 8(2), p.63-68.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, Shimon, 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), p.1057-1061.
- Hsieh, C.-S., Lee, H.-M. & Lio, C.-W.J., 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature reviews. Immunology*, 12(3), p.157-167.
- Huang, C.-T. et al., 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21(4), p.503-513.

- Hussaarts, L. et al., 2011. Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 128(4), p.733-739.
- Illarregui, J.M. et al., 2009. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nature immunology*, 10(9), p.981-991.
- Illigens, B.M. et al., 2009. Dual effects of the alloresponse by Th1 and Th2 cells on acute and chronic rejection of allotransplants. *European journal of immunology*, 39(11), p.3000-3009.
- Inaba, K et al., 1998. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(11), p.2163-2173.
- Ingulli, Elizabeth, 2010. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 25(1), p.61-74.
- Inoue, S. et al., 2006. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer research*, 66(15), p.7741-7747.
- Issa, F. et al., 2010. Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation*, 90(12), p.1321-1327.
- Iwata, Y. et al., 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117(2), p.530-541.
- Janeway, C.A., Jr, 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today*, 13(1), p.11-16.
- Janeway, C.A., Jr & Bottomly, K., 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*, 76(2), p.275-285.
- Jankovic, D. et al., 1998. CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. *The Journal of experimental medicine*, 187(4), p.619-629.
- Jenkins, M.K. & Schwartz, R.H., 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 165(2), p.302-319.
- Jin, Y.-P. et al., 2005. Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. *Transplantation*, 79(3 Suppl), p.S19-21.
- Jindra, P.T. et al., 2006. Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration. *Transplantation*, 82(1 Suppl), p.S33-35.
- Kabelitz, D., Pohl, T. & Pechhold, K., 1993. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunology today*, 14(7), p.338-339.
- Kägi, D. et al., 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 369(6475), p.31-37.
- Kalergis, A.M. & Ravetch, Jeffrey V, 2002. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 195(12), p.1653-1659.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, Jeffrey V, 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5787), p.670-673.
- Karakhanova, S. et al., 2011. IL-27 renders DC immunosuppressive by induction of B7-H1. *Journal of leukocyte biology*, 89(6), p.837-845.
- Karczewski, J. et al., 2008. Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplantation proceedings*, 40(10), p.3390-3392.

- Karsten, C.M. et al., 2012. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nature medicine*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922409> [Consulté septembre 10, 2012].
- Kasiske, B.L. et al., 2004. Cancer after kidney transplantation in the United States. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 4(6), p.905-913.
- Katz, S.I., Parker, D. & Turk, J.L., 1974. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature*, 251(5475), p.550-551.
- Kessel, A. et al., 2012. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmunity reviews*, 11(9), p.670-677.
- Kingsley, Cherry I et al., 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(3), p.1080-1086.
- Kitchens, W.H. et al., 2012. Combined costimulatory and leukocyte functional antigen-1 blockade prevents transplant rejection mediated by heterologous immune memory alloresponses. *Transplantation*, 93(10), p.997-1005.
- Klein, U. et al., 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology*, 7(7), p.773-782.
- Koch, C.A., Khalpey, Z.I. & Platt, J.L., 2004. Accommodation: preventing injury in transplantation and disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(9), p.5143-5148.
- Komesli, S., Dumas, C. & Dutartre, P., 1999. Analysis of in vivo immunosuppressive and in vitro interaction with constitutive heat shock protein 70 activity of LF08-0299 (Tresperimus) and analogues. *International journal of immunopharmacology*, 21(5), p.349-358.
- Koshiba, T. et al., 2003. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation*, 76(3), p.588-596.
- Kryczek, I. et al., 2006. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(1), p.40-44.
- Kuroda, N. et al., 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(4), p.1862-1870.
- Kurosaki, T., 2010. The study of B cells and antibodies in Japan: a historical perspective. *International immunology*, 22(4), p.217-226.
- Kurosaki, T. et al., 2010. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunological reviews*, 237(1), p.104-116.
- Lämmermann, T. et al., 2009. Cdc42-dependent leading edge coordination is essential for interstitial dendritic cell migration. *Blood*, 113(23), p.5703-5710.
- Land, W G, 2007. Innate immunity-mediated allograft rejection and strategies to prevent it. *Transplantation Proceedings*, 39(3), p.667-672.
- Land, Walter G, 2005a. Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation: An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, 16(4), p.520-539.
- Land, Walter G, 2005b. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation*, 79(5), p.505-514.
- de Lanerolle, P. & Serebryanny, L., 2011. Nuclear actin and myosins: life without filaments. *Nature cell biology*, 13(11), p.1282-1288.

- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F., 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, 106(3), p.263-266.
- Larsen, C.P. et al., 2005. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(3), p.443-453.
- Latchman, Y. et al., 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*, 2(3), p.261-268.
- Lebreton, L. et al., 1999. Structure-immunosuppressive activity relationships of new analogues of 15-deoxyspergualin. 2. Structural modifications of the spermidine moiety. *Journal of medicinal chemistry*, 42(23), p.4749-4763.
- Lee, H.-J. & Kim, K.-W., 2012. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487852> [Consulté juin 25, 2012].
- Lee, H.M. & Hsieh, C.-S., 2009. Rare development of Foxp3⁺ thymocytes in the CD4⁺CD8⁺ subset. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(4), p.2261-2266.
- Lee, K.M. et al., 2012. Anti-CD45RB/Anti-TIM-1-Induced Tolerance Requires Regulatory B Cells. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494812> [Consulté juillet 30, 2012].
- Lee, R.S. et al., 1994. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 179(3), p.865-872.
- Lee, Y.K. et al., 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*, 30(1), p.92-107.
- León, B., López-Bravo, M. & Ardavín, C., 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity*, 26(4), p.519-531.
- Li, A. et al., 2010. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Current Biology: CB*, 20(4), p.339-345.
- Li, B et al., 2001. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *The New England journal of medicine*, 344(13), p.947-954.
- Li, F., Atz, M.E. & Reed, Elaine F, 2009. Human leukocyte antigen antibodies in chronic transplant vasculopathy-mechanisms and pathways. *Current opinion in immunology*, 21(5), p.557-562.
- Liang, B. et al., 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(9), p.5916-5926.
- Limmer, A. et al., 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature medicine*, 6(12), p.1348-1354.
- Lin, H. et al., 1993. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *The Journal of experimental medicine*, 178(5), p.1801-1806.
- Liston, A. et al., 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature immunology*, 4(4), p.350-354.
- Liston, A. et al., 2008. Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), p.11903-11908.

- Liu, C. et al., 2007. B lymphocyte-directed immunotherapy promotes long-term islet allograft survival in nonhuman primates. *Nature medicine*, 13(11), p.1295-1298.
- Liu, W. et al., 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), p.1701-1711.
- Liu, Y et al., 2007. The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation. *Transplantation proceedings*, 39(10), p.3396-3403.
- Liu, Z. et al., 1996. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(5), p.1150-1157.
- Liu, Z. et al., 1998. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *International immunology*, 10(6), p.775-783.
- Long, S.A. & Buckner, J.H., 2008. Combination of rapamycin and IL-2 increases de novo induction of human CD4(+)/CD25(+)/FOXP3(+) T cells. *Journal of autoimmunity*, 30(4), p.293-302.
- Loong, C.-C. et al., 2002. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *The Journal of pathology*, 197(3), p.322-332.
- Lopez, M. et al., 2006. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(10), p.2844-2853.
- Louis, S. et al., 2006. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*, 81(3), p.398-407.
- Lu, K.T. et al., 2011. Functional and epigenetic studies reveal multistep differentiation and plasticity of in vitro-generated and in vivo-derived follicular T helper cells. *Immunity*, 35(4), p.622-632.
- Lu, L et al., 1997. Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation*, 64(12), p.1808-1815.
- Lundy, S.K., 2009. Killer B lymphocytes: the evidence and the potential. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262989> [Consulté août 1, 2012].
- Lutz, M B et al., 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. *European journal of immunology*, 30(7), p.1813-1822.
- Machesky, L.M. & Li, A., 2010. Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Communicative & Integrative Biology*, 3(3), p.263-270.
- Mackay, F. & Schneider, P., 2009. Cracking the BAFF code. *Nature reviews. Immunology*, 9(7), p.491-502.
- MacLennan, I.C.M. et al., 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunological reviews*, 194, p.8-18.
- Malek, T.R. et al., 2008. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *Journal of clinical immunology*, 28(6), p.635-639.
- Manavalan, John S et al., 2004. Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *International immunology*, 16(8), p.1055-1068.
- Mangan, N.E. et al., 2004. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(10), p.6346-6356.
- Mangan, P.R. et al., 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441(7090), p.231-234.

- Mann, M.K. et al., 2007. B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(6), p.3447-3456.
- Marsland, B.J. et al., 2005. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity*, 22(4), p.493-505.
- Martínez-Llordella, M et al., 2007. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(2), p.309-319.
- Matas, A.J. et al., 1994. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation*, 57(6), p.857-859.
- Matsushita, T. et al., 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation*, 118(10), p.3420-3430.
- Mauri, C. et al., 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *The Journal of experimental medicine*, 197(4), p.489-501.
- McClintock, T.S. et al., 2008. Tissue expression patterns identify mouse cilia genes. *Physiological Genomics*, 32(2), p.198-206.
- Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 1(2), p.135-145.
- Mellman, I & Steinman, R M, 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3), p.255-258.
- Mellor, A.L. et al., 2003. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(4), p.1652-1655.
- Menges, M. et al., 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 195(1), p.15-21.
- Min, W.-P. et al., 2003. Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(3), p.1304-1312.
- Minagawa, R. et al., 2004. The critical role of Fas-Fas ligand interaction in donor-specific transfusion-induced tolerance to H-Y antigen. *Transplantation*, 78(6), p.799-806.
- Minamimura, K., Gao, Wenda & Maki, T., 2006. CD4⁺ regulatory T cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(7), p.4125-4132.
- Mizoguchi, A et al., 1997. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *The Journal of experimental medicine*, 186(10), p.1749-1756.
- Mizoguchi, Atsushi et al., 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 16(2), p.219-230.
- Mizoguchi, Atsushi & Bhan, Atul K, 2006. A case for regulatory B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(2), p.705-710.
- Moore, K.W. et al., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19, p.683-765.
- Moraes-Vieira, P.M.M. et al., 2012. GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 142(2), p.117-126.

- Moreau, A et al., 2009. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(9), p.3070-3077.
- Morón, G., Dadaglio, G. & Leclerc, C., 2004. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends in immunology*, 25(2), p.92-97.
- Morris, A. & Möller, G., 1968. Regulation of cellular antibody synthesis effect of adoptively transferred antibody-producing spleen cells on cellular antibody synthesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 101(3), p.439-445.
- Morva, A. et al., 2012. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. *Blood*, 119(1), p.106-114.
- Moulin, V. et al., 2000. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *The Journal of experimental medicine*, 192(4), p.475-482.
- Murphy, K.M. & Reiner, S.L., 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews. Immunology*, 2(12), p.933-944.
- Muthukumar, T. et al., 2005. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *The New England journal of medicine*, 353(22), p.2342-2351.
- Nadazdin, O. et al., 2011. Host alloreactive memory T cells influence tolerance to kidney allografts in nonhuman primates. *Science translational medicine*, 3(86), p.86ra51.
- Nadig, Satish N et al., 2010. In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nature medicine*, 16(7), p.809-813.
- Nakamura, K., Kitani, A & Strober, W, 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine*, 194(5), p.629-644.
- Nakashima, S. et al., 2002. Membrane attack complex contributes to destruction of vascular integrity in acute lung allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(8), p.4620-4627.
- Nankivell, B.J. et al., 2003. The natural history of chronic allograft nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, 349(24), p.2326-2333.
- Navarrete, A.-M. et al., 2011. CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated changes in the expression of endocytic receptors and endocytosis process of human dendritic cells. *Vaccine*, 29(15), p.2649-2652.
- Nemoto, K. et al., 1987. Immunosuppressive activities of 15-deoxyspergualin in animals. *The Journal of antibiotics*, 40(4), p.561-562.
- Neujahr, D.C. et al., 2009. Dynamics of human regulatory T cells in lung lavages of lung transplant recipients. *Transplantation*, 88(4), p.521-527.
- Newell, K.A. et al., 2010. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), p.1836-1847.
- Nickel, P. et al., 2004. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation*, 78(11), p.1640-1646.
- Niedbala, W. et al., 2007. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *European journal of immunology*, 37(11), p.3021-3029.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, Jeffrey V, 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 8(1), p.34-47.

- Nimmerjahn, F. & Ravetch, Jeffrey V, 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24(1), p.19-28.
- Nobile, C. et al., 2008. Cognate CD4⁺ T-cell-dendritic cell interactions induce migration of immature dendritic cells through dissolution of their podosomes. *Blood*, 111(7), p.3579-3590.
- Noh, J. et al., 2012. Allergen-specific responses of CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cells (Bregs) and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions. *Cellular immunology*, 274(1-2), p.109-114.
- Noh, J. et al., 2010. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune network*, 10(6), p.247-249.
- Noh, J. & Noh, G., 2012. Allergen-Specific Responses of CD19^{high} and CD19^{low} B Cells in Non-IgE-mediated Food Allergy of Late Eczematous Reactions in Atopic Dermatitis: Presence of IL-17- and IL-32-producing Regulatory B Cells (Br17 & Br32). *Inflammation & allergy drug targets*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563781> [Consulté juillet 30, 2012].
- Noris, M. et al., 2007. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 18(3), p.1007-1018.
- Nurieva, R. et al., 2009. Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(5), p.2565-2568.
- Nurieva, R. et al., 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448(7152), p.480-483.
- O'Neill, S.K. et al., 2009. Endocytic sequestration of the B cell antigen receptor and toll-like receptor 9 in anergic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), p.6262-6267.
- Obata, F. et al., 2005. Contribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and interferon-γ to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. *Transplant Immunology*, 14(1), p.21-25.
- Obayashi, K., Doi, T. & Koyasu, S., 2007. Dendritic cells suppress IgE production in B cells. *International immunology*, 19(2), p.217-226.
- Ochando, J.C. et al., 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nature immunology*, 7(6), p.652-662.
- Oderup, C. et al., 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*, 118(2), p.240-249.
- Ohki, S. et al., 2001. A highly selective inhibitor of Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, Y-27632, prolongs cardiac allograft survival of the BALB/c-to-C3H/He mouse model. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 20(9), p.956-963.
- Okada, T. et al., 2005. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS biology*, 3(6), p.e150.
- Ono, K. & Lindsey, E.S., 1969. Improved technique of heart transplantation in rats. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 57(2), p.225-229.
- Ortega, C. et al., 2011. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? *Human Reproduction Update*, 17(5), p.684-692.
- Pabón, M.A. et al., 2011. Minor histocompatibility antigens as risk factor for poor prognosis in kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*, 43(9), p.3319-3323.

- Page, E.K., Dar, W.A. & Knechtle, Stuart J, 2012. Tolerogenic therapies in transplantation. *Frontiers in immunology*, 3, p.198.
- Pallier, Annaick 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 International*, 78(5), p.503-513.
- Pandiyan, P. et al., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology*, 8(12), p.1353-1362.
- Parekh, V.V. et al., 2003. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(12), p.5897-5911.
- Parsons, R.F. et al., 2011. Acquisition of humoral transplantation tolerance upon de novo emergence of B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(1), p.614-620.
- Parsons, R.F. et al., 2012. Primary B cell repertoire remodeling to achieve humoral transplantation tolerance. *Seminars in immunology*, 24(2), p.109-114.
- Pathak, S.K. et al., 2012. Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and $\beta 2$ integrins. *The Journal of biological chemistry*, 287(17), p.13731-13742.
- Paus, D. et al., 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 203(4), p.1081-1091.
- Penfield, J.G. et al., 1999. Transplant surgery injury recruits recipient MHC class II-positive leukocytes into the kidney. *Kidney international*, 56(5), p.1759-1769.
- Perry, D.K. et al., 2009. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(1), p.201-209.
- Pflanz, S. et al., 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*, 16(6), p.779-790.
- Piazza, A. et al., 2001. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation*, 71(8), p.1106-1112.
- Picca, C.C. et al., 2006. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunological reviews*, 212, p.74-85.
- Pickens, S.R. et al., 2011. Local expression of interleukin-27 ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 63(8), p.2289-2298.
- Pillai, A.B. et al., 2009. Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood*, 113(18), p.4458-4467.
- Poirier, N et al., 2012. Preclinical Efficacy and Immunological Safety of FR104, an Antagonist Anti-CD28 Monovalent Fab' Antibody. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22759318> [Consulté août 5, 2012].
- Poirier, Nicolas et al., 2010. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Science Translational Medicine*, 2(17), p.17ra10.

- Ponting, C.P. & Russell, R.B., 2000. Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *Journal of Molecular Biology*, 302(5), p.1041-1047.
- Pratschke, Johann et al., 2008. Review of nonimmunological causes for deteriorated graft function and graft loss after transplantation. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 21(6), p.512-522.
- Qian, L. et al., 2012. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcγIIbhi regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood*, 120(3), p.581-591.
- Radic, M.Z. et al., 1993. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *The Journal of experimental medicine*, 177(4), p.1165-1173.
- Rao, D.A. et al., 2008. Interleukin (IL)-1 promotes allogeneic T cell intimal infiltration and IL-17 production in a model of human artery rejection. *The Journal of experimental medicine*, 205(13), p.3145-3158.
- Rathmell, J.C. et al., 1996. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*, 87(2), p.319-329.
- Rathmell, J.C. et al., 1998. Repression of B7.2 on self-reactive B cells is essential to prevent proliferation and allow Fas-mediated deletion by CD4(+) T cells. *The Journal of experimental medicine*, 188(4), p.651-659.
- Ray, A. et al., 2012. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(7), p.3188-3198.
- Regateiro, F.S. et al., 2011. TGF-β in transplantation tolerance. *Current opinion in immunology*, 23(5), p.660-669.
- Regnault, A. et al., 1999. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *The Journal of experimental medicine*, 189(2), p.371-380.
- Reichardt, P. et al., 2007. Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood*, 110(5), p.1519-1529.
- Reis e Sousa, Caetano, 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature reviews. Immunology*, 6(6), p.476-483.
- Ren, X. et al., 2007. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell death and differentiation*, 14(12), p.2076-2084.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F. & Matzinger, P., 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, 393(6684), p.474-478.
- Rifkin, I.R. et al., 2005. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunological reviews*, 204, p.27-42.
- Rizzo, L.V. et al., 1995. Regulation of the interaction between Th1 and Th2 T cell clones to provide help for antibody production in vivo. *European journal of immunology*, 25(3), p.708-716.
- Rocha, P.N. et al., 2003. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunological reviews*, 196, p.51-64.
- Roelen, D.L. et al., 2003. Prolongation of skin graft survival by modulation of the alloimmune response with alternatively activated dendritic cells. *Transplantation*, 76(11), p.1608-1615.
- Roitt, I.M. & Cooke, A., 1987. The role of autoantigen in autoimmunity. *Immunology letters*, 16(3-4), p.259-263.
- Romagnani, S., 2006. Regulation of the T cell response. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 36(11), p.1357-1366.

- Roncarolo, M G et al., 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunological reviews*, 182, p.68-79.
- Roncarolo, M.-G. & Battaglia, M., 2007. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature reviews. Immunology*, 7(8), p.585-598.
- Roncarolo, Maria Grazia et al., 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews*, 212, p.28-50.
- Rossi, B. et al., 2006. Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(2), p.796-803.
- Rouse, B.T., 2007. Regulatory T cells in health and disease. *Journal of internal medicine*, 262(1), p.78-95.
- Rubtsov, Y.P. et al., 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 28(4), p.546-558.
- Sachs, D.H. et al., 2011. Immuno-intervention for the induction of transplantation tolerance through mixed chimerism. *Seminars in immunology*, 23(3), p.165-173.
- Sagoo, P. et al., 2010. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), p.1848-1861.
- Sagoo, P. et al., 2011. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Science Translational Medicine*, 3(83), p.83ra42.
- Saito, M. et al., 2007. A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer cell*, 12(3), p.280-292.
- Sakaguchi, S et al., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(3), p.1151-1164.
- Sakaguchi, Shimon et al., 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*, 10(7), p.490-500.
- Sakaguchi, Shimon, 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*, 22, p.531-562.
- Sakaguchi, Shimon, 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*, 6(4), p.345-352.
- Sánchez-Fructuoso, A. et al., 2007. Effect of the brain-death process on acute rejection in renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, 39(7), p.2214-2216.
- Sánchez-Fueyo, Alberto et al., 2002. Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(5), p.2274-2281.
- Sarris, M. et al., 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity*, 28(3), p.402-413.
- Sato, Katsuaki et al., 2003. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity*, 18(3), p.367-379.
- Sayi, A. et al., 2011. TLR-2-activated B cells suppress Helicobacter-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(2), p.878-890.
- Scallon, B. et al., 2007. Quantitative in vivo comparisons of the Fc gamma receptor-dependent agonist activities of different fucosylation variants of an immunoglobulin G antibody. *International immunopharmacology*, 7(6), p.761-772.

- Scapini, P. et al., 2011. B cell-derived IL-10 suppresses inflammatory disease in Lyn-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41), p.E823-832.
- Schettini, J. & Mukherjee, P., 2008. Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. *Clinical & developmental immunology*, 2008, p.106321.
- Schimpl, A. et al., 2002. IL-2 and autoimmune disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(4-5), p.369-378.
- Schioppa, T. et al., 2011. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), p.10662-10667.
- Schwartz, R.H., 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4961), p.1349-1356.
- Sciammas, R. & Davis, M.M., 2004. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(9), p.5427-5440.
- Segundo, D.S. et al., 2006. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation*, 82(4), p.550-557.
- Sherry, N. et al., 2011. Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protégé study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, 378(9790), p.487-497.
- Shevach, Ethan M, 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30(5), p.636-645.
- Shimizu, Jun et al., 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature immunology*, 3(2), p.135-142.
- Shimizu, K. & Fujii, S., 2008. An adjuvant role of in situ dendritic cells (DCs) in linking innate and adaptive immunity. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, p.6193-6201.
- Shortman, K. & Heath, W.R., 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological reviews*, 234(1), p.18-31.
- Shortman, K. & Naik, S.H., 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews. Immunology*, 7(1), p.19-30.
- Siegal, F.P. et al., 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5421), p.1835-1837.
- Siepert, A. et al., 2012. Permanent CNI Treatment for Prevention of Renal Allograft Rejection in Sensitized Hosts Can Be Replaced by Regulatory T Cells. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(9), p.2384-2394.
- Simon, T., Anegon, Ignacio & Blancou, P., 2011. Heme oxygenase and carbon monoxide as an immunotherapeutic approach in transplantation and cancer. *Immunotherapy*, 3(4 Suppl), p.15-18.
- Sis, B. et al., 2009. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(10), p.2312-2323.
- Skelton, T.S. et al., 2010. Downregulation of RhoA and changes in T cell cytoskeleton correlate with the abrogation of allograft rejection. *Transplant immunology*, 23(4), p.185-193.

- Soares, M.P. et al., 1998. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nature medicine*, 4(9), p.1073-1077.
- Sonoda, K.-H. & Stein-Streilein, J., 2002. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *European journal of immunology*, 32(3), p.848-857.
- Soulillou, J.P. et al., 1984. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation*, 38(1), p.63-67.
- Sozzani, S., 2005. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(6), p.581-592.
- Srivastava, P.K. et al., 1994. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, 39(2), p.93-98.
- Stegall, M.D. et al., 2011. Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(11), p.2405-2413.
- Steinman, Ralph M, Hawiger, D. & Nussenzweig, M.C., 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*, 21, p.685-711.
- Stumhofer, J.S. et al., 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature immunology*, 8(12), p.1363-1371.
- Suchin, E.J. et al., 2001. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(2), p.973-981.
- Sumitran-Holgersson, S., 2008. Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), p.607-613.
- Sun, C.-M. et al., 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine*, 204(8), p.1775-1785.
- Suzuki, K. et al., 2009. Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 206(7), p.1485-1493.
- Swain, S.L. et al., 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 145(11), p.3796-3806.
- Szabo, S.J. et al., 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), p.655-669.
- Takahashi, T et al., 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine*, 192(2), p.303-310.
- Takeda, A. et al., 2011. Current problems of chronic active antibody-mediated rejection. *Clinical transplantation*, 25 Suppl 23, p.2-5.
- Takenouchi, M. et al., 2005. Mechanism of the immunosuppressive effect in vivo of novel immunosuppressive drug beta-SQAG9, which inhibits the response of the CD62L+ T-cell subset. *Transplantation proceedings*, 37(1), p.139-142.
- Takeuchi, T. et al., 1981. A new antitumor antibiotic, spargualin: isolation and antitumor activity. *The Journal of antibiotics*, 34(12), p.1619-1621.
- Talmage, D.W. et al., 1976. Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4225), p.385-388.

