

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Ecole Doctorale : BIOLOGIE SANTE

Année 2011



**Inhibition sélective de la costimulation CD28-CD80/86
en transplantation :**
mécanismes d'action des cellules régulatrices.

THESE DE DOCTORAT
Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Spécialité : IMMUNOLOGIE

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Nahzli DILEK

Le 11 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Président du Jury :

Gilles BLANCHO, Professeur / Praticien Hospitalier, Nantes

Rapporteurs :

Sebastian AMIGORENA, Directeur de Recherche, Paris

François GHIRINGHELLI, Maître de conférences / Praticien Hospitalier,
Dijon

Examinatrice :

Luigia PACE, Post-doctorante, Paris

Directeur de thèse :

Bernard VANHOVE, Directeur de Recherche, Nantes

Sommaire

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Liste des abréviations | 4 |
| Liste des figures..... | 7 |
| Liste des tableaux | 7 |
| Avant-propos | 9 |
| Introduction | 12 |
| I- Réponses immunes, rejets d'allogreffe, contrôle | 12 |
| I-1 La réponse allogénique | 12 |
| I-1.1 L'allorecognition directe | 13 |
| I-1.2 L'allorecognition indirecte | 15 |
| I-1.3 La voie de présentation semi-directe | 15 |
| I-2 L'activation lymphocytaire T | 16 |
| I-2.1 Signal 1 : le signal antigénique..... | 17 |
| I-2.1 Signal 2 : le signal de costimulation..... | 17 |
| I-2.2 Signal 3 : le signal des cytokines..... | 19 |
| I-3 La réponse immunitaire..... | 20 |
| I-3.1 La réponse cellulaire | 20 |
| I-3.2 La réponse humorale | 22 |
| I-4 Le rejet d'allogreffe..... | 23 |
| I-4.1 Le rejet hyper aigu..... | 24 |
| I-4.2 Le rejet aigu..... | 25 |
| I-4.3 Le rejet chronique..... | 26 |
| I-5 La tolérance..... | 27 |
| I-5.1 La tolérance centrale | 28 |
| I-5.2 La tolérance périphérique..... | 31 |
| I-5.2.1 La tolérance passive | 32 |
| I-5.2.2 La tolérance active | 35 |
| I-5.3 La tolérance clinique dite « opérationnelle » | 35 |
| II- La tolérance en transplantation : les cellules régulatrices | 37 |
| II-1 Les cellules T régulatrices | 37 |
| II-1.1 Les cellules T régulatrices induites | 37 |
| II-1.1.1 Les cellules Tr1..... | 37 |
| II-1.1.2 Les cellules Th3..... | 38 |
| II-1.2 Les cellules T CD8 ⁺ régulatrices..... | 39 |
| II-1.3 Les cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻ régulatrices | 41 |
| II-1.4 Les cellules régulatrices double négatives CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ | 42 |
| II-1.5 Les cellules T régulatrices $\gamma\delta$ | 43 |
| II-1.6 Les cellules NKT | 44 |
| II-1.7 Les cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ régulatrices | 45 |
| II-1.7.1 Identification et caractérisation | 45 |
| II-1.7.2 Origine, développement et homéostasie des Treg..... | 47 |
| II-1.7.3 Mécanismes de suppression..... | 48 |
| II-1.7.4 Treg et transplantation | 53 |

| | |
|---------------------------------------------------------------|------------|
| II-2 Les cellules non-T régulatrices | 57 |
| II-2.1 Les cellules dendritiques tolérogènes..... | 57 |
| II-2.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes | 60 |
| II-2.3 Les cellules souches mésenchymateuses | 63 |
| II-2.4 Les macrophages alternatifs activés..... | 66 |
| II-2.5 Les lymphocytes B régulateurs | 67 |
| II-2.6 Les cellules myéloïdes suppressives | 69 |
| II-2.6.1 Identification et caractérisation..... | 69 |
| II-2.6.2 Origine et microenvironnement des MDSC..... | 70 |
| II-2.6.3 Mécanismes de suppression..... | 71 |
| II-2.6.4 MDSC et transplantation | 75 |
| III- Synapse immunologique et costimulation | 79 |
| III-1 Synapse immunologique | 79 |
| III-1.1 Formation de la synapse immunologique | 79 |
| III-1.2 Transduction du signal et voies de signalisation..... | 80 |
| III-1.2.1 Voie de signalisation calcique | 81 |
| III-1.2.2 Voie des MAP Kinases..... | 82 |
| III-1.2.3 Voie de la PI3K..... | 83 |
| III-1.2.4 Voie de la PKC-θ | 83 |
| III-2 La costimulation | 84 |
| III-2.1 La voie CD28/CD80-86/CTLA-4..... | 85 |
| III-2.1.1 CD28 | 86 |
| III-2.1.2 CTLA-4..... | 88 |
| III-2.2 Le blocage de la costimulation | 91 |
| III-2.2.1 Blocage de CD80-86 en transplantation | 92 |
| III-2.2.2 Blocage de CD28 en transplantation | 94 |
| Résultats | 98 |
| I- Projet I..... | 98 |
| I-1 Article 1 | 98 |
| I-2 Discussion et perspectives | 131 |
| II- Projet II : | 138 |
| II-1 Projet d'article 2 | 138 |
| Résultats (encore non publiés) | 145 |
| II-2 Discussion et perspectives | 156 |
| Conclusion | 162 |
| Bibliographie..... | 165 |
| Annexes..... | 179 |
| I- Annexe I..... | 179 |
| II- Annexe II | 184 |
| III- Annexe III | 197 |
| IV- Publications & Communications..... | 208 |