- Tatarano, S. et al., 2012. Novel oncogenic function of mesoderm development candidate 1 and its regulation by MiR-574-3p in bladder cancer cell lines. *International journal of oncology*, 40(4), p.951-959.
- Taylor, P.A., Noelle, R J & Blazar, B R, 2001. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *The Journal of experimental medicine*, 193(11), p.1311-1318.
- Terasaki, P.I. et al., 1995. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *The New England Journal of Medicine*, 333(6), p.333-336.
- Le Texier et al., 2012. Immunoregulatory Function of IL-27 and TGF- β 1 in Cardiac Allograft Transplantation. *Transplantation*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790384> [Consulté juillet 22, 2012].
- Thaunat, O. et al., 2005. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), p.14723-14728.
- Thebault, P et al., 2007. Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(11), p.2472-2482.
- Thebault, P et al., 2009. The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(5), p.3099-3108.
- Thornton, A M & Shevach, E M, 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine*, 188(2), p.287-296.
- Thornton, A M & Shevach, E M, 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(1), p.183-190.
- Thornton, Angela M et al., 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(11), p.6519-6523.
- Thornton, Angela M et al., 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(7), p.3433-3441.
- Tian, J. et al., 2001. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(2), p.1081-1089.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M. & Nemazee, D., 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *The Journal of experimental medicine*, 177(4), p.1009-1020.
- Tokita, D. et al., 2008. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation*, 85(3), p.369-377.
- Trapani, J.A. & Smyth, M.J., 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews. Immunology*, 2(10), p.735-747.
- Tretter, T. et al., 2008. Induction of CD4+ T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells. *Blood*, 112(12), p.4555-4564.
- Trombetta, E.S. & Mellman, Ira, 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology*, 23, p.975-1028.

- Tu, W. et al., 2008. Efficient generation of human alloantigen-specific CD4⁺ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood*, 112(6), p.2554-2562.
- Tubb, B. et al., 2002. Testis fascin (FSCN3): a novel paralog of the actin-bundling protein fascin expressed specifically in the elongate spermatid head. *Experimental cell research*, 275(1), p.92-109.
- Tunyaplin, C. et al., 2004. Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(2), p.1158-1165.
- Valladeau, J. et al., 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*, 12(1), p.71-81.
- Valujskikh, A., Pantenburg, B. & Heeger, Peter S, 2002. Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2(6), p.501-509.
- Vanaudenaerde, B.M. et al., 2006. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 27(4), p.779-787.
- Veldhoen, M. et al., 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), p.179-189.
- Veldhoen, M. et al., 2008. Transforming growth factor-beta « reprograms » the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology*, 9(12), p.1341-1346.
- Victora, G.D. et al., 2010. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, 143(4), p.592-605.
- Vignjevic, D. et al., 2006. Role of fascin in filopodial protrusion. *The Journal of Cell Biology*, 174(6), p.863-875.
- Villarino, A. et al., 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity*, 19(5), p.645-655.
- Vitale, G., Mion, F. & Pucillo, C., 2010. Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity. *Molecular Immunology*, 48(1-3), p.1-8.
- Voisine, C. et al., 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(5), p.2284-2291.
- Vugmeyster, Y. et al., 2006. A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys. *The American journal of pathology*, 168(2), p.476-489.
- Wakkach, A. et al., 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*, 18(5), p.605-617.
- Walunas, T.L., Bakker, C.Y. & Bluestone, J A, 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *The Journal of experimental medicine*, 183(6), p.2541-2550.
- Wang, H. et al., 2003. Attenuation of acute xenograft rejection by short-term treatment with LF15-0195 and monoclonal antibody against CD45RB in a rat-to-mouse cardiac transplantation model. *Transplantation*, 75(9), p.1475-1481.
- Watanabe, N. et al., 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 436(7054), p.1181-1185.
- Watanabe, R. et al., 2007. CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *The American journal of pathology*, 171(2), p.560-570.

- Watanabe, T. et al., 2002. Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4⁺ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(5), p.2188-2199.
- Watts, C. et al., 2007. Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Current opinion in immunology*, 19(1), p.73-78.
- Wehner, J. et al., 2007. Antibody and complement in transplant vasculopathy. *Circulation research*, 100(2), p.191-203.
- Wei, B. et al., 2005. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4⁺ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), p.2010-2015.
- Weiner, H L, 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews*, 182, p.207-214.
- Werner-Klein, M. et al., 2007. Transcriptional targeting of B cells for induction of peripheral CD8 T cell tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(12), p.7738-7746.
- West, M.A. et al., 2004. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5687), p.1153-1157.
- Wildin, R.S. et al., 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics*, 27(1), p.18-20.
- Wilhelm, M.J. et al., 2002. Activation of proinflammatory mediators in heart transplants from brain-dead donors: evidence from a model of chronic rat cardiac allograft rejection. *Transplantation Proceedings*, 34(6), p.2359-2360.
- Wolf, S.D. et al., 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, 184(6), p.2271-2278.
- Wood, Kathryn J, Bushell, A. & Hester, Joanna, 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nature reviews. Immunology*, 12(6), p.417-430.
- Wood, Kathryn J & Goto, R., 2012. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, 93(1), p.1-10.
- Xia, G., He, J. & Leventhal, J.R., 2008. Ex vivo-expanded natural CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells synergize with host T-cell depletion to promote long-term survival of allografts. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(2), p.298-306.
- Xiao, S. et al., 2012. Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(30), p.12105-12110.
- Xiao, S. et al., 2008. Retinoic acid increases Foxp3⁺ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(4), p.2277-2284.
- Xie, A. et al., 2011. Treatment with interleukin-12/23p40 antibody attenuates acute cardiac allograft rejection. *Transplantation*, 91(1), p.27-34.
- Xiu, Y. et al., 2008. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(5), p.2863-2875.
- Xu, L. et al., 2007. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁺-Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(11), p.6725-6729.

- Xystrakis, E. et al., 2004. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood*, 104(10), p.3294-3301.
- Yamakuchi, M. et al., 2007. Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), p.1301-1306.
- Yamashiro, S., 2012. Functions of fascin in dendritic cells. *Critical reviews in immunology*, 32(1), p.11-21.
- Yamazaki, Sayuri et al., 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 198(2), p.235-247.
- Yanaba, K. et al., 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 28(5), p.639-650.
- Yanaba, K. et al., 2007. B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(2), p.1369-1380.
- Yang, H, Issekutz, T.B. & Wright, J.R., Jr, 1995. Prolongation of rat islet allograft survival by treatment with monoclonal antibodies against VLA-4 and LFA-1. *Transplantation*, 60(1), p.71-76.
- Yang, Hongji et al., 2003. Monotherapy with LF 15-0195, an analogue of 15-deoxyspergualin, significantly prolongs renal allograft survival in monkeys. *Transplantation*, 75(8), p.1166-1171.
- Yang, Jinming et al., 2003. LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity. *Journal of leukocyte biology*, 74(3), p.438-447.
- Yarkoni, Y., Getahun, A. & Cambier, J.C., 2010. Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunological reviews*, 237(1), p.249-263.
- Yen, D. et al., 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of clinical investigation*, 116(5), p.1310-1316.
- Yin, H. et al., 2010. IL-33 prolongs murine cardiac allograft survival through induction of TH2-type immune deviation. *Transplantation*, 89(10), p.1189-1197.
- Yokoyama, W.M. & Plougastel, B.F.M., 2003. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nature reviews. Immunology*, 3(4), p.304-316.
- Young, Kevin J et al., 2003. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(1), p.134-141.
- Yuan, X. et al., 2008. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *The Journal of experimental medicine*, 205(13), p.3133-3144.
- Zhai, Y. et al., 2002. Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(8), p.4667-4673.
- Zhang, Q. & Reed, Elaine F, 2010. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 22(5), p.682-688.
- Zhang, X & Reed, E F, 2009. Effect of antibodies on endothelium. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(11), p.2459-2465.
- Zhang, Yu et al., 2012. B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772949> [Consulté juillet 30, 2012].

- Zhang, Z.X. et al., 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nature medicine*, 6(7), p.782-789.
- Zhao, P. et al., 2009. Deficiency in TLR4 signal transduction ameliorates cardiac injury and cardiomyocyte contractile dysfunction during ischemia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8A), p.1513-1525.
- Zhou, D. et al., 2003. LF 15-0195, a novel immunosuppressive agent prevents rejection and induces operational tolerance in a mouse cardiac allograft model. *Transplantation*, 76(4), p.644-650.
- Zhou, X. et al., 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology*, 10(9), p.1000-1007.
- Zotos, D. et al., 2010. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *The Journal of experimental medicine*, 207(2), p.365-378.
- Zou, Y. et al., 2007. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *The New England Journal of Medicine*, 357(13), p.1293-1300.
- Zuklys, S. et al., 2000. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(4), p.1976-1983.
- Zuñiga, E. et al., 2001. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *Journal of leukocyte biology*, 70(1), p.73-79.

Annexes

Liste des publications en annexe

A. Annexe 1: Immunoregulatory function of IL-27 and TGFβ1 in cardiac allograft transplantation

Le Texier L, Thebaul P, Carvalho-Gaspar M, Vignard V, Merieau E, Usal C, Cuturi MC, Wood KJ and Chiffolleau E. *Transplantation* (2012 Aug;94(3):226-233)

B. Annexe 2: Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells.

Condamine T, Le Texier L, Howie D, Lavault A, Hill M, Halary F, Cobbold S, Waldmann H, Cuturi MC, Chiffolleau E. *J Leukoc Biol.* (2010 Sep;88(3):507-15)

C. Annexe 3: The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation.

Thebault P, Lhermite N, Tilly G, Le Texier L, Quillard T, Heslan M, Anegon I, Souillou JP, Brouard S, Charreau B, Cuturi MC, Chiffolleau E. *J Immunol.* (2009 Sep 1;183(5):3099-108)

Immunoregulatory Function of IL-27 and TGF- β 1 in Cardiac Allograft Transplantation

Laetitia Le Texier,^{1,2,3} Pamela Thebault,^{1,2,3,4} Manuela Carvalho-Gaspar,⁵ Virginie Vignard,^{1,2,3}
Emmanuel Merieau,^{1,2,3} Claire Usal,^{1,2,3} Maria-Cristina Cuturi,^{1,2,3} Kathryn J. Wood,⁵
and Elise Chiffolleau^{1,2,3,6}

Background. Deciphering the mechanisms of tolerance represents a crucial aim of research in transplantation. We previously identified by DNA chip interleukin (IL)-27 p28 and transforming growth factor (TGF)- β 1 as overexpressed in a model of rat cardiac allograft tolerance mediated by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. The role of these two molecules on the control of the inflammatory response remains controversial. However, both are involved in the regulation of the T helper 17/Treg axis, suggesting their involvement in tolerance.

Methods. We analyzed regulation of IL-27 and TGF- β 1 expression in allograft response and their role in tolerance by using blocking anti-TGF- β antibody and by generating an adeno-associated virus encoding IL-27.

Results. Here, we confirmed the overexpression of IL-27 and TGF- β 1 in tolerated cardiac allografts in two different rodent models. We observed that their expression correlates with inhibition of T helper 17 differentiation and with expansion of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. We showed in a rat model that anti-TGF- β treatment abrogates infectious tolerance mediated by the transfer of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. Moreover, overexpression of IL-27 by adeno-associated virus administration in combination with a short-term immunosuppression allows prolongation of cardiac allograft survival and one tolerant recipient. We found that IL-27 overexpression did not induce Foxp3⁺ CD4⁺CD25⁺ T-cell expansion but rather IL-10-expressing CD4⁺ T cells in the tolerant recipient.

Conclusions. Taken together, these data suggest that both TGF- β 1 and IL-27 play a role in the mechanisms of tolerance. However, in contrast to TGF- β 1, IL-27 seems not to be involved in regulatory CD4⁺CD25⁺ T-cell expansion but rather in their mode of action.

Keywords: Tolerance, Regulatory T cells, Rodent.

(*Transplantation* 2012;94: 00–00)

The interleukin (IL)-6/IL-12 family represents a group of factors remarkable for their pleiotropic effects on T helper cell (Th) function, differentiation, and development (1). One of the most recently described is the heterodimeric cytokine IL-27 that is composed of the Epstein-Barr virus–induced (EBI)-3 and IL-27 p28 subunits. IL-27 signals through the receptor subunits gp130 and WSX-1 that is restricted to T cells, natural killer cells, and monocytes (1).

The role of IL-27 on Th differentiation and on inflammatory responses is controversial (2, 3). Initially, IL-27 was described to be involved in Th1 differentiation. This was

suggested by its ability to induce the Th1 transcription factor, T-bet, in naive CD4⁺ T cells (4–6). Then, IL-27 was shown to decrease effector Th function and particularly to suppress Th17 differentiation (7). Recently, an anti-inflammatory effect of IL-27 has been reinforced by its ability to regulate *in vivo* models of infectious and autoimmune diseases (3, 8, 9). Interestingly, IL-27 has recently been reported to generate

This work was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to L.L.T.), by Fondation Progreffe (to P.T.), by a British Heart Foundation Grant PG/07/089/23686 (to M.C.G.), and in part by the European Union Framework Program 6 Reprogramming the Immune System for the Establishment of Tolerance consortium (<http://www.risetfp6.org>).

The authors declare no conflicts of interest.

M.C.C., K.J.W., and E.C. were Reprogramming the Immune System for the Establishment of Tolerance investigators.

¹ Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, U1064, Nantes, France.

² Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation Urologie Néphrologie, Institut Urologie Néphrologie, Nantes, France.

³ Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

⁴ Currently, Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada.

⁵ Nuffield Department of Surgical Sciences, University of Oxford, Oxford OX3 9DU, United Kingdom.

⁶ Address correspondence to: Elise Chiffolleau, Ph.D., Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, U1064, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, F44000 France.

E-mail: Elise.Chiffolleau@univ-nantes.fr

L.L.T., P.T., M.C.G., V.V., E.M., and C.U. participated in performing the research and analyzing data. M.C.C. participated in analyzing data. K.J.W. participated in making the research design and analyzing data. E.C. participated in making the research design, performing the research, analyzing data, and writing the article.

L.L.T. and P.T. contributed equally to this work.

Received 11 November 2011. Revision requested 30 November 2011.

Accepted 17 April 2012.

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/12/9403-00

DOI: 10.1097/TP.0b013e31825b0c38

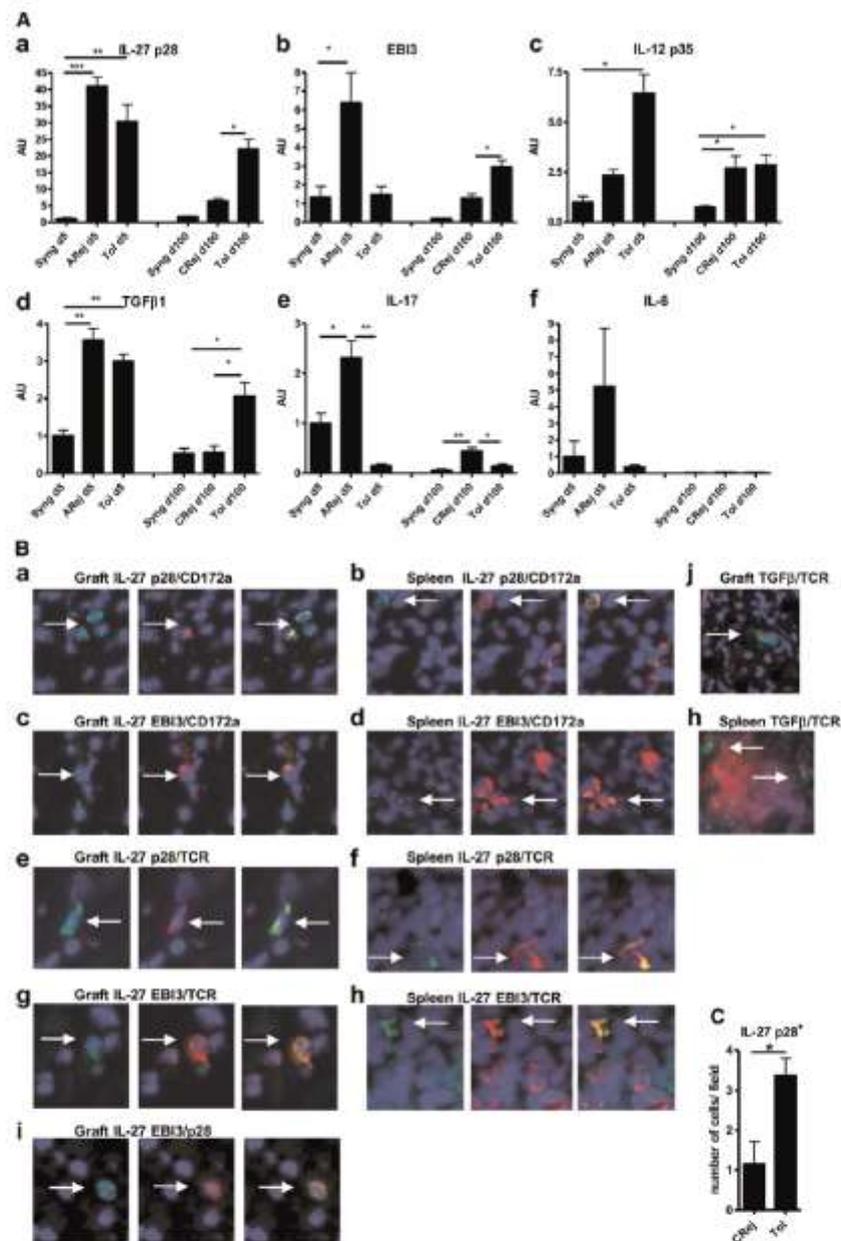


FIGURE 1. Expression of interleukin (IL)-27 p28, Epstein-Barr virus-induced (EBI)-3, IL-12 p35, transforming growth factor (TGF)- β 1, IL-17, and IL-6 in a rat cardiac allograft model. **A**, messenger RNA expression of (a) IL-27 p28, (b) EBI-3, (c) IL-12 p35, (d) TGF- β 1, (e) IL-17, and (f) IL-6 was analyzed by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cardiac syngeneic grafts (Syng), acutely rejected allografts (ARej), chronically rejected allografts (CRej), or tolerated allografts (Tol) harvested at day 5 (d5) or 100 (d100) after transplantation ($n=4$). Results are expressed in AU of the gene/hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase transcript ratio \pm SEM and expressed as relative expression compared with the reference syngeneic grafts at day 5 (value=1). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. **B**, Representative pictures of immunofluorescence-merged staining by histologic diagnosis for 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue), IL-27 p28 (green), EBI-3 (green), and CD172a (red) in the graft and spleen (a-d); IL-27 p28 (green), EBI-3 (green), and T-cell receptor (TCR) (red) in the graft and spleen (e-h); EBI-3 (green) and IL-27 p28 (red) in the graft (i); and TGF- β (LAP complex) (green) and TCR (red) in the graft and spleen (j-h) (original magnification $\times 600$). Data are representative of three independent experiments on different rat tolerant recipients. **C**, Expression of IL-27 p28 protein was assessed by histologic diagnosis by counting the number of positive cells per field in CRej and Tol. Results are expressed in number of cells per field \pm SEM; $n=4$. * $P<0.05$.

IL-10-producing Tr1 cells (7, 10–12). IL-27 because other IL-12 family members have been shown to be produced mainly by antigen-presenting cells (APC) (13). However, some studies have demonstrated that regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells can express the IL-12 family cytokine IL-35 that is necessary for suppression (14, 15).

We previously identified by DNA chip IL-27p28 and TGF- β as up-regulated in an experimental model of long-term allograft tolerance in a rat model, in which we demonstrated the crucial role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (16–18). Because IL-6/IL-12 family members have been shown, together with TGF- β , to modulate effector and regulatory T-cell development and function, we analyzed their expression and their role in allograft response.

RESULTS

Overexpression of IL-27 and TGF- β 1 in Cardiac Allograft Tolerance Rodent Models

We previously described that a short-term treatment with the immunosuppressor LF15-0195, a deoxyspergualin analog, induced major histocompatibility complex fully mismatched cardiac allograft tolerance in rats with no development of vascular lesions at long term (16–18). We previously demonstrated the expansion of induced regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells that are able to transfer allograft tolerance and that interplay with APCs for expression of tolerogenic molecules (17, 19, 20). In order to identify new mediators of tolerance, we applied pan-genomic DNA chip on whole tolerated allografts and compared them with allografts that develop chronic rejection (induced in the same strain combination by donor-specific blood transfusion [DST]) (18). Among the genes up-regulated in tolerated allografts, we identified the IL-27 p28 chain and TGF- β 1. We confirmed here by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) the overexpression of IL-27 p28 and EBI-

3 transcripts in long-term tolerated allografts (at day 100 after transplantation) compared with allografts that develop chronic rejection (Fig. 1A-a and A-b, respectively). In order to determine whether the overexpression of IL-27 was also retrieved during the induction of tolerance, under the immunosuppressive treatment, we analyzed the grafts at day 5 after transplantation. We observed a peak of expression of IL-27 p28 at day 5 after transplantation in tolerated allografts compared with syngeneic grafts but not of EBI-3, suggesting that IL-27 is overexpressed only during maintenance of tolerance once regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells have expanded (Fig. 1A-b). We analyzed also the expression of IL-12 p35 that forms with EBI-3, the IL-35 cytokine. We observed a strong expression of IL-12 p35 during induction of tolerance that then partially decreases during maintenance of tolerance (Fig. 1A-c). However, because EBI-3 is not expressed during induction, the peak of IL-12 p35 expression does not correspond to IL-35. For TGF- β 1, we observed a high expression at both day 5 and 100 after transplantation (Fig. 1A-d). Because TGF- β 1 and IL-27 are both involved in the regulation of the Th17 differentiation axis, we analyzed the expression of IL-17 and IL-6. We observed that IL-17 and IL-6 expressions were inhibited in tolerated allografts at day 5 or 100 after transplantation compared with allografts that develop acute or chronic rejection (Fig. 1A-e and A-f, respectively).

In an attempt to identify and characterize common mediators of tolerance within the Reprogramming the Immune System for the Establishment of Tolerance consortium, we decided to analyze messenger RNA expression of IL-27 and TGF- β 1 in other tolerance models and regulatory cells. Interestingly, overexpression of IL-27 p28 and TGF- β 1 was also observed in a cardiac allograft mouse model of tolerance that is induced by DST and anti-CD4 treatment and that also involved regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells (21). An increase of up to 45-fold for IL-27 p28 and of 19-fold for

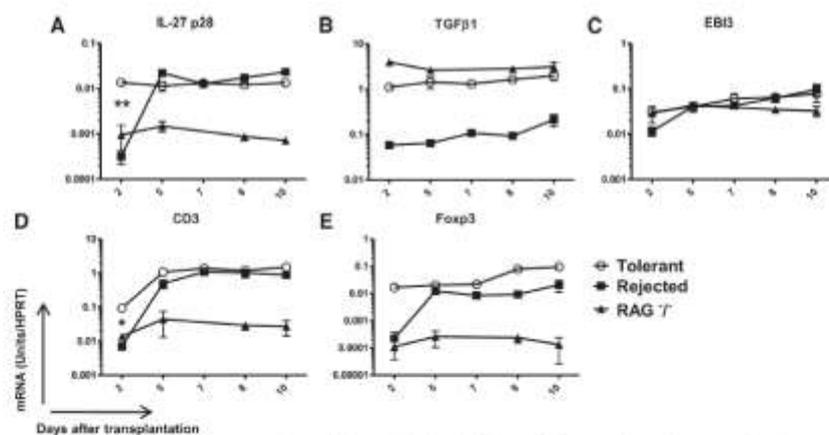


FIGURE 2. Messenger RNA (mRNA) expression of interleukin (IL)-27 p28, transforming growth factor (TGF)- β 1, Epstein-Barr virus-induced (EBI)-3, CD3, and Foxp3 in cardiac allografts in mice. mRNA expression of (A) IL-27 p28, (B) TGF- β 1, (C) EBI-3, (D) CD3, and (E) Foxp3 were analyzed by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cardiac untreated rejected allografts (Rejected), treated tolerant allografts (Tolerant), and allografts from RAG^{-/-} recipients harvested at day 2, 5, 7, 8, or 10 after transplantation ($n \geq 2$). Results are expressed in mRNA units/HPRT ratio \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

TGF- β 1 was observed in tolerated grafts compared with rejecting ones (Fig. 2A and B, respectively). EBI-3 expression was also up-regulated over time in tolerated allografts but at a similar level than in rejecting grafts (Fig. 2C). Interestingly, IL-27 p28 expression correlates with the early regulatory Foxp3⁺ T-cell infiltration (up to 10-fold in CD3 and 85-fold in Foxp3 expression) (Fig. 2D and E, respectively) and is not observed in Recombination-activating gene^{-/-} recipients lacking T cells. Therefore, IL-27 p28 overexpression may be induced by the regulatory Foxp3⁺ T cells that early infiltrate the allografts (Fig. 2A).

In Tolerated Allografts, IL-27 and TGF- β Are Expressed by Myeloid Cells

In order to determine which cells express IL-27 and TGF- β 1 in long-term tolerant recipients, we analyzed allografts and spleen by histologic diagnosis. We observed protein expression of IL-27 p28 (Fig. 1B-a and B-b) or EBI-3 (Fig. 1B-c and B-d) mostly by myeloid cells (CD172a⁺) in the graft and spleen, respectively. Interestingly, we also observed some T cells (T-cell receptor⁺) expressing IL-27 p28 (Fig. 1B-e and B-f) or EBI-3 (Fig. 1B-g and B-h) in the graft and spleen, respectively. Some but not all of EBI-3⁺ cells were costained with IL-27 p28 (Fig. 1B-i in the graft). Unfortunately, because the commercially available IL-12 p35 polyclonal antibody is not working in our hand, we were not able to determine whether the other EBI-3⁺ cells represented IL-35⁺ cells. We counted more IL-27 p28⁺ cells in tolerated allografts than in allografts developing chronic rejection, confirming the RT-PCR analysis (Fig. 1C). TGF- β 1 (detected by anti-latency associated protein [LAP]-1 antibody) was expressed mostly by myeloid cells (non-T cells) (Fig. 1B-j and B-h in the graft and in red pulp of spleen, respectively).

We also analyzed the messenger RNA expression of EBI-3, IL-27 p28, IL-12 p35, and TGF- β 1 in highly purified regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells that accumulated in the spleen of tolerant recipients (17). We compared with their CD25⁻ counterparts and with both these populations from naive rats. Interestingly, EBI-3, IL-27 p28, and IL-12 p35 transcripts were strongly expressed in CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients compared with their CD25⁻ counterparts, whereas only EBI-3 transcripts were up-regulated in CD4⁺CD25⁺ T cells from naive rats (Fig. 3A-C, respectively). These data suggest that IL-27 and IL-35 are overexpressed only in induced CD4⁺CD25⁺ T cells. No difference was observed in the expression of TGF- β 1 in CD4⁺CD25⁺ T cells compared with their CD25⁻ counterparts (Fig. 3D).

Role of TGF- β 1 and IL-27 in Rat Allograft Tolerance

In order to determine the function of TGF- β 1 in rat cardiac allograft tolerance, we administrated neutralizing anti-TGF- β antibody. We observed that anti-TGF- β treatment was not sufficient to abrogate long-term rat allograft tolerance (data not shown). However, when administrated at the time of transfer of regulatory CD4⁺ T cells, anti-TGF- β treatment is able to abrogate transfer of tolerance (median survival time [MST], 13 days vs. 100 days [Fig. 4A]). These data suggest a role for TGF- β in expansion and function of regulatory CD4⁺ T cells.

To test the immunomodulatory role of IL-27 in transplantation, we generated an adeno-associated virus (AAV) encoding rat IL-27. Recombinant AAV are among the most efficient gene delivery vehicles for therapeutic gene transfer in vivo especially because they can transduce many tissues with a safe, strong and long-term expression of the transgene (22-24). We demonstrated the efficiency of IL-27 AAV transduction and of IL-27 expression by transfecting in vitro human embryonic kidney 293 cells (Fig. 4B). We tested the effect of IL-27 overexpression on fully mismatched cardiac allograft survival. We administrated AAV to recipients by peripheral vein injection for systemic delivery and 3 weeks before transplantation to allow time for the transgene to be efficiently expressed. Intravenous (IV) AAV administration targets all the blood-irrigated organs, but this serotype 2/8 will particularly transduce hepatocytes (25, 26). Because IL-27 is a secreted protein, we should observe accumulation in the sera and a systemic effect. Indeed, we observed that IL-27 protein expression started to increase 3 weeks after administration in the sera of transfected recipients and remained stable over time (up to fourfold compared with basal level at day 300 after transplantation) (Fig. 4C). Administration of IL-27 AAV alone showed moderate effect on allograft survival (MST, 13 days vs. 7 days for untreated recipients; Fig. 4D) (data not shown). However, when associated with a 10-day course of suboptimal doses of rapamycin, IL-27 AAV administration was able to prolong allograft survival

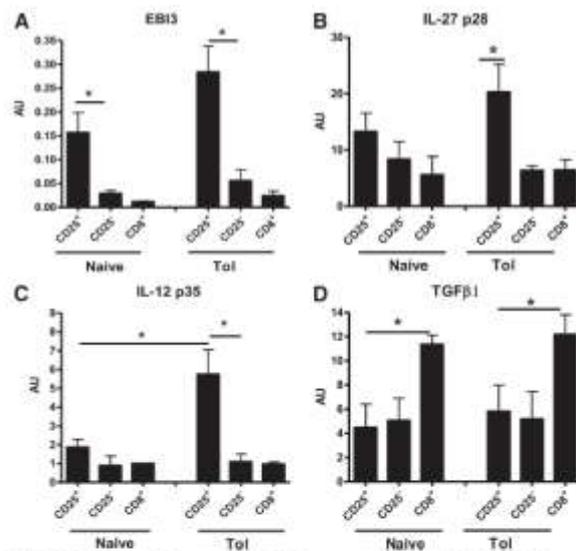


FIGURE 3. Messenger RNA expression of Epstein-Barr virus-induced (EBI)-3, interleukin (IL)-27 p28, IL-12 p35, and transforming growth factor (TGF)- β 1 in rat CD4⁺CD25⁺ T cells. Messenger RNA expression of (A) EBI-3, (B) IL-27 p28, (C) IL-12 p35, and (D) TGF- β 1 was analyzed by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction in purified CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻, and CD8⁺ T cells from naive rats (Naive) or from long-term tolerant recipients (Tol). Results are expressed in AU of the gene/hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase transcript ratio \pm SEM, n=4. * P<0.05.

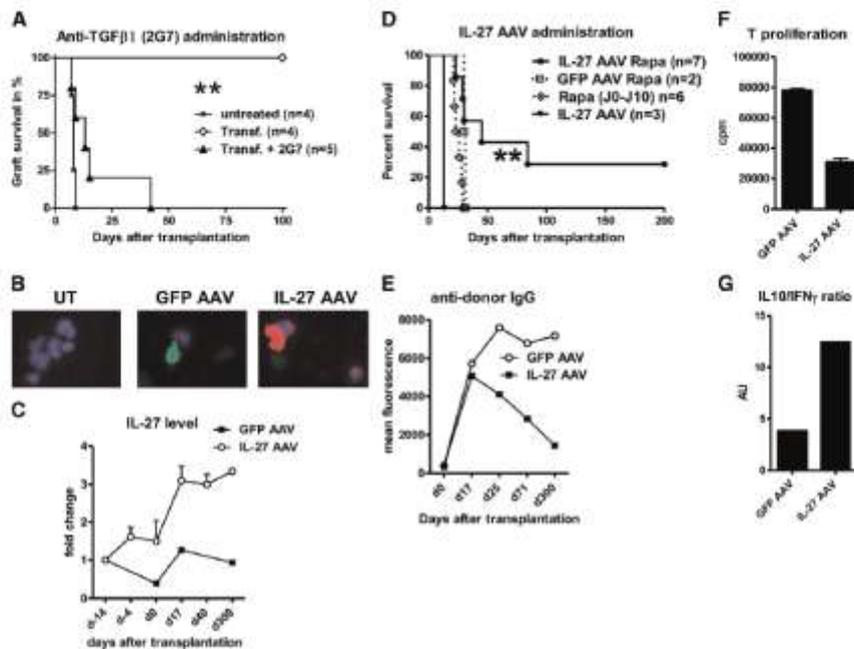


FIGURE 4. Role of transforming growth factor β and interleukin (IL)-27 in rat cardiac allograft tolerance. **A**, Recipients that have been transferred with 20×10^6 of spleen $CD4^+$ T cells from long-term tolerant recipients (Transf.) were treated with neutralizing mouse anti-rat transforming growth factor β mAb (clone 2G7, IgG2b) injected intraperitoneally (5 mg/kg) twice a week beginning the day of transplantation until rejection (Transf.+2G7) $n \geq 4$. $**P < 0.01$. **B**, Representative pictures of immunofluorescence-merged staining for IL-27 p28 (red), green fluorescent protein (GFP) (green), and DAPI (blue) of untransfected (UT) or GFP or IL-27 adeno-associated virus (AAV) transfected human embryonic kidney 293 cells as described in *Materials and Methods* (original magnification $\times 600$). **C**, IL-27 level was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay in the sera from GFP or IL-27 AAV-transfected allograft recipients harvested at days -14, -4, 0, 17, 40, and 300 before or after transplantation. Results are expressed in fold change compared with the IL-27 basal level assessed from each recipient. **D**, Rat cardiac allograft recipients were treated with GFP or IL-27 AAV (4.5×10^{11} vector genome) injected intravenously into recipients 3 weeks before transplantation. Alternatively, suboptimal dose of rapamycin (Rapa) was given orally from day 0 to day 10 (0.4 mg/kg), $n \geq 4$. $**P < 0.01$. **E**, Assessment of anti-donor-specific IgG antibodies in the sera of IL-27 AAV-tolerant recipient or GFP AAV treated recipient and harvested at days 0, 17, 25, 71, and 300 after transplantation. Data are expressed in geometric mean fluorescence. **F**, T cells from GFP or tolerant IL-27 AAV-treated recipients (day 300 after transplantation) were stimulated by allogeneic (LEW.1W) APC for 4 days (mixed leukocyte reaction), and T-cell proliferation was assessed in triplicates by 3H incorporation. Data are expressed in cpm \pm SEM. **G**, Ratio of IL-10/interferon γ expression assessed by enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatant of mixed leukocyte reaction from stimulated $CD4^+$ T cells from GFP or tolerant IL-27 AAV-treated recipients. Data are expressed in arbitrary unit (AU).

(MST, 45 days) compared with control (green fluorescent protein [GFP] AAV plus rapamycin [MST, 30 days] or rapamycin alone [MST, 24 days]) (Fig. 4D). One of seven rats treated with IL-27 AAV accepted its graft at long term and displayed a low anti-donor response (alloantibody production and spleen T-cell proliferation) compared with control recipient (Fig. 4E and F, respectively). In addition, we noted a higher IL-10-to-interferon γ expression ratio by the alloantigen-specific $CD4^+$ T cells from this tolerant recipient (Fig. 4G).

DISCUSSION

We observed up-regulation of TGF- β 1 and IL-27 in two experimental models of cardiac allograft tolerance mediated by regulatory $CD4^+CD25^+$ T cells, reinforcing the idea that these two molecules may play a role in tolerance mechanisms. TGF- β 1 is known to be implicated in many biologic

processes and to play pivotal functions in the immune system, notably in the Th17 and regulatory T-cell differentiation (27). We found a high expression of TGF- β 1 in our model of allograft tolerance in rats with no expression of IL-6 and IL-17, suggesting that the Th17 differentiation axis is totally inhibited and that TGF- β 1 plays rather a role in the regulatory $CD4^+CD25^+$ T-cell development or function. Indeed, we have demonstrated that TGF- β 1, although not produced predominantly by regulatory $CD4^+CD25^+$ T cells, is required for the transfer of tolerance. Therefore, as previously demonstrated, regulatory $CD4^+CD25^+$ T cells require TGF- β 1 to mediate their expansion and their suppression (28–31).

We found that induced regulatory $CD4^+CD25^+$ T cells from tolerant recipients expressed higher transcript level for IL-27 p28, EBI-3, and IL-12 p35 chains than their $CD25^-$ counterparts, suggesting that they could express IL-27 and IL-35 cytokines. This contrasts naturally regulatory $CD4^+$

CD25⁺ T cells from naive rats that overexpressed only the EBI-3 chain. Controversial studies have suggested that regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells express IL-35, which is necessary for suppression (14, 15, 32, 33). In fact, IL-35 expression seems to depend on the activation state of the cells and whether they correspond to induced or natural suppressive cells (15, 34, 35). Unfortunately, because of lack of a specific antibody, we have not been able to stain for IL-35 protein. We found IL-27 protein expression by some T cells in the graft and spleen of tolerant recipients. However, the majority was by myeloid cells, suggesting that expression by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells may be rare and low. Nevertheless, we observed that IL-27 overexpression correlated with accumulation of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in tolerated allografts in both rodent models. Therefore, although induced regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells may not be the major source of IL-27, they promote directly or indirectly its expression in tolerated allografts.

To determine the role of IL-27 in transplantation, we generated an AAV-encoding IL-27. AAV represents a promising safe strategy for gene therapy in clinic (22–24). We showed that, in combination with a short-term immunosuppressive treatment, IL-27 overexpression allowed a significant prolongation of allograft survival and promoted tolerance in one of seven treated recipients. We observed no expansion of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in IL-27 AAV-treated recipients (data not shown). In this sense, a recent study have demonstrated that transgenic mice overexpressing IL-27 displayed limited differentiation of regulatory T cells because of a reduced production of IL-2 that is vital for regulatory CD4⁺CD25⁺ T-cell maintenance (36). IL-27 is not expressed during induction of tolerance in our rat model but only during maintenance when regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells expand (16, 17). This reinforces the idea that IL-27 is not necessary for induced regulatory CD4⁺CD25⁺ T-cell development but rather for their mode of action. Interestingly, we observed more IL-10 expression by anti-donor CD4⁺ T cells in the IL-27 AAV-treated tolerant recipient. Indeed, IL-27 has recently been shown to promote the development of induced Tr1 cells by inducing the ligand-activated transcription factor aryl hydrocarbon receptor to act in synergy with c-Maf (11, 12).

To conclude, although tolerance seems difficult to achieve in our fully mismatched cardiac allograft model, overexpressing IL-27 in combination with immunosuppression may represent a promising therapeutic strategy. It will be interesting in the future to test the effect of this IL-27 AAV on other rat diseases, notably on chronic rejection, and to determine whether IL-27 is able to modulate the Th1, Th2, and Th17 responses that develop progressively in this model (18, 20, 37, 38).

MATERIALS AND METHODS

AAV Generation and In Vitro Transduction

AAV encoding rat IL-27 (AAV2/8.CMV.WPRE including full-length complementary DNA-encoding IL-27p28 and EBI-3 separated by internal ribosome entry site coding region) or AAV-encoding GFP (AAV2/8.CMV.WPRE.GFP) were generated as previously described (39), at the University Hospital of Nantes (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>). Human embryonic kidney 293 cells (0.25×10^6 cells/well) were transduced in 6-well

plates in 600- μ L Dulbecco's minimum essential medium supplemented with 1% fetal bovine serum by addition of IL-27 or GFP AAV (100 multiplicity of infection) and null adenovirus (10 multiplicity of infection) to enhance rapid transduction. Five hr after initial viral application, 3-mL growth media (10% fetal bovine serum) was added to each well. Cytospins and histologic diagnosis were performed 4 days following infection.

Animals and Transplantation

Rodents are maintained in animal facilities under standard conditions according to institutional guidelines, and studies were reviewed and approved by the appropriate institutional review committee.

Rats

Inbred 8-week-old male LEW.1W rats (RT1u; Centre d'Élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) served as heart donors, and LEW.1A (RT1a) served as allograft recipients; heterotopic cardiac allografts were performed as previously described (40). Induction of tolerance in rats by short-term treatment with the deoxyspergualine analog, LF15-0195, and the model of development of chronic rejection were performed as previously described (16–18, 38). Graft of recipients was harvested at day 5 or 100 after transplantation. For in vivo transfer experiments, 20×10^6 purified CD4⁺ T cells from tolerant recipients were injected IV into LEW.1A secondary syngeneic irradiated recipients as previously described (19). IL-27 or GFP AAV (4.5×10^{11} vector genome) were injected IV at recipients 3 weeks before transplantation. Rapamycin (Rapamune; Wyeth, Collegeville, PA) was given orally from days 0 to 10 (0.4 mg/kg). A neutralizing mouse anti-rat TGF- β monoclonal antibody (mAb) (2G7; provided by Dr. K. Melief, Amsterdam, the Netherlands) was injected intraperitoneally (5 mg/kg) twice a week beginning from the day of transplantation as previously described (41).

Mice

CBA.Ca (CBA H2^b) and C57BL/10 (B10 H2^b) mice were originally purchased from Harlan Ltd. (Bicester, U.K.) and CBA.Ca RAG-1 knockout (CBA RAG^{-/-}) a gift of Dr. D. Kioussis (Mill Hill, London, U.K.). Heterotopic cardiac transplants were performed as previously described in 6- to 12-week-old mice (42). Fully allogeneic B10 heart to CBA recipient are rejected with an MST of 10 days, whereas in CBA.RAG^{-/-}, MST was more than 100 days (43). For induction of tolerance, mice received 200 μ g of anti-CD4 mAb (YTS177.9; H Waldmann, Oxford, U.K.) IV on days -28 and -27 and a DST (250 μ L of donor blood) IV on day -27 (MST >100 days) as previously described (21). Graft of recipients was harvested at days 2, 5, 7, 8, or 10 after transplantation.

Cell Purification and Flow Cytometry

Total CD4⁺, CD4⁺CD25⁻, regulatory CD4⁺CD25⁺, and CD8⁺ T cells from naive rats or tolerant recipients were purified by positive selection (with R73, W3/25, OX39, and OX8 mAbs) using a FACSAria Flow Cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) as previously described (44). Purity was more than 99%. Fluorescent labeling of cells was measured using a FACS LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed with FlowJo-R software (Tree Star Inc., Ashland, OR).

RNA Extraction and Real-Time Quantitative RT-PCR

Total RNA from grafts or cells were prepared, and real-time quantitative RT-PCRs were performed as previously described using a GenAmp 7700 Sequence Detection System and either an SYBR Green or a qPCR Master Mix (45, 46). Oligonucleotides used are described in Table 1. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase was used as an endogenous control gene to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the 2- $\Delta\Delta$ CT method (47).

Immunohistology

Cryostat sections (7 μ m) of cardiac and spleen tissues (snap-frozen) or cytopins of cells were fixed in acetone for 10 min. Sections were then labeled with anti-rat mouse IL-27 p28 and rabbit EBI-3 antibodies that have been generated and kindly provided by Dr. Taketoshi Taniguchi (Japan) (48), LAP (antihuman LAP derived from the N-terminal region of the TGF- β gene product; RD system), R73 (anti-rat T-cell receptor α), Ox41 (anti-rat CD172a), and with 4', 6-diamidino-2-phenylindole; mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA); and observed by fluorescence microscopy (Axioskop 2 plus; Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany). IL-27 p28⁺ cells were counted in 30 fields per graft.

Mixed Leukocyte Reaction

APC-enriched cell populations from donor-type and responder spleen T cells were prepared and plated as previously described (19). [³H]TdR incorporation was measured for the last 8 hr of the 96 hr culture.

TABLE 1. Oligonucleotides used in this study for rat and mouse genes^a

rHPRT	For CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC Rev TTGGCTGATGACACAAACATGA
rIL-27 p28	For AGCAGACCCCTGAGCCT Rev GTGGTAGCGAGGAAGCAGAGT
rEBI-3	For CACTTACAGGCTCGGTGTGG Rev CGGGCTTGATGATTGCTTC
rTGF- β 1	For CTCAACACCTGCACAGCTCC Rev ACGATCATGTTGGACAACCTGCT
rIL-17A	For TGCTGTTGCTGCTACTGAACC Rev AACTTCCCCTCAGCGTTGAC
rIFN γ	For TGGATGCTATGGAAGGAAAGA Rev GATTCTGGTGACAGCTGGTG
rIL-6	For GCAAGAGACTTCCAGCCAGTT Rev CATCATCGCTGTTTCATACAATCA
rIL-12 p35	For TGATGATGAC CCTGTGCCCTT Rev GCATGGAGCA GGATACAGAGC
rFoxp3	For CCCAGGAAAGACAGCAACCTT Rev CTGCTGGCAGTGTCTTGAGAA
mHPRT	For ATCATTATGCCGAGGATTTGGAA Rev TTGAGCACACAGAGGGCCA
mCD3	Probe TGGACAGGACTGAAAGACTTGTCTGGAGATG For ATTGGGGACAGGATGGAG Rev CTGGGAGATGGCTGFACTGGTCA
mIL-27 p28	For ACAGCTTTGCTGAATCTCGATTG Rev ACCGTAGTGGAGAGA CTGAGACT
mEBI-3	For ACTGAAACAGCTCTCGTGGCTCTA Rev AAGTAACGGTGA ATGTCCGAGC
mTGF- β 1	For GGCTACCATGCCAACCTTCTGTCT Rev CCGGGTTGT GTTGGTGTAGA
mFoxp3	Probe CACACAGTACAGCAAGGTCCTTGGCCCT For CCC AGGAAAGACAGCAACCTT Rev TTCTCACAACCAGGCCACTTG Probe ATCCTA CCCACTGCTGGCAAAATGGAGTC

^a From 5' to 3'-end.
EBI, Epstein-Barr virus induced; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IFN, interferon; IL, interleukin; m, mouse; TGF, transforming growth factor; r, rat.

Cytokine Assays

Interferon γ and IL-10 were measured in mixed leukocyte reaction supernatants using enzyme-linked immunosorbent assay from BD Pharmingen (OptEIA; San Diego, CA). IL-27 level was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (AbCys Eurobio, Courtabeuf, France) in sera harvested at day -14, -4, 0, +17, +40, and +300 after transplantation.

Assessment of Circulating Donor-Specific Antibodies

Donor-specific antibodies were assessed in the diluted sera (1/8) harvested from recipients at day 0, +17, +25, +71, and +300 after transplantation as previously described (49).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical evaluation was performed using the Student *t* test for unpaired data, and results were considered significant if *P* values were less than 0.05. The Kaplan-Meier method was used to calculate the survival curves, followed by Mantel-Cox log-rank analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Taketoshi Taniguchi, Medical Research Center, Kochi Medical School, Japan for providing mouse anti-rat IL-27 p28 and EBI-3 antibodies.

REFERENCES

- Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 221.
- Goldberg R, Zohar Y, Wildbaum G, et al. Suppression of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* 2004; 173: 6465.
- Kido MTS, Sugiyama N, Esaki H, et al. T cell-specific overexpression of interleukin-27 receptor α subunit (WSX-1) prevents spontaneous skin inflammation in MRL/lpr mice. *Br J Dermatol* 2011; 164: 1214.
- Chen Q, Ghilardi N, Wang H, et al. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 2000; 407: 916.
- Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 2002; 16: 779.
- Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 2003; 170: 4886.
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006; 7: 937.
- Sweeney CMLR, Basdeo SA, Kinsella K, et al. IL-27 mediates the response to IFN- β therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain Behav Immun* 2011; 6: 1170.
- Pickens SRCN, Volin MV, Mandelin AM 2nd, et al. Local expression of interleukin-27 ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 8: 2289.
- Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 1372.
- Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007; 8: 1363.
- Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* 2011; 11: 854.
- Cocco C, Pistoia V, Airolidi I. Anti-leukemic properties of IL-12, IL-23 and IL-27: Differences and similarities in the control of pediatric B acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011; [published online ahead of print]
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450: 566.