Liste des abréviations

ACAID : Anterior Chamber-Associated Immune Deviation
ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
Ag : Antigène
AICD : Activation Induced Cell Death
AIRE : AutoImmune Regulator
AMP : Adénosine Monophosphate
AP-1 : Activator Protein-1
APECED : Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy
Arg1 : Arginase 1
ATG : Anti-Thymocyte Globulin
ATP : Adénosine Triphosphate
Bcl10 : B-cell lymphoma/leukemia 10
BCR : B Cell Receptor
BLC : B Lymphocyte Chemoattractant
CARMA : Caspase-recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein
CAV : Vasculopathie Chronique d'Allogreffe
CDK : Cyclin Dependant Kinase
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNI : Inhibiteur de la Calcineurine
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène
CPT : Capillaires Péritubulaires
CRAC : Calcium Release Activated Calcium Channels
CsA : Cyclosporine A
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAG : Diacylglycérol
DC : Cellule Dendritique
DGF : Delayed Graft Function
DST : Donor Specific Transfusion
DTH : Delayed-Type Hypersensitivity
EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EBI3 : Epstein-Barr virus-Induced gene 3
EGF : Epidermal Growth Factor
ERK : Extracellular signal-Regulated protein Kinases
Fc : Fragment cristallisable
FcγR : Fc gamma récepteur
FI/AT : Fibrose Interstitielle/Atrophie Tubulaire
Flt3L : Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
Foxp3 : Forkhead box P3
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

GITR : Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related protein
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GVHD : Graft Vs Host Disease
GZB : Granzyme B
HLA : Human Leukocyte Antigen
HO-1 : Hème Oxygénase 1
ICAM : Intercellular Adhesion Molecule
ICOS : Inducible Costimulator receptor
ICOSL : Inducible Costimulator Ligand
IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ILT : Immunoglobulin-Like Transcript
IP₃ : Inositol-1,4,5-triphosphate
IPEX : Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X linked
ITAMs : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
ITIMs : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs
Itk : IL-2-inducible T-cell kinase
iTreg : Lymphocyte T régulateur induit
JNK : c-Jun NH₂- terminal kinases
KO : Knock-Out
LAT : Linker for the Activation of T cells
LB : Lymphocyte B
LFA : Lymphocyte Function-Associated antigen
LT : Lymphocyte T
mAb : Monoclonal Antibody
MALT1 : Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MBP : Myelin Basis Protein
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells
MMF : Mycophenolate Mofetil
MSC : Cellules souches mésenchymateuses
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cell
NK : Natural Killer
NO : Monoxyde d'azote
Nrp-1 : Neuropiline 1
nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel
OVA : Ovalbumine
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
pCMH : peptide-CMH
PD-1 : Programmed Death 1
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PD-L : Programmed Death Ligand
PGE : Prostaglandine
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIP₂ : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC : Protein Kinase C
PLC : Phospholipase C
PNH : Primate Non-Humain
RC : Rejet Chronique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SCF : Stem Cell Factor
SH2 : Src Homology 2
SI : Synapse Immunologique
sIg : Immunoglobuline de surface
SLAM : Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SLP-76 : SH2 domain containing Leucocytes Phosphoprotein of 76 kDa
SMAC : SupraMolecular Activation Cluster
SPAK : Ste20-related upstream mitogen-activated protein kinase
ScFv : Single chain Fv
TCR : T Cell Receptor
TGF : Transforming Growth Factor
Th : T helper
TIM : T-cell Ig domain and Mucin domain
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAIL/DR5 : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand / Death Receptor 5
Treg : Lymphocyte T régulateur
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
ZAP70 : ζ chain Associated Protein 70

Liste des figures

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Figure 1 : Les différentes voies de présentation allogénique.</i> | 13 |
| <i>Figure 2 : Représentation schématique des réponses cellulaires en transplantation.</i> | 22 |
| <i>Figure 3 : Les mécanismes de la tolérance centrale.</i> | 31 |
| <i>Figure 4 : Les mécanismes passifs de tolérance périphérique.</i> | 35 |
| <i>Figure 5 : Mécanismes suppresseurs des cellules T CD8⁺ restreintes au Qa-1.</i> | 41 |
| <i>Figure 6 : Mécanismes suppresseurs des cellules T $\gamma\delta$.</i> | 44 |
| <i>Figure 7 : Les principaux mécanismes suppresseurs des lymphocytes T régulateurs (Treg).</i> | 53 |
| <i>Figure 8: Mécanismes responsables de la tolérance périphérique par les DC (DC tol.).</i> | 60 |
| <i>Figure 9 : Les fonctions tolérogènes des pDC.</i> | 63 |
| <i>Figure 10 : Fonctions immunorégulatrices des MSC.</i> | 66 |
| <i>Figure 11 : Mécanismes suppresseurs des MDSC.</i> | 75 |
| <i>Figure 12 : L'interaction entre le lymphocyte T et la CPA.</i> | 80 |
| <i>Figure 13 : Représentation schématique des voies de transduction du signal mises en place suite à l'engagement du TCR.</i> | 81 |
| <i>Figure 14 : Le rôle de la PKC-θ dans la signalisation induite par le TCR et CD28 dans les cellules T.</i> | 84 |
| <i>Figure 15 : Formation dynamique des microclusters de TCR-CD28 et de la synapse.</i> | 88 |
| <i>Figure 16 : Le modèle du « reverse STOP-signal » de CTLA-4.</i> | 91 |
| <i>Figure 17 : Représentation schématique des mécanismes du blocage de CD28 vs CD80-86.</i> | 92 |

Liste des tableaux

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Tableau 1 : Liste non exhaustive des principales voies de costimulation du lymphocyte T.</i> | 19 |
| <i>Tableau 2 : Résumé des rejets d'allogreffes chez l'homme.</i> | 24 |
| <i>Tableau 3 : Modèles d'induction de tolérance suite au blocage de la molécule CD28</i> | 96 |

Avant-propos

Avant-propos

Marquée par plusieurs acquisitions fondamentales, le XX^{ème} siècle est la période durant laquelle se concentre l'histoire de la greffe d'organes, relatant par ailleurs sa majeure évolution. En effet, ce sont, avant tout, les progrès chirurgicaux dans les années 1950 qui permettent à la transplantation d'organe de devenir techniquement possible. Ainsi, la première transplantation rénale à partir d'un donneur vivant a lieu en 1952 par l'équipe du Docteur Louis Michon à l'Hôpital Necker à Paris (MICHON *et al.*, 1953). Cependant le patient décèdera 21 jours après sa greffe. Cette même année, le Professeur Dausset (prix Nobel de médecine en 1980) fait l'observation princeps d'une leuco-agglutination massive des globules blancs par le sérum d'un sujet leucopénique (DAUSSET & NENNA, 1952). Ces travaux lui permettront de décrire, quelques années plus tard (en 1958), le premier groupe leucocytaire, le groupe MAC, premier d'une longue série d'antigènes du système majeur d'histocompatibilité humain, dénommé plus tard HLA (*Human Leukocyte Antigen*) (DAUSSET, 1958). Ainsi, en 1954 à Boston, la démonstration de l'obligatoire compatibilité est faite grâce à la réussite d'une greffe entre deux vrais jumeaux réalisée par John Merrill et Joseph Murray (MERRILL *et al.*, 1956). En 1959 à Boston puis à Paris, sont effectuées des greffes rénales entre faux jumeaux. Des séances d'irradiation totale et un traitement par corticoïdes permettent d'affaiblir suffisamment le système immunitaire du patient pour qu'il n'y ait pas de rejet. Cependant, la greffe ne peut se limiter qu'entre jumeaux. L'obstacle de l'incompatibilité biologique devant être franchi, des immunosuppresseurs « efficaces » permettant d'éviter le rejet sont indispensables. C'est ainsi que la découverte de la cyclosporine A (inhibiteur de la calcineurine) à la fin des années 1970, fut la percée majeure de la transplantation (Calne *et al.*, 1978). La transplantation suivie d'un traitement à la cyclosporine A (CsA) est ainsi devenue le meilleur recours pour palier à une dysfonction chronique d'un organe vital. Toute une variété d'immunosuppresseurs a ensuite été développée puis utilisée. Les progrès importants dans ce domaine ont permis une nette amélioration et une prolongation de la survie des patients, ainsi qu'une extension de la limite d'âge des receveurs. Victime de son propre succès, la transplantation est aujourd'hui confrontée à un important manque d'organes difficile à surmonter. Par ailleurs, les thérapies actuelles en transplantation imposent toujours un traitement immunosuppresseur à vie entraînant un affaiblissement général du système immunitaire à l'origine d'importants effets secondaires (cancers, infections, néphrotoxicités,...) et ne protégeant pas contre le rejet chronique de greffons vascularisés.