15. Chaturvedi VCL, Guy CS, Workman CJ, et al. Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol* 2011; 186: 6661.
16. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, et al. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant* 2002; 2: 745.
17. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, et al. Role for thymic and splenic regulatory CD4⁺ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 2002; 168: 5058.
18. Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, et al. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1185.
19. Thebault P, Condamine T, Heslan M, et al. Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am J Transplant* 2007; 7: 2472.
20. Thebault P, Lhermite N, Tilly G, et al. The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. *J Immunol* 2009; 183: 3099.
21. Saitovitch D, Boshell A, Mabba DW, et al. Kinetics of induction of transplantation tolerance with a nondepleting anti-Cd4 monoclonal antibody and donor-specific transfusion before transplantation. A critical period of time is required for development of immunological unresponsiveness. *Transplantation* 1996; 61: 1642.
22. Bankiewicz KS, Forsayeth J, Eberling JL, et al. Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC. *Mol Ther* 2006; 14: 564.
23. Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, et al. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 2007; 14: 292.
24. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 2009; 113: 797.
25. Nakai H, Fuess S, Storm TA, et al. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* 2005; 1: 214.
26. Gao G-P, Alvira MR, Wang L, et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11854.
27. Mitchell P, Afzali B, Lombardi G, et al. The T helper 17-regulatory T cell axis in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; 14: 326.
28. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194: 629.
29. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, et al. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 166: 7282.
30. Jonuleit H, Schmitt E, Kalkrath H, et al. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196: 255.
31. Daley SR, Ma J, Adams E, et al. A key role for TGF-beta signaling to T cells in the long-term acceptance of allografts. *J Immunol* 2007; 179: 3648.
32. Allan SE, Song-Zhao GX, Abraham T, et al. Inducible reprogramming of human T cells into Treg cells by a conditionally active form of FOXP3. *Eur J Immunol* 2008; 38: 3282.
33. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, et al. Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 2008; 181: 6898.
34. Seyerl M, Kirchberger S, Majdic O, et al. Human rhinoviruses induce IL-35-producing Treg via induction of B7-H1 (CD274) and sialoadhesin (CD169) on DC. *Eur J Immunol* 2010; 40: 321.
35. Liu F, Tong F, He Y, et al. Detectable expression of IL-35 in CD4⁺ T cells from peripheral blood of chronic hepatitis B patients. *Clin Immunol* 2011; 139: 1.
36. Wojno ED, Hosken N, Stumhofer JS, et al. A role for IL-27 in limiting T regulatory cell populations. *J Immunol* 2011; 187: 266.
37. Koshiba T, Kitade H, Van Damme B, et al. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 2003; 76: 588.
38. 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* 2009; 9: 697.
39. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76: 791.
40. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968; 57: 225.
41. Josien R, Douillard P, Guillot C, et al. A critical role for transforming growth factor- β (TGF- β) in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest* 1998; 102: 1920.
42. Corry RJ, Winn HJ, Russell PS. Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection. *Transplantation* 1973; 16: 343.
43. Bushnell A, Niimi M, Morris PJ, et al. Evidence for immune regulation in the induction of transplantation tolerance: a conditional but limited role for IL-4. *J Immunol* 1999; 162: 1359.
44. Chiffolleau E, Heslan JM, Heslan M, et al. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4⁺ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4⁺ CD25⁺ T cell. *Int Immunol* 2007; 19: 193.
45. Louvet C, Heslan JM, Merieau E, et al. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8⁺ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 2004; 78: 1259.
46. Carvalho-Gaspar M, Billing JS, Spriewald BM, et al. Chemokine gene expression during allograft rejection: comparison of two quantitative PCR techniques. *J Immunol Methods* 2005; 301: 41.
47. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402.
48. Saito F, Ohno Y, Morisawa K, et al. Role of IL-27-producing dendritic cells in Th1-immunity polarization in Lewis rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1773.
49. Le Texier L, Thebault P, Lavault A, et al. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant* 2010; 11: 429.

Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells

Thomas Condamine,^{*,†} Laetitia Le Texier,^{*} Duncan Howie,[†] Amelie Lavault,^{*} Marcelo Hill,^{*} Frank Halary,^{*} Steve Cobbold,[†] Herman Waldmann,[†] Maria-Cristina Cuturi,^{*} and Elise Chiffolleau^{*,2}

^{*}INSERM, U643, CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, and Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; and [†]Therapeutic Immunology Group, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford University, Oxford, United Kingdom

RECEIVED NOVEMBER 12, 2009; REVISED MARCH 30, 2010; ACCEPTED APRIL 27, 2010. DOI: 10.1189/jlb.1109738

ABSTRACT

DCs play a central role in the development of innate and adaptive immunity but also in the induction and maintenance of immune tolerance. Identification of factors that govern DC activation, their maturation state, and their capacity to induce proinflammatory or tolerogenic responses therefore represents a crucial aim of research. We previously identified a new molecule, Tmem176B (which we named TORID initially), as highly expressed in a model of allograft tolerance in the rat. We showed that its overexpression in rat DCs blocked their maturation, suggesting a role for this molecule in the maturation process. To characterize the function of Tmem176B further, we used a split-ubiquitin yeast, two-hybrid system to identify interacting partners and found that Tmem176B associated with itself but also with Tmem176A, a membrane protein similar to Tmem176B. Interestingly, these two molecules showed similar mRNA expression patterns among various murine tissues and immune cells and were both down-regulated following DC maturation. In addition, we showed that in using RNAi, these molecules are both involved in the maintenance of the immature state of the DCs. Taken together, these data suggest that Tmem176B and Tmem176A associate to form multimers and restrain DC maturation. Therefore, these two molecules may represent valid targets to regulate DC function. *J. Leukoc. Biol.* **88**: 507–515; 2010.

Introduction

DCs represent professional APCs able to respond to danger signals and to induce efficient, naïve T cell activation. The im-

munostimulatory function of DCs can vary depending on their subtypes, their activation and maturation state, and the micro-environment within which they are located [1]. Immature DCs, on exposure to microbial products or proinflammatory cytokines, up-regulate costimulatory molecules, secrete cytokines, and elicit strong T cell priming. In contrast, in the absence of inflammatory signals or in the presence of immunomodulatory agents, such as IL-10 or TGF- β , DCs remain in an immature or resting state, characterized by low expression of costimulatory molecules and inflammatory cytokines. This “immature” state contributes to the silencing of antigen-specific T cells or the differentiation of regulatory T cells [2]. The comprehension of the mechanisms involved in the functional differentiation of immunostimulatory or tolerogenic DCs represents a crucial aim of research to develop strategies to manipulate an immune response toward immunity or tolerance [3]. We previously identified an “unknown” molecule, Tmem176B (which we called TORID initially), as overexpressed by myeloid cells infiltrating a tolerated heart allograft in the rat [4]. We demonstrated that Tmem176B expression was strictly associated with the immature state of the DCs and that its overexpression by viral transduction decreases their maturation status and renders the cells resistant to the maturation induced by LPS [4]. These results suggested a role for Tmem176B in the immature state of the DCs. The human ortholog of Tmem176B (previously named LR8) was found initially to be expressed in a lung fibroblast subpopulation expressing the receptor for the collagen domain of the C1q molecule, and its mouse ortholog (previously named Clast1) was identified as up-regulated in B cells after stimulation by CD40 ligand [5]. Tmem176B KO mice have been generated and described to develop ataxia sporadically, as a result of a defect in cerebellar granules [6]. However, the function of Tmem176B remains unknown, and no study about immune cells was reported.

Abbreviations: AU=arbitrary unit(s), BMDC=bone marrow-derived dendritic cell, cDC=conventional dendritic cell, Cub=C-terminal half of ubiquitin, DC=dendritic cell, HPRT= hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, KO=knockout, MS4A=membrane-spanning four-domains subfamily, NCBI=National Center for Biotechnology Information, NubG=N-terminal half of ubiquitin, pDC=plasmacytoid dendritic cell, poly IC=polyinosinic:polycytidylic acid, qRT-PCR=quantitative RT-PCR, RNAi=RNA interference, TLR4-L=TLR4-ligand

1. Current address: H. Lee Moffitt Cancer Center, Dr. Gabrielovich Laboratory, 12902 Magnolia Dr., MRC-2068E, Tampa, FL 33612, USA

2. Correspondence: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 643, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. E-mail: elise.chiffolleau@univ-nantes.fr

TABLE 1. Oligonucleotides Used in This Study

5' to 3' Oligonucleotide sequences			
Mice HPRT	Forward	CGTGATTAGCGATGATGAACC	
	Reverse	ATCCAGCAGGTCAGCAAAGA	
Mice Tmem176B	Forward	CATCAGCATCCACATCCACC	
	Reverse	ACTCCAGCTAGAATTGCCACAG	
Mice Tmem176A	Forward	TCCTTCACAAGAAACGGGGT	
	Reverse	TCTTCGGGAACTGGAGTGGT	

In this study, we investigated possible interacting partners of Tmem176B and show that Tmem176B can interact with itself and with Tmem176A, a very similar protein. Therefore, we analyzed expression and regulation of these two molecules in mice and their role in DC maturation. Indeed, the molecular mechanisms by which modulation of DC maturation can occur are important to decipher to offer new targets to modulate an immune response.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Six- to 8-week-old C57BL/6 and Balb/c mice were obtained from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and maintained in an animal facility under standard conditions, according to our institutional guidelines.

Reagents and flow cytometry

Cells were grown in RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine (Gibco), and 50 µM 2-ME (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Purified, unlabeled FITC-, PE-, PerCP-Cy5.5-, Pe-Cy7-, or allophycocyanin-labeled antibodies were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA, USA) and include anti-CD45R (B220), anti-CD3, anti-CD11c, anti-class II MHC (I-A^b), anti-CD11b (Mac1), anti-Gr1, anti-DX5, anti-CD25, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD89, anti-CD86, anti-CD40, and anti-class I MHC. Cells were sorted on a FACSAria (BD Biosciences) or analyzed on a FACS LSRII (BD Biosciences) using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Generation of BMDCs

BMDCs were generated using the method described by Lutz et al. [7]. Briefly, C57BL/6 marrow was sieved through a 100-µm nylon mesh in complete medium, red cells lysed using ammonium chloride, and cells plated at $2 \times 10^6/10$ cm bacteriological petri dishes in complete medium, supplemented with 10 ng/ml murine rGM-CSF, supplied as a culture supernatant. Medium (10 mL) was added on Day 3, and half of the medium was replaced on Day 6. Finally, BMDCs were harvested on Day 8 by gentle pipetting. For maturation, 0.1 µg/ml LPS (Sigma-Aldrich) or 12.5 µg/mL poly I:C (Sigma-Aldrich) was added on Day 8, and cells were harvested after 10 or 24 h of stimulation.

Cell separation

Lymphoid cells

Cell suspensions from spleens were subjected to ammonium chloride to lyse erythrocytes and then labeled using the appropriate antibodies. CD4⁺ T cells (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻), CD8⁺ T cells (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺), NK cells (CD3⁻ DX5⁺), and B cells (CD3⁺ CD45R⁺) were then purified from total spleen by flow cytometry.

Myeloid cells

Cell suspensions from spleens were subjected to ammonium chloride to lyse erythrocytes, and then, T and B cell depletion was achieved by using anti-CD5 and anti-CD19 antibodies and anti-rat IgG-coated magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway), according to the manufacturer's recommendations. cDC (CD11c⁺ Hi), pDC (CD11c⁺ Lo CD45R⁺), granulocytes (Gr1⁺ CD11b⁺ CD45R⁻), and monocytes/macrophages (CD11b⁺ Gr1⁻ CD45R⁺) were then purified by flow cytometry. The purity of the sorted cells was >98%.

Split-ubiquitin yeast two-hybrid system

A regulatory T cell yeast split-ubiquitin library, derived from cDNA of peptide and TGF-β-stimulated A1.RAG^{-/-} T cells, was a gift of Prof. Herman Waldmann (Oxford University, UK). The split-ubiquitin yeast two-hybrid system has been performed as described previously [8]. Briefly, the library "DBYT.HL2/SubG-x" was directionally cloned into the library vector pPR3-N (Dualsystems Biotech, Zurich). The bait construct was made by amplification of the coding sequence of Tmem176B by RT-PCR from RNA derived from mouse splenocytes using the primers in Table 1. This was cloned into the bait vector pBT3-STE (Dualsystems Biotech). Bait and library constructs were transformed into the yeast strain NM51 [MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 ura3::(lexAop)8-LacZ ade2::(lexAop)8-ADE2 GAL4] using standard procedures. The pro-

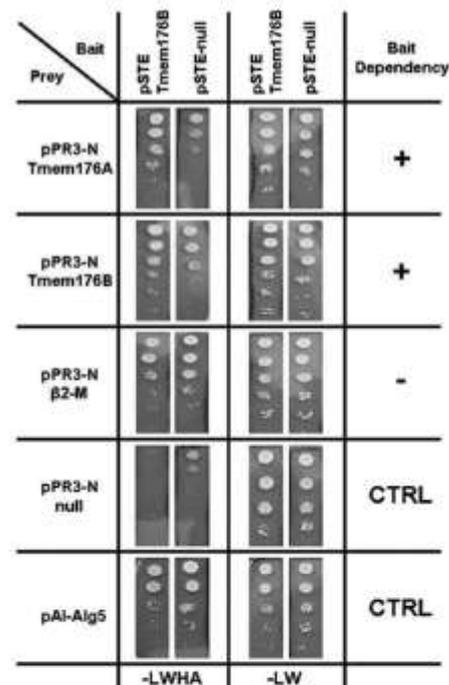


Figure 1. Interacting partners of Tmem176B. Three clones, Tmem176A, Tmem176B, and β2-microglobulin (β2-M), were selected from the screening of a split-ubiquitin yeast two-hybrid system and subjected to a bait-dependency test to confirm the interaction as described in Materials and Methods. Representative pictures illustrate the bait tests for Tmem176B, Tmem176A, β2-microglobulin, vector null, and pAl-AIg5. Data are representative of three independent experiments. CTRL, Control.

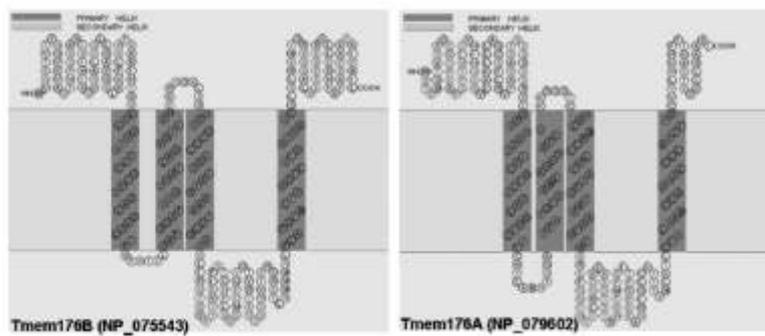


Figure 2. Comparison of Tmem176B and Tmem176A structures. Schematic representations of the amino acid sequence of Tmem176B and Tmem176A in mice using SOSUI representation (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>), showing N- and C-terminal orientation, the predicted transmembrane domains based on hydrophathy profiles.

tein of interest, Tmem176B (the bait), was fused to the Cub and the artificial transcription factor LexA-VP16. Protein of the library (the prey) was fused to the mutated NubG. When bait and prey interact together, the NubG and Cub are forced into close proximity, resulting in the reconstitution of split-ubiquitin, which is recognized immediately by a ubiquitin-specific protease, which then cleaves the polypeptide chain between Cub and LexA-VP16. As a result, the artificial transcription factor is released from the membrane and translocated to the nucleus, where it binds to the LexA operators situated upstream of a reporter gene via its LexA DNA-binding domain. Several resistant, positive clones were selected and sequenced. The resulting nucleotide sequences were analyzed using NCBI NBLAST. Transformants were grown on selective medium lacking leucine, tryptophan, histidine, and adenine, with addition of 20 mM 3-amino-1,2,4-triazole. Positive

clones were sequenced by colony PCR using the primer set pPR3NFOR, 5'-GTGCAAAATTCAGACAAGG-3', and pPR3NREV, 5'-AAGCGTGACATACTAATTAC-5'. Library plasmids were isolated from positive clones and retransformed into NM51 to test bait dependency. Prey cDNAs, which activated the histidine and adenine reporters in the presence of Tmem176B and not pOCW-Alg5 or pRT3STE (negative control vectors), were considered true interactors.

Transfection of BMDC with stealth RNAi duplexes, activation, and MLR

Two nonoverlapping "stealth RNAi" (StealthTM select RNAi, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) duplexes, specific for Tmem176B and

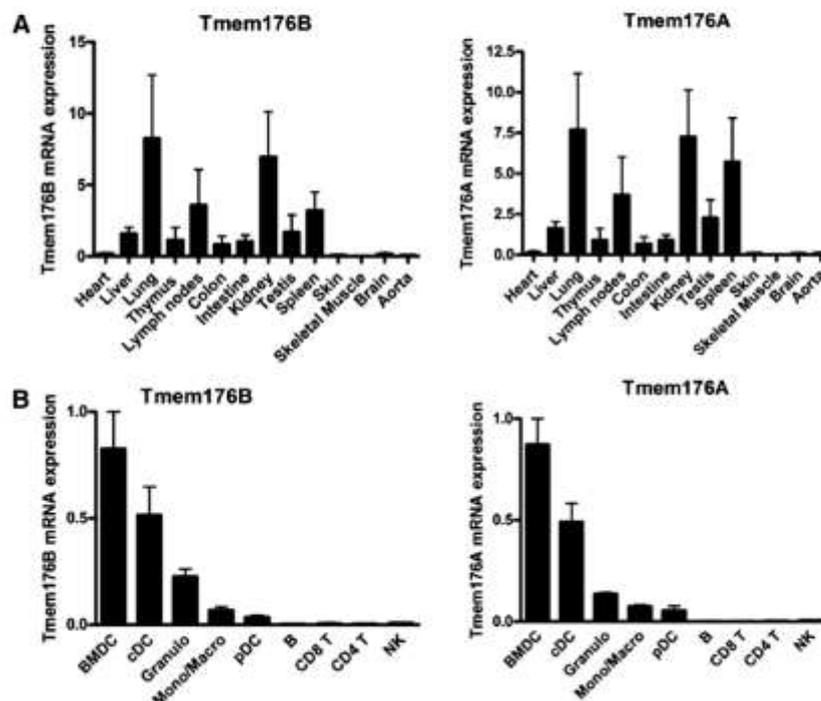


Figure 3. Expression of Tmem176B and Tmem176A in different organs and cell subtypes from naive mice. (A) Tmem176B and Tmem176A expression was assessed by qRT-PCR in different organs from naive mice; $n = 4$ in each group. Results are expressed in AU of Tmem176B or Tmem176A, normalized to HPRT \pm SEM, compared with the reference thymus (value=1), or (B) Tmem176B and Tmem176A expression was assessed by qRT-PCR in different, highly purified cells from naive mice ($n=5$). Granulo, Granulocytes; Mono/Macro, monocytes/macrophages; B, B cells; CD8 T or CD4 T, CD8⁺ or CD4⁺ T cells. Results are expressed in AU of Tmem176B or Tmem176A normalized to HPRT \pm SEM.

Tmem176A, were synthesized commercially by Invitrogen Life Technologies. Stealth Tmem176B RNAi 1 (5'-UGCAAUCAAGCAUGGACCCUGGUA-3'), Tmem176B RNAi 2 (5'-CGGCCAAAGAGAAGAUCCCUGCUAU-3'), Tmem176A RNAi 1 (5'-CGACCCUUCUUGUGGCUGCCAAGUUU-3'), and Tmem176A RNAi 2 (5'-GACUCUUCAUUGGAUGGUCACCA-3') were designed to target different coding regions of the respective mouse mRNA sequence (GenBank Accession Nos. NM_023056 and NM_025326, respectively, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>). A BLAST (NCBI database) search was carried out to confirm that the only targets of the two stealth RNAi duplexes were these molecules. At Day 8 of culture, 2 million adherent C57Bl/6 BMDCs were transfected with lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Life Technologies) and with 200 pmol control RNAi (medium GC content Stealth RNAi negative universal control, Invitrogen Life Technologies) or with RNAi specific for Tmem176B and Tmem176A. Cells were stimulated or not with poly I:C (12.5 μ g/ml; Sigma-Aldrich) for 48 h.

Two days following transfection, BMDCs were harvested and stained using anti-CD11c, class I MHC, class II MHC, CD80, CD86, or CD40 mAb for flow cytometry analysis or were plated with Balb/C lymph node-derived T cells in complete RPMI medium (ratio 1:4). Alternatively, Balb/C lymph node-derived T cells were labeled with CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Three days later, cells were pulsed for 8 h with 0.5 μ Ci/well methyl-[3H] thymidine (Amersham, Les Ulis, France), and thymidine incorporation was measured using a scintillant counter (Top Count NXT, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). CFSE-labeled cells were stained with anti-TCR, anti-CD4, and anti-CD25 antibodies and were analyzed by flow cytometry at Day 3 of culture.

RNA extraction and real-time qRT-PCR

Total RNA from tissues or cells was prepared using Trizol (Invitrogen Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed as described previously using a GenAmp 7700 sequence detection system and SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Applied, Courtaboeuf, France) [9]. The oligonucleotides used in this study are described in Table 1. HPRT was used as endogenous control genes to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta}$ comparative threshold method and expressed in AU [9].

Cytokine assays

Supernatants from cultures were harvested at 48 h for BMDCs transfected with control RNAi or specific Tmem176B or Tmem176A RNAi. Cytokines were measured by a murine ELISA set (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

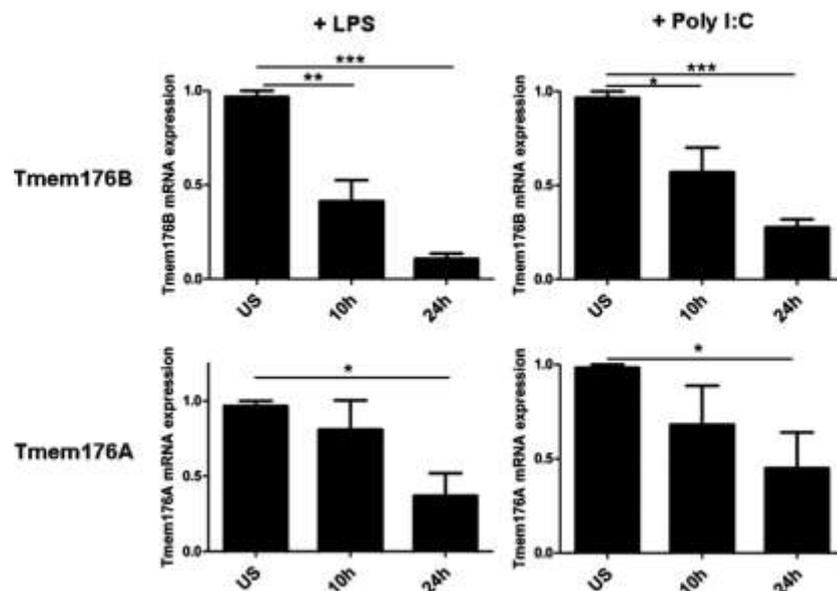
Statistical evaluation was performed using the Student's *t*-test for unpaired data, and results were considered significant if *P* values were <0.05. Data are expressed as mean \pm SEM.

RESULTS

Determination of interacting partners of Tmem176B

We described previously Tmem176B as being highly expressed by immature myeloid cells in rat and human, but nothing was known about the signaling of this molecule or its interaction with other proteins. To determine interacting partners of Tmem176B, we applied a split-ubiquitin yeast two-hybrid system using Tmem176B as bait against a murine expression library. Among the positive clones (~150), which we obtained by this technique, we identified the cDNA encoding for Tmem176A (in 29% of the clones), for the β 2-microglobulin (in 11% of the clones), and for Tmem176B (in 3% of the clones). The other cDNA sequenced were identified in <1% of the clones and were therefore considered as false-positives (data not shown). Then, we applied a bait dependency test to confirm the interaction of Tmem176B with Tmem176A with the β 2-microglobulin and with itself. As shown in Figure 1, we observed that the growth of the clones on interaction selection media (-LWHA) with pSTE-Tmem176B was high at the third

Figure 4. Regulation of Tmem176B and Tmem176A expression in DCs. Mice BMDCs were cultured for 10 or 24 h with TLR4-L (LPS, 0.5 μ g/ml) or TLR3-L (poly I:C, 12.5 μ g/ml). Tmem176B and Tmem176A expression was assessed by qRT-PCR, and results are expressed in AU of Tmem176B or Tmem176A normalized to HPRT \pm SEM, compared with the reference control RNAi (value=1; *n*=3; *, *P*<0.05; **, *P*<0.01; ***, *P*<0.001). US, Unstimulated.



and fourth dilution rate of the cotransformed yeast for the Tmem176A and Tmem176B tests and was positive compared with the negative control (pSTE null). In contrast, for the β 2-microglobulin, it was not more positive at the third/fourth dilution rate than the cotransformation with the negative control (pSTE null). Therefore, these data confirmed, by the bait-dependency test, the interaction of Tmem176B with Tmem176A and with itself, whereas the β 2-microglobulin was a false-positive of the screening.