L'établissement d'une tolérance spécifique au donneur demeure par conséquent un objectif majeur en transplantation, car elle seule permettrait de renoncer à l'immunosuppression chronique tout en évitant le rejet d'allogreffe.

Cette thèse, basée sur des travaux de recherches fondamentaux chez le rongeur et l'homme, a pour but d'étudier une nouvelle stratégie thérapeutique en transplantation. Suite à un chapitre consacré aux différents types de rejet, ainsi qu'aux principaux mécanismes effecteurs impliqués, je présenterai les différentes cellules régulatrices, et particulièrement les lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ régulateurs et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) impliqués notamment dans la tolérance. Enfin, je décrirai la dynamique de la synapse immunologique, en particulier l'importance de la voie de costimulation CD28/CD80-86/CTLA-4. En annexe sont joints des articles et revue obtenus suite à différentes collaborations réalisées au cours de cette thèse : Poirier et al. 2011, Poirier et al. 2010, Dilek et al. 2010.

Introduction

Introduction

La transplantation d'organes ou de tissus entre individus de la même espèce (ou d'espèces différentes) génétiquement différents est sujet au rejet et ses problèmes associés. Le caractère étranger est assimilé à la présence d'antigènes des tissus transplantés que l'hôte n'a pas et reconnaît donc comme l'étranger ou comme « non-soi ». Même si tous les autres facteurs sont optimaux (par exemple, la gestion des donateurs, l'état fonctionnel de l'organe du donneur, l'intervention chirurgicale, et la gestion périopératoire du destinataire), la principale raison de l'échec de greffe est le rejet, en dehors d'un contexte thérapeutique.

L'organe transplanté représente une source continue d'alloantigènes HLA capable d'induire, à tout moment, une réaction de rejet après la transplantation. Ne pouvant pas être éliminée, l'allogreffe active en permanence des réactions immunitaires spécifiques, cellulaires et humorales, entraînant une surproduction de cytokines continue, une constante activité cytotoxique, potentiellement délétères pour le tissu greffé. Par conséquent, l'immunosuppression à vie est nécessaire pour assurer la survie des allogreffes.

I- Réponses immunes, rejets d'allogreffe, contrôle

I-1 La réponse allogénique

Les organes transplantés expriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur, résultant en deux voies de reconnaissance de l'antigène (alloreconnaissance) par les cellules T : directe (**Figure 1A**) et indirecte (**Figure 1B**). L'alloreconnaissance, base immunologique du rejet d'organe, se réfère à la reconnaissance par les cellules T du polymorphisme génétiquement codé entre les membres de la même espèce. Les principales cibles de la réponse immunitaire aux tissus allogéniques sont des molécules du CMH sur les cellules du donneur.

Les principaux effecteurs cellulaires de cette réponse immune contre les tissus allogéniques sont les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Après reconnaissance du complexe CMH/peptide des CPA, les lymphocytes T vont recevoir des signaux des CPA pour déclencher une réponse immune effectrice de type Th1 ou Th2 principalement, la voie Th17 ne semblant pas majoritairement impliquée dans le rejet des greffes.

Les deux voies (directe et indirecte) peuvent être impliquées dans le rejet d'allogreffe de façon simultanée ou non. Cependant, certaines études ont également proposé l'existence d'une troisième voie de reconnaissance de l'antigène, la voie semi-directe (**Figure 1C**).

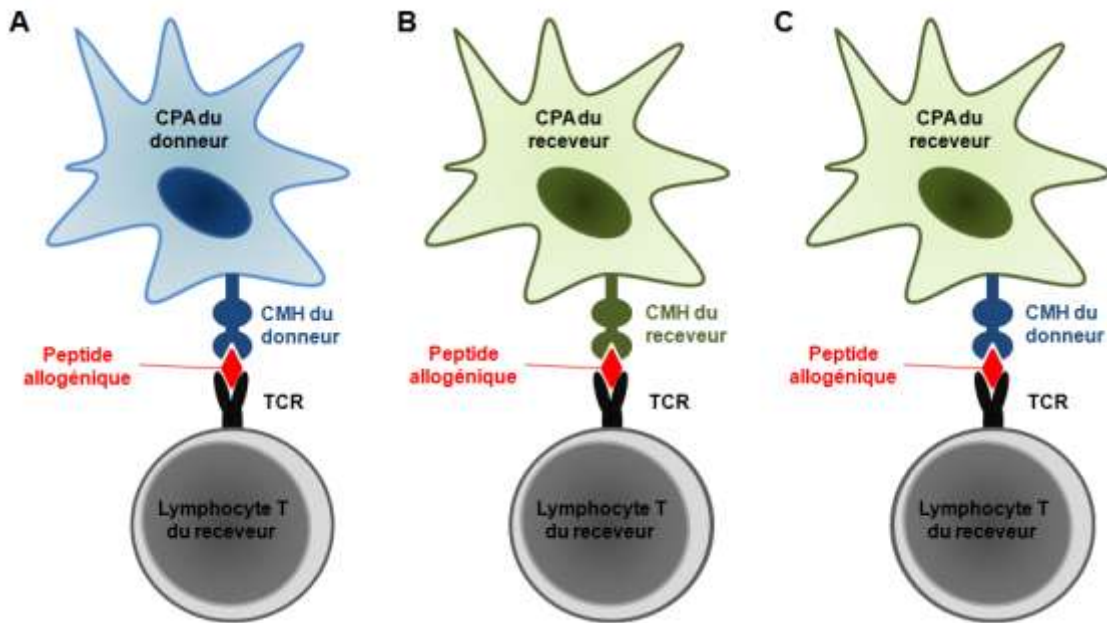


Figure 1 : Les différentes voies de présentation allogénique.

A. Voie de présentation directe. **B.** Voie de présentation indirecte. **C.** Voie de présentation semi-directe.

I-1.1 L'alloreconnaissance directe

Lors de la réponse allogénique directe (alloreconnaissance directe), les lymphocytes T du receveur reconnaissent directement les molécules intactes du CMH de classe I ou de classe II exprimées par les CPA du donneur (en particulier les cellules dendritiques). Suite à la transplantation, les CPA présentes dans le greffon vont alors s'activer et migrer dans les ganglions de drainage afin d'induire la réponse allogénique (Daniel *et al.*, 1998). Les mécanismes mis en jeu lors de cette reconnaissance font intervenir des réactions croisées permettant aux TCR des lymphocytes T du receveur de reconnaître les molécules HLA allogéniques du donneur. Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent le complexe présenté par les molécules du CMH de classe II dont l'expression est restreinte aux CPA. Les lymphocytes T CD8⁺, quant à eux, reconnaissent le complexe présenté par les molécules du CMH de classe I exprimées de façon ubiquitaire. Cette voie directe de présentation allogénique, ainsi que son implication dans le développement du rejet aigu, ont été mis en évidence à partir de 1976

(Lafferty *et al.*, 1976). Ainsi en 1982, Lechler et coll. ont montré que la déplétion des leucocytes passagers (CPA du donneur) du greffon prévient la survenue d'épisode de rejet aigu, alors que la reconstitution du greffon par injection des cellules dendritiques (DC) du donneur restaure l'immunogénicité et conduit au rejet rapide du greffon (R. I. Lechler & J. R. Batchelor, 1982). Ce n'est qu'en 1993 que cette reconnaissance a été caractérisée comme étant le premier événement conduisant à un rejet d'allogreffe (L. A. Sherman & Chattopadhyay, 1993). Par la suite, grâce à un modèle de rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez la souris déficiente en molécules CMH de classe II, Pietra et coll. démontrent que les lymphocytes T CD4⁺ sont suffisants pour le développement du rejet aigu, principalement via la voie de présentation directe (Pietra *et al.*, 2000). Cette réponse directe des lymphocytes T naïfs apparaît dès les premiers jours suivant la transplantation. Son intensité est alors déterminée par la fréquence des lymphocytes T spécifiques des molécules de CMH allogéniques (Lindahl & D. B. Wilson, 1977), qui va décroître au cours du temps en fonction de la disparition des CPA du donneur. Lechler et d'autres ont étudié l'évolution de la réponse directe anti-donneur chez des transplantés rénaux (P. D. Mason *et al.*, 1996) et cardiaques (Hornick *et al.*, 1998). Chez la majorité des patients, une hyporéactivité spécifique du donneur apparaissait dans les mois suivant la transplantation, authentifiée par une baisse significative de la fréquence des lymphocytes T anti-donneur. Plus tard, Baker et coll. ont étudié les sous-populations CD4⁺ chez des patients transplantés rénaux avant et 4 mois après la transplantation (R. J. Baker *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré une diminution significative des fractions anti-donneur des cellules T mémoires (CD45RO) mais pas naïves (CD45RA). Ces différentes observations suggèrent que l'importance de la voie directe diminue avec le temps après la transplantation. Cependant, elle peut être maintenue via l'endothélium du greffon. Une étude de Halamay et coll. suggère que les cellules CD8⁺, seules, sont suffisantes pour induire une reconnaissance allogénique ainsi qu'un rejet (Halamay *et al.*, 2002). Grâce à un modèle de transplantation chez la souris transgénique pour le TCR dans lequel le receveur ne possède aucune cellule CD4⁺ fonctionnelle, ces auteurs ont montré un rejet aigu en cas de transplantation cardiaque. Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent également être activés par la voie directe de présentation via les cellules endothéliales du greffon qui présentent l'antigène et expriment les molécules de costimulation (Kreisel, Krupnick, Balsara, *et al.*, 2002; Kreisel, Krupnick, Gelman, *et al.*, 2002).