Structures of Tmem176B and Tmem176A

By yeast two-hybrid screening, we identified Tmem176A as a protein interacting with Tmem176B. We have suggested previously that Tmem176B and Tmem176A may belong to the same family of genes, as their structures were very similar (28.5% identity of the protein structure in rat) [4]. Moreover, we have shown that Tmem176B and Tmem176A proteins exhibit some similarities of structure with the proteins of the MS4A family (10–20% identity of the protein structure) with a similar intron/exon organization and the four transmembranous domains [4]. However, unlike Tmem176A, the genes of the MS4A family are not located on the same chromosome as Tmem176B, suggesting that Tmem176B and Tmem176A may in fact constitute a different kind of family than the MS4A family.

In mice, we also observed that Tmem176B and Tmem176A molecules exhibit a similar protein structure with four transmembranous domains [32% of identity using Psi-Blast (NCBI); Fig. 2]. Interestingly, the two genes encoding these proteins are located adjacent to each other on the same chromosome but in an opposite direction (5'–3' sense), suggesting that these two genes are closely related. We demonstrated previously in the rat that Tmem176B was located in intracellular structures of the cells [4].

Taken together, the high similarity of protein structure, the chromosomal colocalization, and the fact that Tmem176B and Tmem176A can form multimers suggested that these molecules may be part of an intracellular, membranous complex.

Expression of Tmem176B and Tmem176A in murine organs and immune cells

Tmem176A was identified previously together with immunity-related genes, as expressed in mouse kidney proximal tubules exposed to proteinuria and as a possible autoantigen in hepatocellular carcinoma [10, 11]. However, no functional studies were described for this molecule.

To better characterize these two molecules, we analyzed their expression in different organs and in different isolated cell subpopulations from naive mice by qRT-PCR. We observed a high mRNA expression of Tmem176B in lung, kidney, lymph nodes, and spleen, a low expression in liver, thymus, testis, colon, and intestine, and a weak expression in heart, skin, muscle, brain, and aorta (Fig. 3A). This profile of expression in mice is similar to the one that we described previously in rat [4]. Interestingly, we observed exactly the same pattern of expression for Tmem176A in the organs, with the highest expression in lung, kidney, and spleen (Fig. 3A).

Similarly, in different immune cell subtypes from naive mice, we observed a high expression of Tmem176B and Tmem176A in BMDCs and in cDC (Fig. 3B). The expression of these two molecules decreases, respectively, in granulocytes, monocytes, and pDCs, and no expression was detected in resting NK, CD4⁺ T, CD8⁺ T, or B cells ($n=3$; Fig. 3B).

Taken together, these data demonstrate in mice, similarly to what we observed previously in rat, that Tmem176B is expressed preferentially in lung, kidney, and spleen and in myeloid cells [4]. Moreover, we showed that Tmem176A, a protein with similar structure, which interacts with Tmem176B, exhibits an identical expression profile.

Regulation of Tmem176B and Tmem176A expression in murine DCs

We demonstrated previously in rat and human that expression of Tmem176B was associated with the immature/testing state

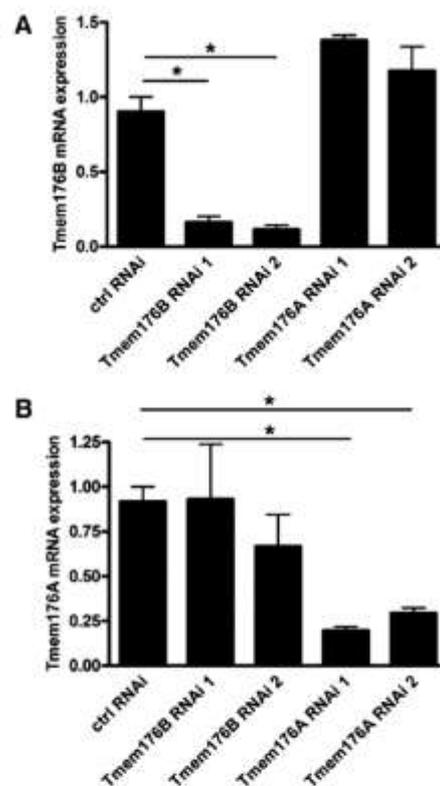


Figure 5. Inhibition of Tmem176B and Tmem176A by RNAi. Mice BMDCs were transfected with control RNAi or (A) with two Tmem176B- or (B) with two Tmem176A-specific RNAi for 48 h. Tmem176B and Tmem176A expression was assessed by qRT-PCR, and results are expressed in AU of Tmem176B or Tmem176A, normalized to HPRT \pm SEM, compared with the reference control RNAi (value=1; $n=3$; *, $P<0.05$).

of myeloid cells and that activation with proinflammatory stimuli strongly reduced expression of the transcripts [4]. Here, we investigated the regulation of expression of Tmem176B but also of Tmem176A in mice BMDCs in response to TLR triggering.

Mice BMDCs were stimulated with LPS (TLR4-L) or poly I:C (TLR3-L) for 10 or 24 h, and Tmem176B and Tmem176A mRNA expression was analyzed by qRT-PCR. We observed that LPS or poly I:C stimulation significantly down-regulated the expression of Tmem176B at 10 or 24 h of stimulation ($n=3$; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$; Fig. 4). Interestingly, we observed that the mRNA expression of Tmem176A was also down-regulated at 24 h of stimulation but at a lower extent than Tmem176B ($n=3$; *, $P<0.05$, Fig. 4). These results demonstrate in mice, similar to what we observed previously in rat

and human, that Tmem176B expression in DCs is down-regulated following inflammatory stimulation [4]. In addition, we show that expression of its interacting protein, Tmem176A, is down-regulated following inflammatory stimulation.

Tmem176B and Tmem176A do not regulate expression of each other

We then investigated whether expression of one of the molecules regulates the expression of the other. To test this possibility, we used specific reformed-type small interfering RNA (stealth RNAi), which allows long-term and efficient inhibition with low, nonspecific activation [12]. Two nonoverlapping stealth RNAi specific for Tmem176B and Tmem176A (medium GC content) were used as well as a universal stealth control RNAi (medium GC content) in mice BMDCs, and the

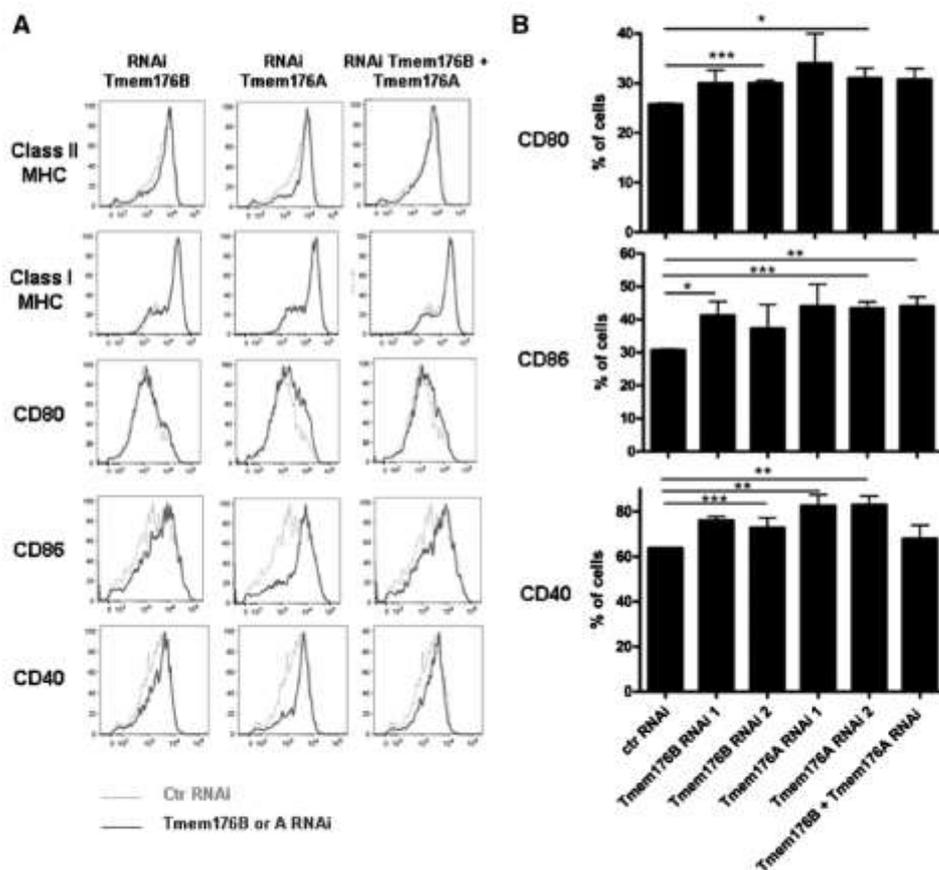


Figure 6. Effect of Tmem176B or Tmem176A inhibition on DC phenotype. Mice BMDCs were transfected with control (ctr) RNAi, with two Tmem176B- or two Tmem176A-specific RNAi, or with a mix of both (Tmem176B+Tmem176A) for 48 h. BMDCs were analyzed by flow cytometry. (A) Representative analysis histograms of BMDCs for class II MHC, class I MHC, CD80, CD86, or CD40. The same data were obtained with the two different RNAi and are representative of three independent experiments. (B) Histograms representing the percentage of BMDCs that express at high level CD80, CD86, or CD40 ($n=4$; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$).

level of expression of these molecules was analyzed by qRT-PCR. We observed in **Figure 5** that Tmem176B and Tmem176A RNAi suppressed the expression of their respective mRNA transcripts efficiently (>70% of inhibition; $n=3$; *, $P<0.05$; Fig. 5, A and B, respectively). Moreover, we observed that inhibition of Tmem176B or Tmem176A by specific RNAi did not modulate the respective expression of Tmem176A or Tmem176B in BMDCs (Fig. 5).

These results demonstrate that Tmem176B and Tmem176A do not regulate expression of each other.

Function of Tmem176B and Tmem176A in mice DCs

To determine the function of these two molecules, we transfected mice BMDCs with two different RNAi, specific for Tmem176B, Tmem176A, or both. We evaluated the effect of inhibition of expression on DC maturation and on the capacity to prime allogeneic T cells. To test the effect on matured DCs, we used poly I:C activation, which in contrast to LPS, decreases at a lower extent the expression of these two molecules (Fig. 4). We observed in immature BMDCs that inhibition of expression of Tmem176B, Tmem176A, or both increased the expression of the costimulatory molecules CD86 and CD40 compared with the control RNAi (Fig. 6A, representative histograms; Fig. 6B, histograms representing the percent of cells expressing these molecules at the highest level). No difference was observed in the expression of class II or class I MHC. In contrast, when the cells were matured with poly I:C, which induced an increase in the expression of costimulatory molecules, we did not retrieve the effect of the inhibition of expression of these molecules on the expression of CD80, CD86, or CD40 (data not shown). The increased expression of costimulatory molecules by poly I:C stimulation may be too high to observe an additional effect by the inhibition of Tmem176B or Tmem176A molecules.

Therefore, these results strongly suggest that Tmem176B and Tmem176A play a similar role in the maintenance of the immature state of the DC (e.g., ensuring a lower level of expression of costimulatory molecules).

We then analyzed the effect of the inhibition of Tmem176B or Tmem176A on the secretion of cytokines by unstimulated or poly I:C-stimulated DC. We observed no IL-6 secretion at all by unstimulated cells (data not shown) and no modification of IL-6 secretion by poly I:C-stimulated cells when these molecules were inhibited (Fig. 7; no p70 IL-12 or IL-10 was detectable; data not shown). The absence of effect on the expression of costimulatory molecules and on cytokine secretion in fully activated DCs suggests that these two molecules play their role only in very immature DCs.

We then analyzed the effect of the inhibition of Tmem176B, Tmem176A, or both on the capacity of DCs to promote allogeneic T cell priming. We observed that their inhibition in immature BMDCs increased proliferation of allogeneic lymph node cells (MLR) significantly ($n=3$; *, $P<0.05$; Fig. 8A). As the DCs are immature in these culture conditions, the differentiation of allogeneic effector cells is relatively low. Nevertheless, we confirmed these results using CFSE staining with enhanced, allogeneic CD4⁺ T cell proliferation when expression of Tmem176B, Tmem176A, or both was inhibited in DCs. In-

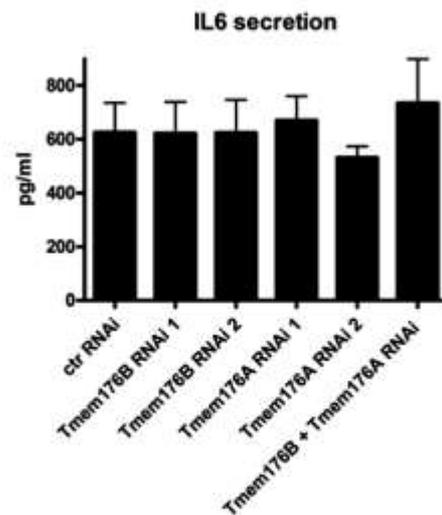


Figure 7. Effect of Tmem176B or Tmem176A inhibition on IL-6 secretion by DCs. Mice BMDCs were transfected with control RNAi, with two Tmem176B- or two Tmem176A-specific RNAi, or with a mix of both (Tmem176B+Tmem176A) for 48 h and stimulated with TLR3-L (poly I:C, 12.5 μ g/ml) for 48 h. IL-6 production was assessed in supernatants by ELISA ($n=3$).

deed, more allogeneic CD4⁺ T cells expressing CD25 (marker of T cell activation) proliferated in response to DCs, in which expression of Tmem176B, Tmem176A, or both had been down-regulated [results are expressed in percent or AU compared to control siRNA; $n=3$; * $P<0.05$ (Fig. 8); representative dot plots (Fig. 8B); histograms Fig. 8C]. Again, this effect on allogeneic CD4⁺ T cell activation was not retrieved with poly I:C-activated DCs (Fig. 8C). Taken together, these data demonstrate that Tmem176B and Tmem176A play a role in the maintenance of the immature state of the DCs by maintaining a lower expression level of costimulation molecules. However, when the DCs are more matured, these molecules are no longer influential.

DISCUSSION

We previously identified a new gene, Tmem176B (alias, TORID in rat, clast-1 in mice, and LR8 in human), of unknown function as strongly overexpressed in a model of allograft tolerance in rats [4]. We showed that Tmem176B possesses four transmembrane domains and was expressed in intracellular structures [4]. Moreover, we demonstrated that Tmem176B was highly expressed by immature monocytes and DCs in rat and human and that its expression was strongly down-regulated following inflammatory stimulation. In addition, we showed that overexpression of Tmem176B by viral transduction rendered rat DCs more immature and resistant to the maturation induced by LPS [4]. Collectively, these data sug-

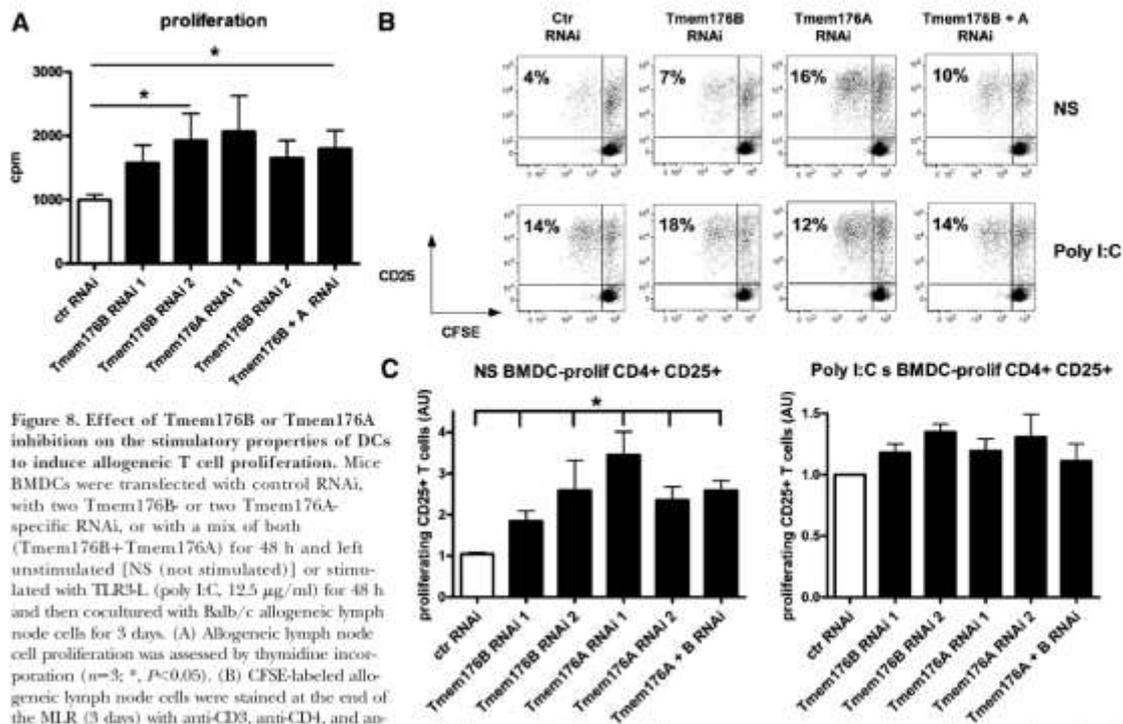


Figure 8. Effect of Tmem176B or Tmem176A inhibition on the stimulatory properties of DCs to induce allogeneic T cell proliferation. Mice BMDCs were transfected with control RNAi, with two Tmem176B- or two Tmem176A-specific RNAi, or with a mix of both (Tmem176B+Tmem176A) for 48 h and left unstimulated (NS (not stimulated)) or stimulated with TLR3L (poly I:C, 12.5 μ g/ml) for 48 h and then cocultured with Balb/c allogeneic lymph node cells for 3 days. (A) Allogeneic lymph node cell proliferation was assessed by thymidine incorporation ($n=3$; *, $P<0.05$). (B) CFSE-labeled allogeneic lymph node cells were stained at the end of the MLR (3 days) with anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD25 antibodies and were analyzed by flow cytometry. (B) Representative dot plots (data are representative of three independent experiments), and (C) histograms represent the percentage of proliferating CD25⁺ T cells compared with the reference control RNAi (value=1; $n=3$; *, $P<0.05$).

gested a role for Tmem176B in the maintenance of the immature state of the DCs. To gain insight into the functional role of this molecule, we searched for proteins interacting with Tmem176B using the yeast two-hybrid system. Interestingly, we observed that Tmem176B can interact with itself and with Tmem176A (alias, hca112), a gene that possesses similar structure to Tmem176B [10]. The Tmem176A protein also contains four transmembranous domains and has a similar intron/exon organization to Tmem176B. The similarity between the two proteins is 32% of identity in mice. Interestingly, the Tmem176A gene is located in the immediate vicinity of the Tmem176B gene on the same chromosome. These two genes are coded in the direction opposite to that of the overlapping 5'-untranslated regions in the putative first introns. The high homology of structure and the proximity on the chromosome suggest that these two genes may exert similar functions and may be controlled by similar regulations. We investigated the profile of expression of Tmem176A in mice and observed that this molecule displays a similar profile of expression and regulation to Tmem176B, with an expression in immature monocytes and DCs and a down-regulation following proinflammatory stimulation. We observed that these two molecules are poorly expressed in skin, an organ rich in Langerhans DCs, and in pDCs and NK, B, and T cells. These data suggest that Tmem176B and Tmem176A are preferentially expressed in

cells of the myeloid lineage. Tmem176A has been described poorly so far. This gene has been identified to be overexpressed in mouse kidney proximal tubules exhibiting proteinuria, together with genes involved in metabolism, degradation pathway, or regulator of inflammation [10]. Moreover, Tmem176A was identified as a tumor autoantigen in patients with hepatocellular carcinoma, suggesting a possible role for this protein in the transformation, metastasis, or immune evasion of tumors [11]. These data also suggest a role for this molecule in immune activation of the cells. We demonstrate here that Tmem176A interacts with Tmem176B possibly to form multimers and that these two molecules exhibit similar profiles of expression and regulation. In addition, we showed by RNAi that inhibition of Tmem176A or Tmem176B molecules increased the expression of costimulatory molecules and the subsequent activation of allogeneic T cells. These data suggest that these two molecules are part of a complex located in intracellular, membranous structures, which may play a role in the maturation of the DCs. Interestingly, Tmem176B KO mice have been generated and reported to develop sporadic ataxia as a result of a defect in the generation of the cerebellar granule cell [6]. No functional study about immune cells has been reported, and unfortunately, we cannot have access to these mice. Interestingly, the same phenotype of ataxia is retrieved in mice deficient in ion channels [13]. For example, a defect

in the maturation of granule cells has also been observed in mice deficient in Numb [14, 15], which is a molecule that regulates cell differentiation, endocytic recycling, and intracellular trafficking by a mechanism involving Ca^{2+} influx and MAPK activation by specific channels [14–17]. Ion channels have been shown recently to play important roles in immune function of various types of cells by regulating their activation, proliferation, or migration [18–22]. Interestingly, it has been shown recently that DCs express numerous ion channels, which were described initially to be highly expressed in the nervous system [23]. Moreover, a switch of ion channel expression in DCs during the maturation step has been shown, which regulates their functional activities [20, 23]. As Tmem176B and Tmem176A exhibit their structure in four transmembranous domains, and these two molecules can interact together, this suggests that these two molecules may also be part of a membrane ion channel. By influencing intracellular signaling events, these ion channels may play a determinant role in the nervous system but also in the fine-tuning of DC maturation.

The molecular mechanisms by which these two molecules exert their function remain to be elucidated but may help to determine new targets for the therapeutic modulation of DC maturation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the "Roche Organ Transplantation Research Foundation" (ROTRF), a European FP6 Grant Riset "Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance," and the association "Vaincre la Mucoviscidose." T.C. was supported by a fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche." S.C., H.W., and M.-C.C. were Riset Investigators.