I-1.2 L'allorecognition indirecte

Lors de la voie de présentation indirecte (allorecognition indirecte), les antigènes du donneur, en particulier les molécules de CMH sont capturées par les CPA du receveur (suite à la destruction des cellules du donneur), puis apprêtées pour être présentées comme peptide aux lymphocytes T du receveur (K. Inaba *et al.*, 1998). Ce mécanisme est similaire à toute réponse immunitaire qui prévaut physiologiquement. En transplantation, cette allorecognition indirecte a été corrélée avec l'apparition du rejet chronique avant que son importance soit également démontrée dans le développement du rejet aigu d'allogreffe chez le rongeur (Fangmann *et al.*, 1992) et chez l'homme (Z. Liu *et al.*, 1996). Auchincloss et coll. ont élégamment démontré que la voie indirecte est suffisante pour provoquer un rejet dans une série d'expériences de greffe de peau à partir d'une souris donneuse déficiente en CMH de classe II à une souris allogénique déplétée en cellules CD8⁺ (Auchincloss *et al.*, 1993). Dans cette combinaison, la souris receveuse n'a pas les lymphocytes CD8⁺ qui pourraient reconnaître directement les molécules du CMH de classe I tandis que les CPA du donneur sont incapables de présenter directement aux cellules CD4⁺ du receveur car elles ne possèdent pas les molécules de classe II. Ainsi, les molécules de classe I du donneur ne peuvent être « vues » que grâce à la présentation par les lymphocytes T du receveur. En dépit de l'absence de toute réponse directe, toutes les greffes de peau ont été rejetées (Auchincloss *et al.*, 1993). Plusieurs études cliniques ont mis en évidence que la fréquence des lymphocytes T activés par la voie indirecte de présentation augmentait au cours du temps chez les patients présentant un rejet chronique à la suite d'une greffe de cœur, de foie ou de rein (Hornick *et al.*, 2000; Vella *et al.*, 1997; Z. Liu *et al.*, 1996). La migration des DC du donneur dans les tissus lymphoïdes, étant une source d'antigène, est décrite pour générer cette voie indirecte de présentation (Austyn & C. P. Larsen, 1990). Enfin, d'après quelques études, les lymphocytes T CD8⁺ peuvent être activés par l'intermédiaire de la présentation croisée (Morón *et al.*, 2004), où les molécules de CMH de classe I présentent des peptides non endogènes aux lymphocytes T CD8⁺ (M. L. Albert *et al.*, 1998).

I-1.3 La voie de présentation semi-directe

Pendant très longtemps, les voies directe et indirecte ont été considérées comme les seuls mécanismes de stimulation des cellules T allospécifiques du receveur. Pourtant, de nombreuses observations laissent à penser que d'autres mécanismes étaient impliqués. En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'un transfert de molécules intactes du

CMH entre les cellules (J. F. Huang *et al.*, 1999; Tsang *et al.*, 2003). Ainsi, il a été décrit que des cellules T CD4⁺ activées par la voie indirecte étaient capables de délivrer une aide efficace aux lymphocytes T CD8⁺ stimulés directement par les molécules allogéniques de CMH de classe I (R. S. Lee *et al.*, 1994). Une nouvelle voie intermédiaire, qualifiée de « semi-directe » a donc été décrite par l'équipe de Robert Lechler (O. B. Herrera *et al.*, 2004; S. Jiang *et al.*, 2004). Cette voie mettait en évidence *in vitro* que des DC pouvaient acquérir et présenter, par un mécanisme actif, des molécules intactes de CMH de classe I et de classe II présentes à la surface de cellules dendritiques ou endothéliales allogéniques. De plus, elle a montré que ce transfert d'antigène se déroule également *in vivo* et que les molécules de CMH ainsi captées sont capables d'activer par une voie directe, et spécifique de l'antigène, des cellules T syngéniques. Cette voie permettrait ainsi d'assurer, une fois les CPA du donneur disparues, une activation continue des lymphocytes T CD8⁺, obligés de reconnaître le CMH de classe I du donneur pour présenter leurs fonctions cytotoxiques, et de recevoir une aide efficace des lymphocytes T CD4⁺, activés eux par la voie d'allorecognition indirecte. Toutefois, l'importance relative de ces mécanismes dans l'activation du répertoire alloréactif et son implication dans le rejet de greffe ne sont pas actuellement connues.

I-2 L'activation lymphocytaire T

Le processus d'activation des lymphocytes T a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires où se trouvent les DC matures qui vont présenter le complexe CMH/peptide aux lymphocytes T naïfs. La première rencontre des cellules T avec les CPA est une liaison non spécifique assurée par des molécules d'adhérence. Cette interaction transitoire permet à la cellule T d'entrer en contact avec un grand nombre de combinaisons CMH/peptide différentes sur différentes CPA. En l'absence d'interaction spécifique, les cellules se dissocient rapidement. En revanche, lorsque l'interaction est spécifique, une réponse immune est déclenchée par l'intégration de 3 signaux d'activation lymphocytaire développés ci-dessous. L'initiation de l'activation lymphocytaire par le signal 1 correspond à la reconnaissance spécifique par le récepteur du lymphocyte T (TCR) du complexe CMH/peptide porté par la CPA. Le signal 2 dit « signal de costimulation » est médié par les molécules de costimulation et leurs ligands exprimés à la surface des DC et des cellules T. Enfin, le 3ème signal est caractérisé par la libération de cytokines qui vont achever l'activation du lymphocyte T et déterminer l'orientation de la réponse immunitaire.

I-2.1 Signal 1 : le signal antigénique

L'engagement du TCR avec le complexe CMH/peptide est la première étape nécessaire à l'activation lymphocytaire. Le TCR est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Chaque chaîne est composée d'un domaine extracellulaire amino-terminal contenant une région variable (V), une région constante (C) ainsi qu'une région charnière (J) nécessaires à la création d'un répertoire divers fonctionnel. Le TCR ne possède pas de domaine intracellulaire. En effet, celui-ci est couplé de manière non-covalente à un groupe de polypeptides membranaires, appelé le complexe CD3, constitué des chaînes γ , ϵ , δ , et ζ . Ce complexe CD3 est, par ailleurs, lui-même associé aux corécepteurs CD4 ou CD8 indispensables à la reconnaissance du type de CMH (de classe II ou I respectivement) par le TCR. Ainsi, par l'intermédiaire du complexe CD3, la liaison du TCR au complexe CMH/peptide initie une cascade de phosphorylations de tyrosines, telles que p59, Fyn, p56, Lck ou encore ZAP70 (*Zeta chain Associated Protein Kinase*), débutant au niveau des domaines *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* (ITAMs), nécessaire à la transduction efficace du signal antigénique (A. Weiss & Littman, 1994; Schwartzberg *et al.*, 2005). Le signal 1, s'il est le seul activé, aboutit à l'apoptose ou mort cellulaire programmée des lymphocytes T, mécanisme susceptible d'induire l'anergie (Watts & M. A. DeBenedette, 1999).

I-2.1 Signal 2 : le signal de costimulation

Le second signal, dit de costimulation, est constitué par des interactions entre molécules exprimées de part et d'autre de l'interface lymphocyte T/CPA. Trois groupes de molécules sont impliqués dans ce second signal : les molécules d'adhésion, les molécules dites accessoires et les molécules de costimulation (Rothstein & Sayegh, 2003). Les intégrines à la surface de la cellule T, comme le *Lymphocyte Function-associated Antigen* (LFA) 1 qui se lie à l'*InterCellular Adhesion Molecule* (ICAM) 1 ou 2 sur la CPA, sont responsables d'une adhésion optimale entre les deux cellules et sont ainsi des médiateurs pour la formation d'une synapse immunologique mature (Wetzel *et al.*, 2002). Les molécules accessoires ont pour rôle de stabiliser cette interaction, et comprennent notamment CD2 sur le lymphocyte T et LFA-3 sur la CPA.