AUTHORSHIP

T.C., L.L.T., D.H., and A.L. performed the experiments. M.H., F.H., S.C., H.W., and M.-C.C. were responsible for intellectual and technical input. E.C. was responsible for the concept, experimental design, and supervision; and for preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Coombes J. L., Power, F. (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 435–446.
2. Ohmachi, C., Pullner, A., King, S. B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., Voehringer, D. (2009) Coexistent ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J. Exp. Med.* **206**, 549–559.
3. Morelli, A. E., Thomson, A. W. (2007) Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 610–621.
4. Louvet, C., Chiffolleau, E., Heslan, M., Tesson, L., Heslan, J. M., Brion, R., Beriou, G., Gaillonnetou, C., Khalife, J., Aragon, L., Cuniri, M. C. (2005) Identification of a new member of the CD29/FcγRIIb family over-expressed in tolerated allografts. *Am. J. Transplant.* **5**, 2143–2155.
5. Liron, J., Rose, T. M., Raghu, G., Narayanan, A. S. (1999) Isolation of a gene product expressed by a subpopulation of human lung fibroblast by differential display. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 327–331.
6. Maeda, Y., Fujimura, I., O-Wang, J., Hatano, M., Sakamoto, A., Arima, M., Ebura, M., Ito, H., Yamashita, T., Saisho, H., Tokuhisa, T. (2006) Role of Clas1 in development of cerebellar granule cells. *Brain Res.* **1104**, 18–26.
7. Lutz, M. B., Suri, R., Nümi, M., Ogbrie, A. L., Kunkusch, N., Rosner, S., Schuler, G., Austyn, J. (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**, 1815–1822.
8. Howie, D., Nolan, K. F., Daley, S., Butterfield, E., Adams, E., Garcia-Rueda, H., Thompson, C., Saunders, N. J., Cobbold, S. P., Tone, Y., Tone, M., Waldmann, H. (2009) MS4A4B is a G1TR-associated membrane adapter, expressed by regulatory T cells, which modulates T cell activation. *J. Immunol.* **183**, 4197–4204.
9. Louvet, C., Heslan, J. M., Merisio, E., Souffillon, J. P., Cuniri, M. C., Chiffolleau, E. (2004) Induction of fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* **78**, 1259–1266.
10. Nakajima, H., Takenaka, M., Kasimori, J. Y., Nagasawa, Y., Kosugi, A., Kawamoto, S., Imai, E., Hori, M., Okubo, K. (2002) Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. *Kidney Int.* **61**, 1577–1587.
11. Wang, Y., Han, K. J., Ping, X. W., Vazghan, H. A., Qi, W., Dong, X. Y., Peng, J. R., Zhao, H. T., Liu, J. A., Leng, X. S., Cobon, J., Burgess, A. W., Chen, W. F. (2002) Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J. Immunol.* **169**, 1102–1109.
12. Klant, A. R., Klinger, G., Zech, D., Paul-Klausch, B., Renno, J. H., Schmidt, J., Malchau, G., Wieleckens, K. (2007) RNAi in primary human chondrocytes: efficiencies, kinetics, and non-specific effects of siRNA-mediated gene suppression. *Biochimica* **35**, 321–328.
13. Tomlinson, S. E., Hanna, M. G., Kullmann, D. M., Veronica Tan, S., Burke, D. (2009) Clinical neurophysiology of the episodic auras: insights into ion channel dysfunction in vivo. *Clin. Neurophysiol.* **120**, 1768–1776.
14. Klein, A. L., Zilian, O., Suter, U., Taylor, V. (2004) Murine Numb regulates granule cell maturation in the cerebellum. *Dev. Biol.* **266**, 161–177.
15. Aravanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770–776.
16. Smith, C. A., Dho, S. E., Donaldson, J., Tepas, U., McGlade, C. J. (2004) The cell fate determinant Numb interacts with EHD/Rme-1 family proteins and has a role in endocytic recycling. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3668–3708.
17. Lu, C. B., Fu, W., Xu, X., Marson, M. P. (2009) Numb-mediated neurite outgrowth is isoform-dependent, and requires activation of voltage-dependent calcium channels. *Neuroscience* **161**, 403–412.
18. El Chemaly, A., Okochi, Y., Sasaki, M., Arnaudou, S., Okamura, Y., Demareux, N. (2010) VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification. *J. Exp. Med.* **207**, 129–139.
19. Salzer, R. B., Watkins, S. C. (2009) Dendritic cell altered states: what role for calcium? *Immunol. Rev.* **231**, 278–288.
20. Moeggo, D., Capasso, M., Musser, B., Cherny, V. V., Rios, E., Dyer, M. J., DeCoursey, T. E. (2009) Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 18922–18927.
21. Villalonga, N., David, M., Bielanska, J., Vicente, R., Comes, N., Valenzuela, C., Felipe, A. (2010) Immunomodulation of voltage-dependent K⁺ channels in macrophages: molecular and biophysical consequences. *J. Gen. Physiol.* **135**, 135–147.
22. Schaffl, U. Y., Dixit, N., Procyk, E., Yamashita, L., Tse, T., Simon, S. I. (2010) Orai1 regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow. *Blood* **115**, 657–666.
23. Ziros, E., Kis-Toth, K., Højdu, P., Gospar, R., Bielanska, J., Felipe, A., Rajnavolgyi, E., Panyi, G. (2009) Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells. *J. Immunol.* **183**, 4489–4492.

KEY WORDS:
cell activation · antigen presentation

The C-Type Lectin-Like Receptor CLEC-1, Expressed by Myeloid Cells and Endothelial Cells, Is Up-Regulated by Immunoregulatory Mediators and Moderates T Cell Activation¹

Pamela Thebault, Natacha Lhermite, Gaëlle Tilly, Laëticia Le Texier, Thibaut Quillard, Michele Heslan, Ignacio Anegón, Jean-Paul Soulillou, Sophie Brouard, Beatrice Charreau, Maria-Cristina Cuturi, and Elise Chiffoleau²

C-type lectin receptors have recently been described as playing crucial roles in immunity and homeostasis since these proteins are able to recognize pathogens as well as self-Ags. We identified the C-type lectin-like receptor-1, CLEC-1, as being overexpressed in a model of rat allograft tolerance. We previously described in this model the expression of numerous cytoprotective molecules by graft endothelial cells and their interplay with regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. In this study, we demonstrate that CLEC-1 is expressed by myeloid cells and specifically by endothelial cells in tolerated allografts and that CLEC-1 expression can be induced in endothelial cells by alloantigen-specific regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. Analysis of CLEC-1 expression in naive rats demonstrates that CLEC-1 is highly expressed by myeloid cells and at a lower level by endothelial cells, and that its expression is down-regulated by inflammatory stimuli but increased by the immunoregulators IL-10 or TGFβ. Interestingly, we demonstrate in vitro that inhibition of CLEC-1 expression in rat dendritic cells increases the subsequent differentiation of allogeneic Th17 T cells and decreases the regulatory Foxp3⁺ T cell pool. Additionally, in chronically rejected allograft, the decreased expression of CLEC-1 is associated with a higher production of IL-17. Taken together, our data suggest that CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is enhanced by regulatory mediators and moderates Th17 differentiation. Therefore, CLEC-1 may represent a new therapeutic agent to modulate the immune response in transplantation, autoimmunity, or cancer settings. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 3099–3108.

The C-type lectins are a superfamily of proteins containing at least one C-type lectin domain that have been classified into different groups depending on the arrangement of their C-type lectin domains (1). C-type lectin proteins have been shown to act as pattern recognition receptors for pathogens, playing important roles in innate immunity and in the subsequent instruction of the adaptive immune response by stimulating cytokine secretion or T cell priming (1, 2). Moreover, C-type lectins have also been described to bind self-Ags or altered self-Ags and to play a direct role in the orchestration of the immune response. Among the vast C-type lectin superfamily, the C-type lectin-like proteins are a subgroup of receptors that possess the C-type lectin domain but lack calcium- or carbohydrate-binding elements (3). Recently, several studies demonstrated that C-type lectin-like receptors are not restricted to NK cells, but are expressed by many other cell

types, including myeloid cells and endothelial cells (ECs)³ (1). These receptors have diverse ligands and, by acting as activatory or inhibitory receptors, govern cellular activation (1). Among the C-type lectin-like receptors, a subgroup of receptors, the "Dectin-1 cluster," including the DECTIN-1, LOX-1, CLEC-1, CLEC-2, M1CL, CLEC12B, and CLEC9A genes, has recently been described to play important roles in immunity and homeostasis (3). Lox-1, expressed by monocytes and ECs, has been shown to recognize a variety of ligands, including bacteria, modified lipoproteins, activated platelets, hsp70, and apoptotic cells; it has also been shown to play a role in cell activation and in specific diseases such as arteriosclerosis or diabetes (4–6). Moreover, Dectin-1, which binds zymosan or an endogenous ligand expressed on T cells, enhances the activation of dendritic cells (DCs) and cytokine secretion or T cell priming (2, 7).

We identified C-type lectin-like receptor-1 (CLEC-1), one of the genes from the Dectin-1 cluster, as being overexpressed in tolerated grafts in an experimental model of heart allograft transplantation. We previously demonstrated in this model the specific expression of the cytoprotective molecules heme oxygenase-1, NO synthase, and IDO by graft ECs and their interplay with regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells to regulate local effector cells and to maintain

INSERM, Unité 643, Nantes, France; Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France; and Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

Received for publication November 11, 2008. Accepted for publication June 24, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale, the Fondation CENTAURE, and from Vaincre la Mucoviscidose. P. Thebault was supported by the Société Francophone de Transplantation, the Fondation Progreffe, and by the Fondation des Treilles.

²Address correspondence and reprint requests to Dr. Elise Chiffoleau, INSERM, Unité 643, Centre Hospitalier Universitaire de Hôtel-Dieu, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes, France. E-mail address: Elise.Chiffoleau@univ-nantes.fr

³Abbreviations used in this paper: EC, endothelial cell; AU, arbitrary unit; BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; CLEC-1, C-type lectin-like receptor-1; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DC, dendritic cell; DST, donor-specific transfusion; HAEC, human aortic endothelial cell; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; RNAi, RNA interference.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/1833099-10\$15.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.1093/jimmunol/183/3099

tolerance (8–10). CLEC-1 is an orphan receptor that has previously been described to be expressed by DCs and ECs in humans (3, 11). However, its function has not been described so far, and its ortholog in rodents has not been characterized. CLEC-1, in contrast to most of the members of this family, does not contain ITAM or inhibitory motifs, but rather contains one tyrosine residue in its cytoplasmic portion. Additionally, CLEC-1, like NKG2A or NKG2C, seems to require an additional chain to form a complex at the membrane surface of cells (3, 11).

In this study, we analyze the expression of CLEC-1 in rodents and evaluate for the first time the function of CLEC-1 in the regulation of an immune response.

Materials and Methods

Animals and transplantation

Rats were purchased from the Centre d'Élevage Janvier and maintained in an animal facility under standard conditions according to our institutional guidelines. The studies were reviewed and approved by the appropriate institutional review committee. LEW.1W (RT1a) or LEW.1A (RT1a) rats served as heart donors, and LEW.1A rats served as recipients. For allograft tolerance models, LF15-0195 (20 days) (Fournier Laboratories) or anti-donor class II Abs were administered to recipients as previously described (12, 13). Chronic allograft rejections were induced by two donor blood transfusions (donor-specific transfusion (DST)) before transplantation or by CD40-Ig administration as previously described (8, 14). Graft function was assessed by scoring pulsations through the abdominal wall for heart or by proteinuria for kidney transplants. For *in vivo* transfer experiments, a total of 20×10^6 CD4⁺ T cells from LEW.1A-tolerant LF15-0195-treated recipients or from LEW.1A naive rats were injected *iv*, into LEW.1A secondary syngeneic irradiated recipients (4 Gy, whole-body irradiation (Institut Fédératif de Recherche Thérapeutique 26, Nantes, France) 1 day before transplantation) on the day of LEW.1W or LEW.1A (syngeneic) cardiac transplantation.

Antibodies

The following hybridomas for rat mAbs were obtained from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, U.K.) and were used in cell depletion, cytometry, cell sorting, or immunohistology after coupling, if necessary, to FITC, biotin, or PE (BioAtlantic): OX6 (class II MHC), R73 (TCR $\alpha\beta$), OX39 (CD25), W3/25 (CD4), OX62 (CD103), and OX41 (CD172a). B7.1-PE (CD80), B7.2-FITC (CD86), and OX6-allophycocyanin-Cy7 (MHC class II) were obtained from BD Biosciences. PECAM-1 (CD31) was obtained from Serotec, and Foxp3-allophycocyanin was obtained from CMIsciences. Biotin-anti-mouse IgG, Alexa Fluor 568 anti-mouse, FITC anti-rabbit, HRP-streptavidin, and PE-streptavidin were purchased from Vector Laboratories, and HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG was obtained from Pierce. Neutralizing Ab anti-rat IL-10 (R&D Systems) and anti-human TGF β (2G7, hybridoma) and irrelevant Ab (3G8, hybridoma) were used in *in vitro* experiments at 10 μ g/ml.

Generation of a polyclonal anti-rat CLEC-1 Ab

Three synthetic peptides, one (MQAKYSSTRDMLDCC-NH₂) corresponding to an 1–14 of the intracellular domain of CLEC-1 and two (DSITEKDERLGNMSR, CERVAGRVVPEELQ) corresponding to an 83–97 and 256–269, respectively, of the extracellular domain of CLEC-1, were used to immunize rabbits (NeoMPS). After three rounds of standard immunization, serum was collected and subjected to affinity purification on peptides with HiTrap NHS-activated high-performance columns (GE Healthcare). Specificity of the polyclonal anti-CLEC-1 Abs was tested by preincubating anti-CLEC-1 Abs with the three synthetic CLEC-1 peptides (20 μ g/ml; 30 min, 4°C) before performing immunohistology staining on heart allograft sections.

N-glycosidase treatment and Western blot

Fragments of heart, spleen, lung, and thymus from naive rats were lysed on ice in RIPA solution supplemented with protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich) and treated overnight with PNGase F (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Nitrocellulose membranes blocked with TBS (Tween 20-TBS) with 5% milk were incubated with rabbit anti-CLEC-1 (0.8 μ g/ml) or mouse anti- β -actin (0.2 μ g/ml) diluted in TBS-1% milk (overnight) and then with HRP-goat anti-rabbit (0.1 μ g/ml) or anti-mouse IgG (0.3 μ g/ml). Bands were revealed by

ECL (Amersham), exposed to Kodak film, and quantified with Kodak Digital Science Image Analysis 1D software.

Immunohistology

Cardiac tissue was snap-frozen in liquid nitrogen after embedding in OCT compound (Tissue Tek; Miles Laboratories). Cryostat sections (7 μ m) or cytopins of cells were fixed in acetone and incubated overnight with FITC-anti-CLEC-1 Abs (4 μ g/ml), followed by anti-rat PECAM-1 or CD172a (5 μ g/ml) and by Alexa Fluor 568 anti-mouse Abs and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories), and observed by fluorescence microscopy (Axioskop 2 Plus; Zeiss). Images were visualized ($\times 600$) and processed using the AxioVision Viewer program (Zeiss). For the quantification of CLEC-1 staining on transduced cells with RNA interference (RNAi), images of cell spot were acquired with Zeiss Apotome and AxioVision software using a 63 \times /1.4 objective lens. Positive cells were determined by counting 36 fields on each spot. The percentage of CLEC-1 positive cells was calculated by counting the number of cells positive for the CLEC-1 staining divided by the total number of cells (DAPI), for four different counters.

Cell purification, culture, and activation

Rat peritoneal macrophages were isolated by lavage of the peritoneal cavity with 5 ml of PBS. The collected cells were centrifuged and suspended in complete DMEM medium.

Rat bone marrow-derived DCs (BMDCs) were obtained as previously described (15). Briefly, bone marrow cells were cultured in RPMI 1640 complete medium: 10% endotoxin-free FCS (Perbio Science) and 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM HEPES, and 5×10^{-5} M 2-ME (all from Sigma-Aldrich), supplemented with rat IL-4 (4 ng/ml) and murine GM-CSF (1.5 ng/ml). At day 8, adherent immature BMDCs were collected, plated (1 million/ml), and stimulated with LPS (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich), recombinant rat IL-10 (20 ng/ml) (R&D Systems), recombinant human TGF β 1 (20 ng/ml) (R&D Systems), poly(I:C) (25 μ g/ml) (InvivoGen), or rat rIFN- γ (50 U/ml) (Serotec).

Rat splenic DCs (OX62⁺, MHC class II⁺), T cells (R73⁺), CD4⁺ CD25⁺ T cells, or regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells (R73⁺ W3/25⁺ OX39⁺) were purified by positive selection using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences) as previously described (16). Purity was >99%.

Rat EC lines of LEW.1W and LEW.1A origin were isolated as previously described (17) and plated overnight into 12-well plates (Nunc; Merck/EuroLab France) (1 million cells/well) in complete RPMI medium culture and highly purified CD4⁺ CD25⁺ or CD4⁺ CD25⁺ T cells from naive rats or from tolerant recipients were added (5×10^5 cells/well) to the EC cultures. Alternatively, for transwell assays, 2.5×10^5 LEW.1W ECs/well were added in the lower compartment of a 24-well plate, and in the upper compartment (separated by a 0.45- μ m pore size membrane (BD Biosciences)) we added 2.5×10^5 LEW.1W ECs/well with LEW.1A CD4⁺ CD25⁺ T cells from tolerant recipients. Twenty-four or 48 h later (for IDO or CLEC-1 quantification, respectively), the adherent ECs were washed several times and analyzed by quantitative RT-PCR for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), CLEC-1, and IDO expression.

Human aortic ECs (HAECs) were isolated as previously described (18). HAECs were cultured in cell growth medium supplemented with 10% FCS, endothelial cell growth supplement (0.4%), hydrocortisone (1 μ g/ml), human basic fibroblast growth factor (1 ng/ml), human epidermal growth factor (0.1 ng/ml), amphotericin B (50 ng/ml), and gentamicin (50 μ g/ml) (PromoCell) at 37°C and 5% CO₂. For experiments, HAECs used were between the third and sixth passages. Activation experiments were performed in 6-well plates using confluent HAEC monolayers. Cells were deprived for 18 h in endothelial cell growth medium supplemented with only 2% FCS before incubation with 100 U/ml recombinant human IFN- γ (Imukin; Boehringer Ingelheim) for 12–48 h.

Human DCs were generated as previously described (19). Briefly, monocytes were enriched by elutriation (>85% CD14⁺) and cultured for 6 days in medium supplemented with IL-4 (40 ng/ml) (AbCys) and GM-CSF (500 IU/ml) (AbCys). Then, DCs were harvested and cultured (1 million cells/ml) in plates coated with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Sigma-Aldrich) to prevent cells from adhering, and with LPS (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich), rhIL-10 (20 ng/ml) (R&D Systems) or rhTGF β 1 (20 ng/ml) (R&D Systems).

Transfection of BMDCs with Stealth RNAi duplexes, activation, and MLR

Two nonoverlapping Stealth RNAi (Stealth Select RNAi; Invitrogen) duplexes were synthesized commercially by Invitrogen with the help of tools available online (www.invitrogen.com): Stealth RNAi 1 (5'-CACCAUA

Table I. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	5' to 3' Sequence
Rat HPRT	
Forward	CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC
Reverse	TTCCGTGATGACACAAACATGA
Rat CLEC-1	
Forward	TTTGGTGTTCCTCGTTCGC
Reverse	AAGTTCACGCACAGTTTTACCG
Rat FoxP3	
Forward	CCAGGAAAGACAGCAACCTT
Reverse	CTGCTTGGCAGTGCCTTGAGAA
Rat IL-17	
Forward	TGCTGTGTGCTGCTACTGAACC
Reverse	AACTTCCCCTCAGCGTTGAC
Rat ROR γ t	
Forward	GCAGGAGCAATGGAAAGTCG
Reverse	CGCTGAGGAAGTGGGAAAA
Rat IDO	
Forward	GCTGCCTCCCATTTCTGTCTT
Reverse	TGCGATTTCCACCATTAGAGAG
Rat TGF β 1	
Forward	CTCAACACCTGCACAGCTCC
Reverse	ACGATCATGTTGGACAACCTGCT
Human HPRT	
Forward	CGAGATGTGATGAAGGAGATGG
Reverse	CCTGTTGACTGGTCAATACAATAGC
Human CLEC-1	
Forward	AAACAAGAAGACCTCGAATTTGC
Reverse	TCCTGGGCTGGTGCATCTATTA

AGCCUGUAUUCUGGAACA-3') and Stealth RNAi 2 (5'-GAAGUGGC AUGGGAAACAAUUGUUAU-3') were designed to target different coding regions of the rat CLEC-1 mRNA sequence (GenBank accession no. NM_001109253 at www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/). A BLAST (National Center for Biotechnology Information database) search was conducted to confirm that the only targets of the two Stealth RNAi duplexes were CLEC-1. At day 8 of culture, 2 million adherent LEW.1A BMDCs were transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) and with 200 pmol of control RNAi (medium GC content Stealth RNAi negative universal control; Invitrogen) or with RNAi specific for CLEC-1. Cells were stimulated with LPS (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) for 48 h.

Two days following transfection, LEW.1A BMDCs were harvested and stained using anti-OX6, B7.1, or B7.2 mAbs for flow cytometry analysis or were plated (1.5×10^4 cells/ml) with LEW.1W lymph node-derived T cells in complete RPMI medium. Alternatively, LEW.1W lymph node-derived T cells or highly purified CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ T cells were labeled with CFSE (Molecular Probes). Three days later, cells were pulsed for 8 h with 0.5 μ Ci/well [methyl-³H]thymidine (Amersham), and thymidine incorporation was measured using a scintillation counter (Top-Count NXT; PerkinElmer). CFSE-labeled cells were stained with anti-TCR, anti-CD4, and intracellularly with anti-Foxp3 Abs as previously described and were analyzed by flow cytometry at day 5 of culture (10). T cells or culture supernatants were harvested at day 3 or 5 of culture for quantitative RT-PCR analysis or cytokine measurement.

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA from tissues or cells was prepared using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed as previously described (20) using a GenAmp 7700 sequence detection system and SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems). The oligonucleotides used in this study are described in Table I. HPRT was used as an endogenous control gene to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (20, 21) and is expressed in arbitrary units (AU).

Flow cytometry analysis

Fluorescent labeling was measured using a FACS LSR II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Cytokine assays

Supernatants from cultures were harvested at 48 h for LPS-stimulated BMDCs transfected with control RNAi or specific CLEC-1 RNAi, or they

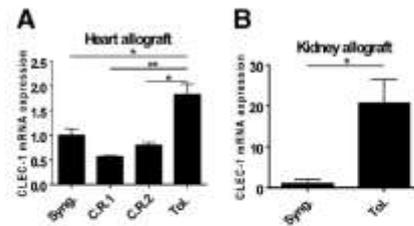


FIGURE 1. mRNA expression of CLEC-1 in rat tolerated allografts. mRNA expression of CLEC-1 was analyzed by quantitative RT-PCR. *A*, Cardiac syngeneic grafts (Syng.), chronically rejected allografts by DST treatment (C.R.1) or CD40 Ig treatment (C.R.2), or tolerated allografts by LF15-0195 treatment (Tol.) harvested at day 100 after transplantation ($n = 4$). *B*, Kidney syngeneic grafts (Syng.) or tolerated allografts by anti-donor class II Ab treatment (Tol.) harvested at day 100 after transplantation ($n = 5$). Results are expressed in AU of CLEC-1/HPRT transcript ratio \pm SEM and expressed as relative expression compared with the reference syngeneic grafts (value = 1). *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$.

were harvested at 72 h for MLRs. Cytokines were measured using a LINCOplex kit (RCYTO-80K; Millipore). Multiplex was performed according to the manufacturer's instructions on Luminex FIDIS.

Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using Student's *t* test for unpaired data, and results were considered significant if *p* values were < 0.05 . Data are expressed as means \pm SEM.

Results

CLEC-1 is overexpressed in tolerated allografts

As previously described, to identify new molecules that could play a role in allograft tolerance, we applied exhaustive rat DNA chips and compared long-term tolerated cardiac allografts (short-term treatment with LF15-0195) with allografts displaying signs of chronic rejection (DST treated) (8). We previously showed in this model the overexpression of numerous cytoprotective molecules by graft ECs and an accumulation of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells at the graft site (up to 50% of CD4⁺ T cells), with half of them expressing Foxp3 (8–10). We identified the CLEC-1 gene as overexpressed in tolerated allografts. By quantitative RT-PCR, we confirmed the up-regulation of CLEC-1 mRNA expression in tolerated allografts (Tol.) as compared with syngeneic grafts (Syng.) or to allografts with chronic rejection induced by two different treatments (C.R.1, DST treated; C.R.2, CD40 Ig treated) ($n = 4$; *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$; Fig. 1*A*). Additionally, we also observed a strong up-regulation of CLEC-1 mRNA expression in kidney tolerated allografts (Tol.) compared with syngeneic grafts (Syng.) in a model of anti-donor class II Ab administration in which was previously shown a high intragraft expression of IDO and Foxp3 ($n = 5$; *, $p < 0.05$; Fig. 1*B*) (13, 22).

These data demonstrate that CLEC-1 expression is up-regulated in several models of allograft tolerance, suggesting a role for CLEC-1 in regulatory mechanisms.

CLEC-1 is overexpressed by myeloid cells and ECs in tolerated allografts

To determine the cells expressing CLEC-1 in long-term tolerated allografts, we have generated a polyclonal anti-rat CLEC-1 Ab.

We observed by immunofluorescence on heart allograft sections that in tolerated allografts, CLEC-1 is expressed by numerous groups of myeloid cells (CD172a⁺) and by ECs in the graft vessels (PECAM-1⁺) (Fig. 2*A*, *a* and *b*, respectively). This staining by myeloid cells and ECs disappears when the Ab was preincubated

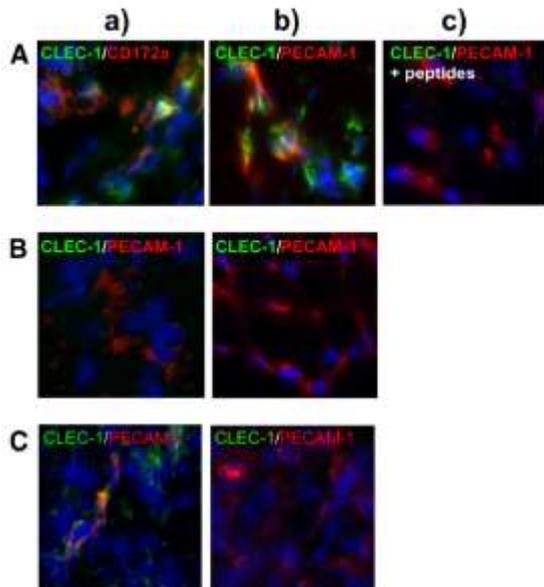


FIGURE 2. Subtypes of cells expressing CLEC-1 in tolerated allografts. Representative images of immunofluorescence merged staining for PECAM-1 (red) or CD172a (red) with CLEC-1 (green) and DAPI (blue). **A**, Long-term tolerated cardiac allografts for CLEC-1 and DAPI staining with (a) CD172a, (b) PECAM-1, and (c) PECAM-1 plus CLEC-1 peptides. **B**, Long-term cardiac (a) chronically rejected allografts and (b) syngeneic grafts for CLEC-1, DAPI, and PECAM-1 staining. **C**, Long-term kidney (a) tolerated allografts and (b) syngeneic grafts for CLEC-1, DAPI, and PECAM-1 staining. Original magnification, $\times 600$. Data are representative of three independent experiments.

with the synthetic peptides used for its generation, demonstrating the specificity of the staining (Fig. 2Ac). Interestingly, the high expression of CLEC-1 observed in graft ECs is specific to tolerated allografts, as no staining for CLEC-1 in ECs has been observed in cardiac allografts with chronic rejection or in syngeneic grafts (Fig. 2B, a and b, respectively).

We also observed CLEC-1 expression by myeloid cells and ECs (PECAM-1⁺) in kidney long-term tolerated allografts, whereas no staining by ECs was observed in kidney long-term syngeneic grafts (Fig. 2C, a and b, respectively).

These results demonstrate that CLEC-1 is overexpressed by the APCs, myeloid cells, and ECs in long-term tolerated allografts.

In naive rats, CLEC-1 is expressed by myeloid cells and ECs

To characterize CLEC-1 expression in rats, CLEC-1 mRNAs were assessed by quantitative RT-PCR in various tissues or cells from naive rats. We observed that CLEC-1 mRNA expression is high in the lung, in secondary lymphoid organs (lymph nodes and spleen), and in the aorta (Fig. 3A). A lower CLEC-1 mRNA expression was observed in the heart, and a poor expression was observed in the thymus.

These results were confirmed at the protein level by Western blot on deglycosylated organs with the polyclonal anti-rat CLEC-1 Ab that we have generated and that reveals an expected 32-kDa band (Fig. 3B, representative blot and quantification).

Moreover, in different rat cell populations, we observed a high mRNA expression of CLEC-1 in BMDCs and in peritoneal macrophages and a lower expression in an endothelial cell line and in splenic DCs (Fig. 3C). No expression of CLEC-1 was detected in T cells (Fig. 3C).

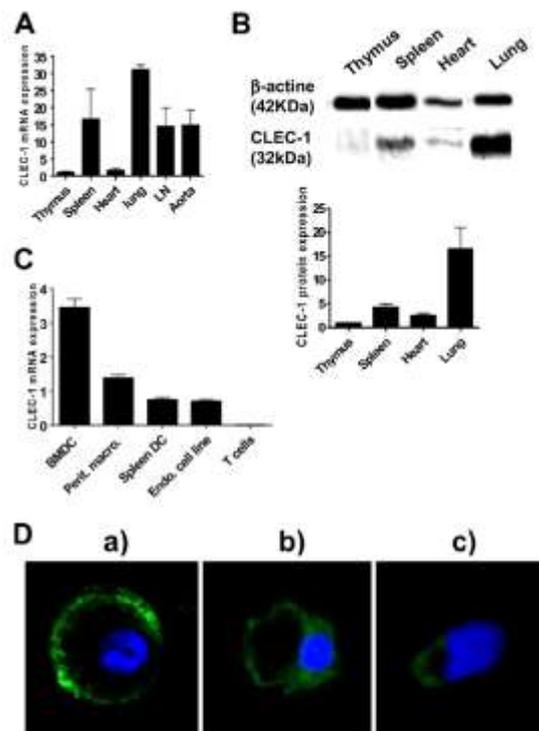


FIGURE 3. Expression of CLEC-1 in different organs and cell subtypes from naive rats. **A**, CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR in different organs from naive rats; $n = 3$ in each group. Results are expressed in AU of CLEC-1/HPRT \pm SEM compared with the reference thymus (value = 1). **B**, CLEC-1 protein expression was determined by Western blot in different organs from naive rats after deglycosylation (representative image) and quantified after normalization to β -actin (AU) ($n = 3$ in each group) compared with the reference thymus (value = 1). **C**, CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR in different cell subtypes from naive rats. Results are expressed in AU of CLEC-1/HPRT \pm SEM. Data are representative of three independent experiments. **D**, Representative images of immunofluorescence staining of rat (a) BMDCs, (b) macrophage, and (c) EC line for CLEC-1 (green) and DAPI staining (blue). Original magnification, $\times 600$. Data are representative of three independent experiments.

At the protein level, we observed by immunohistology that CLEC-1 is indeed more expressed in the myeloid cell BMDCs and macrophages than in the endothelial cell line and that its expression is at the cell surface (representative images in Fig. 3D).

These results demonstrate for the first time that in rodents, CLEC-1 is highly expressed by myeloid cells and, to a lower extent, by ECs and that its expression is at the cell surface.

CLEC-1 expression is down-regulated by inflammatory stimuli and increased by immunoregulatory mediators

To investigate the regulation of CLEC-1 expression, rat BMDCs were cultivated with different stimuli in vitro. As shown in Fig. 4A, expression of CLEC-1 is significantly decreased following LPS, IFN- γ , or poly(I:C) stimulation at 48 h of culture ($n = 3$; *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$). In contrast, following stimulation with the immunomodulators IL-10 or TGF β 1, expression of CLEC-1 is significantly increased at 48 h of culture ($n = 3$; *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$).

Similar results were observed in human cells HAECs or human monocyte-derived DCs (HuMoDC); CLEC-1 mRNA

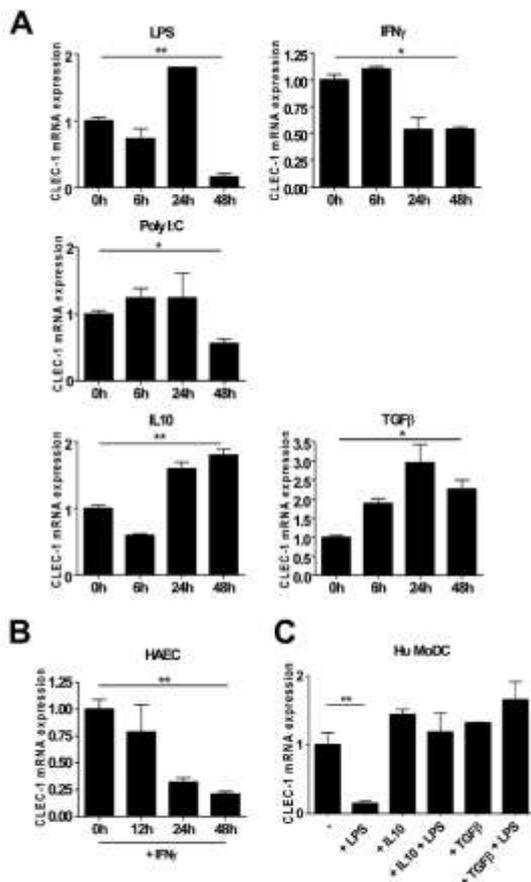


FIGURE 4. Regulation of CLEC-1 expression. **A**, Rat BMDCs were cultured for 6, 24, or 48 h with different stimuli, including LPS (1 μ g/ml), IFN- γ (50 U/ml), poly(I:C) (25 μ g/ml), rIL-10 (20 ng/ml), or rhTGF β 1 (20 ng/ml). CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR, and results are expressed in AU of CLEC-1/HPRT ($n = 3$; *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$). **B**, HAECs were stimulated with IFN- γ (100 U/ml) for 12, 24, or 48 h. CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR and results are expressed in AU of CLEC-1/HPRT ($n = 3$; **, $p < 0.01$). **C**, Human monocyte-derived DCs (HuMoDC) were stimulated with LPS (1 μ g/ml), rIL-10 (20 ng/ml), or rhTGF β 1 (20 ng/ml) for 24 h. CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR and results are expressed in AU of CLEC-1/HPRT ($n = 3$; **, $p < 0.01$).

expression is significantly down-regulated by inflammatory stimuli (IFN- γ in HAECs, LPS in monocyte-derived DCs) ($n = 3$; **, $p < 0.01$), whereas IL-10 or TGF β 1 increases the expression of CLEC-1 and renders the cells resistant to the down-regulation of CLEC-1 expression induced by LPS (monocyte-derived DCs) (Fig. 4, *B* and *C*, respectively).

These results demonstrate that CLEC-1 expression is down-regulated by inflammatory stimuli and increased by immunoregulatory mediators, suggesting an important role for CLEC-1 in immune response regulation.

Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients enhance CLEC-1 expression in donor-type ECs

We previously showed *in vitro* and *in vivo* that regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients were able to stimu-

late donor-type ECs to express IDO, a molecule required for the establishment of tolerance, demonstrating an interplay between graft ECs and regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells for the maintenance of tolerance (10). Here, we also observed that regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients but not regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from naive rats were able *in vitro* to increase significantly CLEC-1 mRNA expression in graft donor-type (LEW.1W) ECs ($n = 6$; **, $p < 0.01$; Fig. 5*Aa*). We observed a low induction in recipient-type (LEW.1A) ECs with regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients, but this expression is not significantly different with the one observed with regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from naive rats or with CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients ($n = 6$) (Fig. 5*Ab*). No induction of CLEC-1 expression was observed with CD4⁺CD25⁺ T cells from either naive rats or tolerant recipients ($n = 6$) (Fig. 5*Aa*).

Moreover, we observed that neutralization of IL-10, TGF β , or both with specific Abs did not further decrease CLEC-1 mRNA expression compared with the irrelevant control Ab ($n = 4$) (Fig. 5*Ac*). Indeed, the irrelevant control already decreased by itself CLEC-1 mRNA expression in ECs by a nonspecific mechanism.

Additionally, transwell experiments demonstrated that as for the one of IDO, induction of CLEC-1 expression requires cell contact (Fig. 5*A*, *c* and *d*). These data demonstrate that regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients are able *in vitro* to increase CLEC-1 expression in donor-type ECs by a cell contact-dependent mechanism.

Furthermore, we previously demonstrated *in vivo* that regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients, but not regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from naive rats, were able to transfer tolerance to a subsequent irradiated host (23). We demonstrated that following transfer, regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells accumulated in the new graft and induced the expression of IDO in graft ECs (10). Here, we also observed a specific expression of CLEC-1 in ECs in the new allogeneic graft following transfer of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients (Fig. 5*Ba*). No staining of CLEC-1 by ECs in syngeneic grafts was observed following transfer of T cells from tolerant recipients or from naive rats demonstrating donor-specific allorecognition (Fig. 5*B*, *b* and *c*, respectively).

Taken together, these data demonstrate that alloantigen-primed regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells that accumulated in the allografts are able to increase locally the expression of CLEC-1 in donor-specific APCs.

CLEC-1 alters T cell activation

To assess the function of CLEC-1, we used specific CLEC-1 reformulated-type small interfering RNA, or Stealth RNAi, which allows for efficient and long-term inhibition and which can reduce the cytotoxic IFN response unlike conventional small interfering RNA (24). Two nonoverlapping Stealth RNAi specific for CLEC-1 (medium GC content) were tested together with a universal Stealth control RNAi (medium GC content). To evaluate in DCs the effect of CLEC-1 inhibition on subsequent allogeneic T cell activation, we used LPS-stimulated BMDCs, which are able in these mature conditions to stimulate efficiently allogeneic T cells. Indeed, we have not been able with immature BMDCs or an EC line to induce an efficient allogeneic T cell stimulation.

We observed a strong inhibition of CLEC-1 mRNA expression (>80%) in DCs with the two CLEC-1-specific RNAi as compared with the control RNAi at 48 h following transfection ($n = 5$; **, $p < 0.01$; Fig. 6*Aa*). This strong inhibition of CLEC-1 expression was also confirmed at the protein level with the polyclonal Ab by immunohistology ($n = 5$; ***, $p < 0.001$; Fig. 6*Ab*).

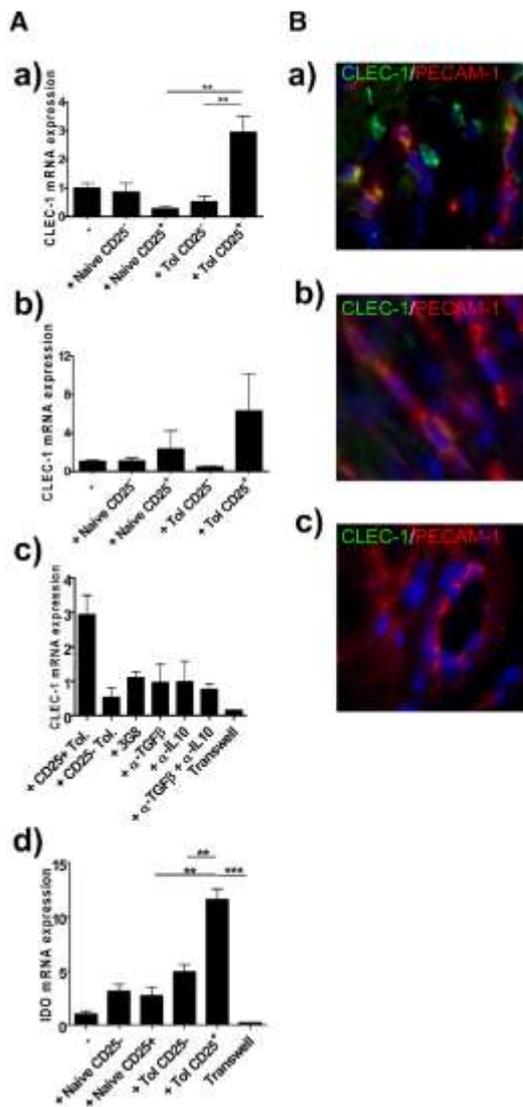


FIGURE 5. Regulation of CLEC-1 expression by alloantigen-induced regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. **A**, Rat EC lines of (a) donor (LEW.1W) or (b) recipient (LEW.1A) origin were coincubated with highly purified LEW.1A CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁻ T cells from naive rats or from tolerant recipients ($n = 6$). **c**, Alternatively, neutralizing anti-TGFβ, anti-IL-10, or both were added in co-cultures (10 μg/ml) ($n = 4$). For transwell assays, donor (LEW.1W) ECs were added in the lower compartment, and donor (LEW.1W) ECs and (LEW.1A) CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients were added in the upper compartment ($n = 4$). Twenty-four or 48 h later, respectively, for IDO (d) or CLEC-1 (c), ECs were washed and lysed for RNA extraction. CLEC-1 and IDO mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR in endothelial cells and results are expressed in AU of CLEC-1/HPRT. **B**, Representative images of immunofluorescence merged staining for PECAM-1 (red), CLEC-1 (green), and DAPI (blue) for long-term cardiac (a) tolerated allogeneic LEW.1W grafts from LEW.1A recipients transferred with regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from LEW.1A tolerant recipients, (b) syngeneic LEW.1A grafts from LEW.1A recipients transferred with LEW.1A regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells from tolerant recipients, and (c) syngeneic LEW.1A grafts transferred with T cells from LEW.1A naive rats. Original magnification, ×600. Data are representative of three independent experiments.

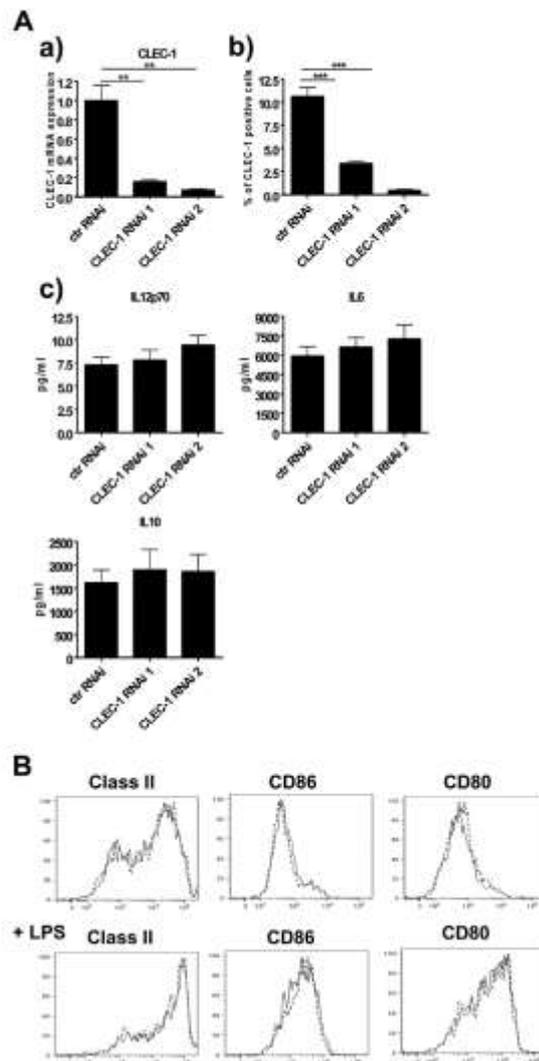


FIGURE 6. Effect of CLEC-1 inhibition on rat DC culture. Rat BMDCs were transfected with control Stealth RNAi or two CLEC-1-specific Stealth RNAi for 48 h and were stimulated with LPS (1 μg/ml) or left unstimulated. **A**, a, CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR and expressed in AU of specific gene/HPRT compared with the reference Stealth control RNAi (value = 1) ($n = 5$; **, $p < 0.01$). b, Percentage of CLEC-1-positive cells per field was determined by apoptotic counting ($n = 5$; ***, $p < 0.001$). c, LPS-induced IL-12p70, IL-6, and IL-10 production were assessed in the supernatant of cultures as described in *Materials and Methods* ($n = 5$). **B**, Representative histograms of flow cytometry analysis of BMDCs transfected with Stealth control RNAi (dotted line) or CLEC-1 specific RNAi (plain line) for class II MHC, CD80, or CD86. The same results were obtained with the two different CLEC-1-specific Stealth RNAi in five independent experiments.

We observed that CLEC-1 inhibition in DC culture does not modulate LPS-induced IL-12p70, IL-6, or IL-10 production or class II MHC, CD86, or CD80 expression ($n = 5$, Fig. 6, A and B). Therefore, the differences that will be observed following CLEC-1 triggering with these mature DCs will be not due to a defect in DC generation or maturation.

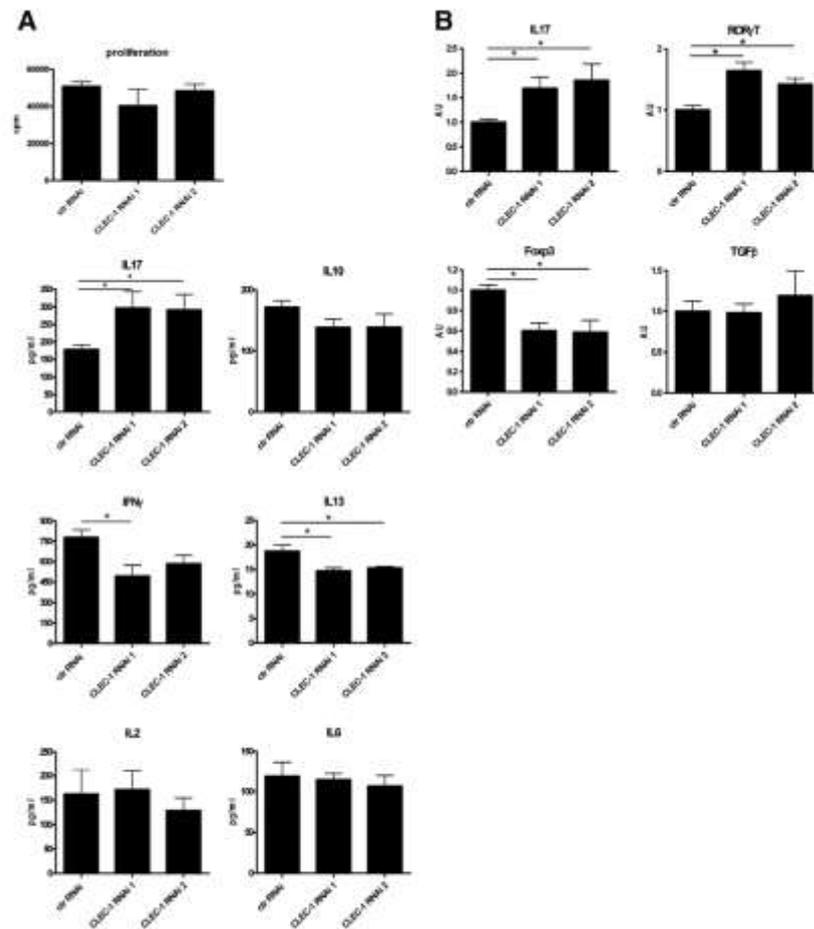


FIGURE 7. Effect of CLEC-1 inhibition on allogeneic T cell activation and cytokine production. LEW.1A rat BMDCs were transfected with control Stealth RNAi or two CLEC-1-specific Stealth RNAi constructs for 48 h and then cocultured with LEW.1W allogeneic T cells for 3 days. *A*, LEW.1W allogeneic T cell proliferation assessed by thymidine incorporation ($n = 4$) and IL-17, IL-10, IL-2, IFN- γ , IL-13, and IL-6 secretion assessed in supernatants of cultures as described in *Materials and Methods* ($n = 5$; *, $p < 0.05$). *B*, IL-17, ROR- γ , Foxp3, and TGF- β mRNA expression assessed by quantitative RT-PCR and expressed in AU of specific gene/HPRT compared with the reference Stealth control RNAi (value = 1) ($n = 5$; *, $p < 0.05$).

Interestingly, when these mature DCs were cocultured with allogeneic T cells in a MLR, we observed that CLEC-1 inhibition in DCs enhances significantly allogeneic T cell production of IL-17 (at both the protein and mRNA levels) and mRNA expression of the transcription factor ROR- γ ($n = 5$; *, $p < 0.05$), without modulating T cell proliferation or IL-2 secretion (Fig. 7). Additionally, CLEC-1 inhibition in DCs decreased significantly allogeneic T cell production of IL-13 and IFN- γ and decreased significantly mRNA expression of the transcription factor Foxp3 ($n = 5$; *, $p < 0.05$; Fig. 7). The increase in Th17 differentiation and the decrease in Foxp3 expression could have been due to a modulation of IL-6 or TGF- β expression; however, we observed no difference in the production of the both cytokines in the MLRs ($n = 5$) (Fig. 7).

CLEC-1 modulates regulatory CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cell activation

To investigate whether the decrease in Foxp3 mRNA expression observed at the end of the MLR with CLEC-1 down-regulated DCs was due to a decrease in the number of regulatory Foxp3⁺ T cells, we analyzed the allogeneic CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation by CFSE and Foxp3 staining in long-term T cell co-cultures (at day 5 of MLR). We observed that inhibition of CLEC-1 in DCs decreases significantly the percentage of Foxp3⁺CD4⁺ T cells retrieved at the end of the MLR culture (3% instead of 6%) and

increases the percentage of proliferating effector non-Foxp3 CD4⁺ T cells (36% instead of 23%) ($n = 5$; *, $p < 0.05$; Fig. 8, *Aa*, representative dot plots, and *Ab*). No difference in effector or regulatory Foxp3⁺ T cells was observed in the CD8⁺ T cells (Fig. 8, *Ac*, representative dot plots, and *Ad*). These data suggest that CLEC-1 regulates the balance between effector and regulatory T cells.

To determine whether this increase in effector CD4⁺ Th17 differentiation was due to a direct effect of CLEC-1 inhibition on effector T cell differentiation or an effect on regulatory T cell plasticity or function, we performed MLRs with highly purified CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ T cells. We observed that inhibition of CLEC-1 in DCs did not modulate the allogeneic proliferation of purified regulatory CD4⁺CD25⁺ or their expression of Foxp3 (maintained at high level only in cells that have proliferated) (Fig. 8*Ba*, representative dot plots). The allogeneic proliferation of purified CD4⁺CD25⁻ T cells was also not modified when CLEC-1 expression was down-regulated in DCs (Fig. 8*Bb*, representative dot plots).

Moreover, we did not observe differences in IFN- γ or IL-17 secretion in stimulated purified regulatory CD25⁺ or CD25⁻ CD4⁺ T cells when CLEC-1 expression was down-regulated in DCs ($n = 3$) (Fig. 8*B*, *c* and *d*, respectively). The expression of IL-6 was also not modified in MLRs with purified regulatory

3106

CLEC-1 MODERATES T CELL ACTIVATION

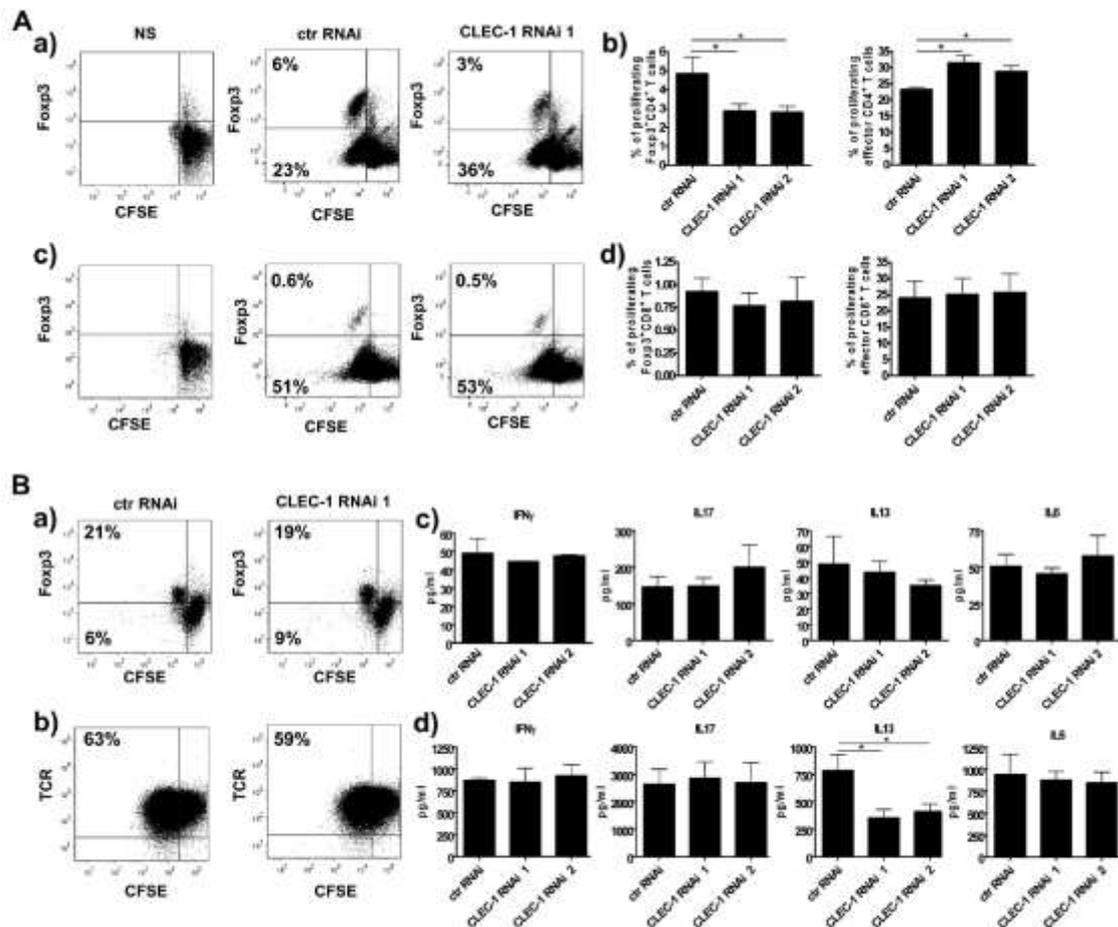


FIGURE 8. Effect of CLEC-1 inhibition on proliferation and cytokine production of regulatory CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells. LEW.1A rat BMDCs were transfected with control Stealth RNAi or two CLEC-1-specific Stealth RNAi constructs for 48 h and then cocultured with LEW.1W allogeneic T cells for 5 days. **A**, CFSE-labeled T cells were stained at the end of the MLR (5 days) with anti-TCR, anti-CD4, and anti-Foxp3 Abs and were analyzed by flow cytometry. Representative dot plots and histograms represent the percentage of proliferating Foxp3⁺ T cells or proliferating Foxp3⁻ effector T cells in (a) CD4⁺ or (b) CD8⁺ T cells that have not been stimulated with BMDCs as CFSE staining control. **B**, CFSE-labeled CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁻ T cells were stained at the end of the MLR with anti-TCR and/or with Foxp3 Abs and were analyzed by flow cytometry. Representative dot plots represent the percentage of (a) proliferating Foxp3⁺ T cells in purified CD4⁺CD25⁺ T cells or (b) T (TCR⁺) proliferating cells in purified CD4⁺CD25⁻ T cells. Data are representative of three independent experiments. IFN-γ, IL-17, IL-13, and IL-6 secretion were assessed in supernatants of co-cultures as described in *Materials and Methods* ($n = 3$; *, $p < 0.05$) in (c) stimulated CD4⁺CD25⁺ or in (d) stimulated CD4⁺CD25⁻ purified T cells.

CD25⁺ or CD25⁻ CD4⁺ T cells when CLEC-1 expression was down-regulated in DCs ($n = 3$) (Fig. 8B, c and d, respectively). Therefore, with isolated subpopulations of CD25⁺ or CD25⁻ CD4⁺ T cells, we did not retrieve the increase of IL-17 secretion observed with bulk T cells. These data demonstrate that the up-regulation of IL-17 observed with bulk T cells was not due to a direct effect on Th17 differentiation of naive T cells or to the plasticity of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. Interestingly, we retrieved the down-regulation of IL-13 expression in stimulated CD4⁺CD25⁻ T cells, suggesting that CLEC-1 acts directly on CD4⁺CD25⁻ T cells for the expression of IL-13 ($n = 3$; *, $p < 0.05$; Fig. 8Bd).

Taken together, these data demonstrate that CLEC-1 signaling on DCs modulates subsequent T cell activation by decreasing effector Th17 differentiation and favoring the regulatory Foxp3⁺

CD4⁺CD25⁺ T cell pool, but that effect is not due to a direct effect on differentiation of T cells but rather may be due to an effect on the suppression mediated by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells.

In tolerated allograft, the increased expression of CLEC-1 is associated with a low expression of IL-17 and a high expression of Foxp3

To evaluate whether there was a correlation between the increased expression of CLEC-1 and the expression of IL-17 and Foxp3 in long-term tolerated allografts, we compared Foxp3 and IL-17 mRNA expression in tolerated allografts and in chronically rejected allografts. Interestingly, we observed in tolerated allografts where the expression of CLEC-1 was increased ($n = 4$; **, $p < 0.01$; Fig. 1), that the mRNA expression of IL-17 was significantly lower and the one of Foxp3 higher than in chronically rejected

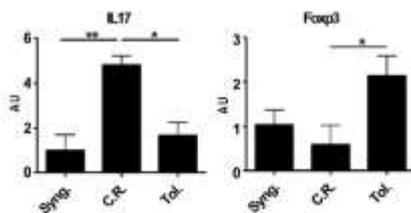


FIGURE 9. mRNA expression of IL-17 and Foxp3 in rat cardiac tolerated allografts. mRNA expression of IL-17 and Foxp3 were analyzed by quantitative RT-PCR in cardiac syngeneic grafts (Syng.), chronically rejected allografts by DST treatment (C.R.), or tolerated allografts by LF15-0195 treatment (Tol.) harvested at day 100 after transplantation ($n = 4$). Results are expressed in AU of IL-17 or Foxp3/HPRT transcript ratio \pm SEM and expressed as relative expression compared with the reference syngeneic grafts (value = 1). *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$.

allografts ($n = 4$; *, $p < 0.05$; Fig. 9). Indeed, we previously demonstrated an accumulation of regulatory Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells in tolerated allografts (with up to 15% of CD4⁺ T cells expressing Foxp3) (10).

These data demonstrate that the up-regulation of CLEC-1 in tolerated allografts is correlated with a low expression of IL-17 and a high expression of Foxp3, suggesting a role for CLEC-1 in the regulation of the balance between Th17 effector and regulatory CD4⁺ T cells.

Discussion

We identified CLEC-1 as being overexpressed in rat tolerated allografts. CLEC-1 is an orphan type II transmembrane receptor of the C-type lectin superfamily with an unknown function; it has previously been described to be expressed by DCs and ECs in humans (3, 11). CLEC-1 belongs to the subfamily of lectin-like genes located in the NK gene complex that encodes numerous receptors with important immune and/or scavenger functions in myeloid DCs or ECs (DCIR, Dectin-1, Lox-1, M1CL) (3, 25). However, its signaling is unknown and CLEC-1 seems to bind to an additional chain at the membrane surface of the cells (3, 11).

We demonstrate for the first time in rodents that CLEC-1 is highly expressed in rat immature myeloid cells and to a lower extent in ECs, and that CLEC-1 expression is down-regulated following inflammatory stimuli but increased by immunoregulators such as IL-10 or TGF β .

In tolerated cardiac allografts, we observed CLEC-1 protein expression by a group of myeloid cells and by numerous ECs of graft vessels. Interestingly, this expression by ECs is specific to tolerated allografts and was not observed in syngeneic grafts or in chronically rejected allografts. The basal expression of CLEC-1 protein in ECs of syngeneic grafts may be too low to be detected. We previously demonstrated also the specific expression of heme oxygenase-1, inducible NO synthase, and IDO by ECs of graft vessels in tolerated allografts and an interplay between graft ECs and regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells for the expression of these cytoprotective molecules and the establishment of long-term tolerance (8, 10). We showed herein *in vitro* that alloantigen-induced regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells enhanced the expression of CLEC-1 in donor-type ECs and that this induction, as for IDO, required cell contact. Furthermore, we showed *in vivo* that following transfer, alloantigen-induced regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells were able to increase CLEC-1 expression in the ECs of the new donor-type graft. These data demonstrate that alloantigen-induced regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells that accumulate at the graft site enhance locally the expression of CLEC-1 in APCs and that this

induction requires cell contact and is Ag-specific. As for IDO, the induction of high levels of CLEC-1 expression in graft ECs may play a role in allograft tolerance (10).

We demonstrated *in vitro* that CLEC-1 on DCs alters the effector CD4⁺ T cell response by decreasing Th17 differentiation and favoring the regulatory Foxp3⁺CD4⁺ T cell pool. However, we did not retrieve this effect with purified CD4⁺CD25⁻ T cells, and no effect was observed on proliferation of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. Therefore, these data suggest that this effect was not due to a direct effect of CLEC-1 on Th17 differentiation of naive CD4⁺CD25⁻ T cells, but rather may be due to the suppression mediated by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. Alternatively, CLEC-1 triggering on DCs by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells may modulate DC function to in turn decrease Th17 differentiation. It has been shown that IL-6 renders CD4⁺CD25⁻ T cells resistant to the suppression mediated by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells and that IL-6 blocks the differentiation of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells (26, 27). However, we did not observe a modification of IL-6 or TGF β expression in the MLR in the absence of CLEC-1 triggering, suggesting that the shifting in the balance between effector and regulatory T cell numbers is due to other factors.

Additionally, we found that CLEC-1 expression in tolerated allografts was associated with a low expression of IL-17 and the presence of numerous regulatory Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells that accumulate at the graft site (8, 10).

Taken together, these data suggest that in tolerated allografts, CLEC-1 expressed by myeloid cells and ECs is enhanced by regulatory T cells to, in turn, moderate allogeneic Th17 response. In this regard, the paired immunoreceptors PIR-B (ortholog of ILT3 and ILT4 in human) have clearly been shown to be induced by regulatory CD8⁺CD28⁻ T cells in DCs and ECs and to, in turn, generate the expansion of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells (28). PIR-B has also been shown to be highly expressed by ECs from tolerated allografts in a rat model of allograft tolerance that involved regulatory T cells (29).

The regulation of allogeneic Th17 response mediated in part by overexpression of CLEC-1 by myeloid cells and ECs may contribute to long-term tolerance and prevention of chronic rejection. Indeed, it has recently been shown that human ECs can directly activate allogeneic memory T cells toward production of IL-17, and that IL-17-producing CD4⁺ Th17 T cells contribute to allograft rejection and vasculopathy in an established experimental model of chronic rejection (30, 31). Interestingly, we also observed that CLEC-1 acts directly on CD4⁺CD25⁻ T cells for the expression of IL-13, suggesting also a role for CLEC-1 in Th2 differentiation.

We showed herein for the first time that as for many C-type lectin receptors expressed on myeloid cells, CLEC-1 is involved in the modulation of T cell activation. For example, DCAL-2 triggering has been shown to alter cytokine production by DCs and thereby to regulate the quality of downstream T cell activation (32, 33). DCAL-1 has been described to act as a T cell costimulatory molecule, which skews CD4⁺ T cells toward a Th2 response by enhancing their secretion of IL-4 (34). Dectin-1, an activating receptor, is shown to promote the activation of DCs to instruct the differentiation of IL-17-producing effector CD4⁺ T cells and CD8⁺ CTLs and to convert regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells into IL-17 producer cells (2, 7, 35). Moreover, AICL receptor expressed on myeloid cells and NKp80 expressed on NK and memory CD8⁺ T cells are both activating C-type lectin-like receptors interacting with each other, and their mutual engagement promotes reciprocal activation and cytokine release at sites of inflammation (36). CLEC-1 triggering may modulate directly activation of the DCs and ECs and/or give a regulatory signal to T cells.

In conclusion, we demonstrate for the first time that CLEC-1, identified in a model of tolerance and expressed by myeloid cells and ECs, is increased by immunoregulatory mediators and acts as a regulatory receptor able to alter T cell response. Therefore, CLEC-1 may be a useful target to modulate immune responses toward protective immunity or tolerance induction.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Robinson, M. J., D. Sancho, E. C. Slack, S. LeibundGut-Landmann, and C. Reis e Sousa. 2006. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat. Immunol.* 7: 1258–1265.
- Leibundgut-Landmann, S., F. Osorio, G. D. Brown, and C. Reis e Sousa. 2008. Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood* 112: 4971–4980.
- Sobanov, Y., A. Bernreiter, S. Derdak, D. Mechtcheriakova, B. Schweighofer, M. Duchler, F. Kalthoff, and E. Hofer. 2001. A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocyte, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *Eur. J. Immunol.* 31: 3493–3503.
- Oka, K., T. Sawamura, K. Kikuta, S. Itokawa, N. Kume, T. Kita, and T. Masaki. 1998. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor I mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9535–9540.
- Therault, J. R., S. S. Mambula, T. Sawamura, M. A. Stevenson, and S. K. Calderwood. 2005. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett.* 579: 1951–1960.
- Renie, G., F. Maingrette, and L. Li. 2007. Diabetic vasculopathy and the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). *Curr. Diabetes Rev.* 3: 103–110.
- LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighofer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8: 630–638.
- Heslan, J. M., K. Renaudin, P. Thebault, R. Josien, M. C. Cuturi, and E. Chiffoleau. 2006. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 82: 1185–1193.
- Heslan, J. M., G. Beriou, J. B. Le Lutec, C. Guillonnet, I. Aneon, J. P. Soullou, M. C. Cuturi, and E. Chiffoleau. 2005. Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted V β 7-TCR rearrangements in tolerated allografts. *Transplantation* 80: 1476–1484.
- Thebault, P., T. Condamine, M. Heslan, M. Hill, I. Bernard, A. Saoudi, R. Josien, I. Aneon, M. C. Cuturi, and E. Chiffoleau. 2007. Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am. J. Transplant.* 7: 2472–2482.
- Colonna, M., J. Samaridis, and L. Angman. 2000. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 697–704.
- Chiffoleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soullou, and M. C. Cuturi. 2002. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation: evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am. J. Transplant.* 2: 745–757.
- Jovanovic, V., A. S. Dugast, J. M. Heslan, J. Ashton-Chess, M. Giral, N. Degauque, A. Moreau, A. Pallier, E. Chiffoleau, D. Lair, et al. 2008. Implication of matrix metalloproteinase 7 and the noncanonical wingless-type signaling pathway in a model of kidney allograft tolerance induced by the administration of anti-donor class II antibodies. *J. Immunol.* 180: 1317–1325.
- Guillonnet, C., V. Aubry, K. Renaudin, C. Seveno, C. Usal, K. Tezuka, and I. Aneon. 2005. Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation* 80: 255–263.
- Peché, H., M. Heslan, C. Usal, S. Amigorena, and M. C. Cuturi. 2003. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 76: 1503–1510.
- Chiffoleau, E., J. M. Heslan, M. Heslan, C. Louvet, T. Condamine, and M. C. Cuturi. 2007. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4⁺ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4⁺CD25⁺ T cell. *Int. Immunol.* 19: 193–201.
- Charreau, B., A. Cassard, L. Tesson, B. Le Mauff, J.-M. Navenot, D. Blanchard, D. Lublin, J. P. Soullou, and I. Aneon. 1994. Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation* 58: 1222–1229.
- Le Bas-Bernardet, S., M. Hourmant, S. Coupel, J. D. Bignon, J. P. Soullou, and B. Charreau. 2003. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am. J. Transplant.* 3: 167–177.
- Spisek, R., L. Bretaudeau, I. Barbieux, K. Mellah, and M. Gregoire. 2001. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 417–427.
- Louvet, C., J. M. Heslan, E. Merieau, J. P. Soullou, M. C. Cuturi, and E. Chiffoleau. 2004. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8⁺ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 78: 1259–1266.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods* 25: 402–408.
- Degauque, N., D. Lair, A. Dupont, A. Moreau, G. Roussey, F. Moizant, F. X. Hubert, C. Louvet, M. Hill, F. Haspot, et al. 2006. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103⁺ cells. *J. Immunol.* 176: 3915–3922.
- Chiffoleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soullou, and M. C. Cuturi. 2002. Role for thymic and splenic regulatory CD4⁺ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J. Immunol.* 168: 5058–5069.
- Klatt, A. R., G. Klinger, D. Zech, B. Paul-Klaus, J. H. Renno, J. Schmidt, G. Malchau, and K. Wielckens. 2007. RNAi in primary human chondrocytes: efficiencies, kinetics, and non-specific effects of siRNA-mediated gene suppression. *Biologicals* 35: 321–328.
- Kanazawa, N. 2007. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J. Dermatol. Sci.* 45: 77–86.
- Passare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1033–1036.
- Betelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238.
- Chang, C., R. Ciubotariu, J. Manavalan, J. Yuan, A. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera, and N. Suci-Foca. 2002. Tolerization of dendritic cells by T cells: the crucial role of inhibitory ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 3: 237–243.
- Liu, J., Z. Liu, P. Witkowski, G. Vlad, J. S. Manavalan, L. Scotto, S. Kim-Schulze, R. Cortesini, M. A. Hardy, and N. Suci-Foca. 2004. Rat CD8⁺FOXP3⁺ T suppressor cells mediate tolerance to allogeneic heart transplants, inducing PIR-B in APC and rendering the graft invulnerable to rejection. *Transplant Immunol.* 13: 239–247.
- Rao, D. A., R. E. Eid, L. Qin, T. Yi, N. C. Kirkiles-Smith, G. Tellides, and J. S. Pober. 2008. Interleukin (IL)-1 promotes allogeneic T cell intimal infiltration and IL-17 production in a model of human artery rejection. *J. Exp. Med.* 205: 3145–3158.
- Yuan, X., J. Paez-Cortez, I. Schmitt-Knosalla, F. D'Addio, B. Mfarrej, M. Donnarumma, A. Habicht, M. R. Clarkson, J. Iacomini, L. H. Glimcher, et al. 2008. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J. Exp. Med.* 205: 3133–3144.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197: 1107–1117.
- Chen, C. H., H. Floyd, N. E. Olson, D. Magaletti, C. Li, K. Draves, and E. A. Clark. 2006. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood* 107: 1459–1467.
- Ryan, E. J., A. J. Marshall, D. Magaletti, H. Floyd, K. E. Draves, N. E. Olson, and E. A. Clark. 2002. Dendritic cell-associated lectin-1: a novel dendritic cell-associated, C-type lectin-like molecule enhances T cell secretion of IL-4. *J. Immunol.* 169: 5638–5648.
- Osorio, F., S. LeibundGut-Landmann, M. Lochner, K. Lahl, T. Sparwasser, G. Eberl, and C. Reis e Sousa. 2008. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur. J. Immunol.* 38: 3274–3281.
- Kuttruff, S., S. Koch, A. Kelp, G. Pawelec, H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2009. NKP80 defines and stimulates a reactive subset of CD8 T cells. *Blood* 113: 358–369.

Étude des mécanismes impliqués dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat

Actuellement, les travaux réalisés en transplantation visent à induire une tolérance spécifique du greffon à long terme. Il est donc nécessaire d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes qui y sont associés. Cette thèse a donc eut pour objectif la caractérisation des mécanismes immunologiques impliqués dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. Une première étude de la réponse lymphocytaire B chez les rats tolérants nous a permis de mettre en évidence une régulation de la production des anticorps anti-donneurs qui sont présents en plus faible quantité. Ils expriment un isotype de type TH2 et semblent protecteurs pour les cellules endothéliales du greffon. D'autre part, nous avons observé une accumulation de lymphocytes B en périphérie, associés à un profil inhibé ainsi que la présence de lymphocytes B régulateurs capables de transférer la tolérance. Dans une seconde étude, nous avons mis en évidence une nouvelle molécule, non décrite jusqu'à présent, inhibée lors de la tolérance par rapport un rejet. Nous avons donc tenté de caractériser la fonction et la régulation immunologique de cette molécule que nous avons nommée LIME (LPS-Induced Molecule). Nous avons montré que LIME est exprimée par les cellules dendritiques activées et parait importante pour leur capacité à stimuler les cellules T. LIME semble associée au cytosquelette, qui joue divers rôles dans la motilité et la mobilité cellulaire mais aussi dans la formation de synapses immunologiques. Ainsi, LIME pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique afin de réguler la réponse immunologique en transplantation.

Mots clés: transplantation, tolérance, lymphocytes B, LIME.

Study of mechanisms involved in cardiac allograft tolerance in rat

Currently, the transplantation research aims to induce long term graft tolerance. Thus, it is necessary to improve our knowledge in tolerance-associated mechanisms. The purpose of this thesis is to characterize immunological mechanisms involved in a model of cardiac allograft tolerance in rat. A first study of the B cell response in tolerant rats, allowed us to show a regulation of the anti-donor antibody production, which are present in small quantities. They express a TH2 isotype and seem to be protective for graft endothelial cells. Moreover, we observed an accumulation of inhibited profile associated B cells and regulatory B cells able to transfer tolerance. In a second study, we showed a new molecule no described so far, inhibited during tolerance compare to rejection. We tried to characterize the immunological function and regulation of this molecule that we named LIME (LPS-Induced Molecule). We showed that LIME is expressed by activated dendritic cells and seems associated with cytoskeleton, which plays various roles in cellular mobility and motility but also in immunological synapse formation. Thus LIME could become a new therapeutic target to regulate immunological response in transplantation.

Key words: transplantation, tolerance, B lymphocytes, LIME.

LE TEXIER Laëtitia
INSERM UMR1064
30, Bd Jean Monnet
44 093 NANTES Cedex 01