Les molécules de costimulation sont des protéines membranaires exprimées par le lymphocyte T et les CPA qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (CD28 et CTLA-4, ICOS, PD-1 du lymphocyte T interagissant respectivement avec CD80 et CD86, ICOS-L, et

PDL1-PDL2 sur la CPA), à la superfamille du *Tumor Necrosis Factor* (TNF) et des récepteurs du TNF (CD40L, 4-1BB, CD70 du lymphocyte T interagissant respectivement avec CD40, 4-1BB-L et CD27 sur la CPA), à la superfamille des intégrines (LFA-1, VLA-4 du lymphocyte T interagissant respectivement avec ICAM-1 et VCAM-1 sur la CPA) et à la superfamille des TIM (*T-cell Ig domain and Mucin domain*). Elles coopèrent avec les signaux intracellulaires issus du TCR. Les molécules les plus importantes sont celles de la superfamille des immunoglobulines. CD28 et ICOS (*Inducible COStimulatory receptor*) transmettent un signal activateur tandis que CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4*) et PD-1 (*Programmed Death 1*) ont une fonction inhibitrice de l'activation lymphocytaire T par modulation négative des signaux issus du TCR. Le tableau 1 résume les principales molécules de ces superfamilles de costimulation impliquées dans l'activation lymphocytaire. En présence du signal 1 et du signal 2, la cellule T est activée et répond en premier lieu par la synthèse d'interleukine 2 (IL-2). En l'absence du signal 2, la cellule T devient anergique, c'est-à-dire incapable de proliférer, de produire des cytokines ou de répondre à une nouvelle stimulation. Cette anergie peut être levée par un apport exogène en IL-2, composant majeur du troisième signal d'activation (Beverly *et al.*, 1992).

Notre étude s'étant intéressée plus particulièrement à la synapse immunologique et à la voie CD28/CD80-86/CTLA-4, seule cette partie sera détaillée.

| | Récepteur | Ligand | Effet | Expression |
|-----------------------------|-----------|-------------|------------|--------------|
| Superfamille des Ig | CD28 | CD80<CD86 | Activateur | Constitutive |
| | CTLA-4 | CD80>CD86 | Inhibiteur | Inductible |
| | ICOS | ICOSL | Activateur | Inductible |
| | PD-1 | PD-L1/PD-L2 | Inhibiteur | Inductible |
| | B7H3 | ? | Inhibiteur | Inductible |
| | B7H4 | BTLA(?) | Inhibiteur | Inductible |
| | LAG-3 | MHC II | Inhibiteur | Inductible |
| Superfamille du TNFR | CD40L | CD40 | Activateur | Inductible |
| | 4-1BB | 4-1BBL | Activateur | Inductible |
| | OX40 | OX40L | Activateur | Inductible |
| | CD27 | CD70 | Activateur | Constitutive |
| | CD30 | CD30L | Activateur | Inductible |
| | BTLA | HVEM | Inhibiteur | Inductible |
| | HVEM | LIGHT | Activateur | Constitutive |
| | TRANCE | RANK | Activateur | Inductible |
| | GITR | GITRL | Activateur | Constitutive |
| Intégrines | LFA-1 | ICAM-1 | Activateur | Constitutive |
| | VLA-4 | VCAM-1 | Activateur | Inductible |
| TIM | TIM-1 | TIM-4 | Activateur | Inductible |
| | TIM-3 | galectin-9 | Inhibiteur | Inductible |

Tableau 1 : Liste non exhaustive des principales voies de costimulation du lymphocyte T.

I-2.2 Signal 3 : le signal des cytokines

Le troisième signal de l'activation lymphocytaire implique la sécrétion des cytokines, véritables messagers chimiques entre les différents types cellulaires. L'IL-2, cytokine majeure sécrétée essentiellement par le lymphocyte T et agissant de façon autocrine et paracrine, induit une signalisation intracellulaire aboutissant à la prolifération et à la différenciation du lymphocyte T après fixation sur son récepteur (IL-2r ; récepteur dimérique composé de IL-2R β et de IL-2R α /CD25). L'IL-15 et l'IL-7 sont deux cytokines connues pour leur rôle dans l'homéostasie et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ (naïfs et mémoires, respectivement) de manière antigène indépendante (Goldrath *et al.*, 2002). L'IL-10, quant à elle, va au contraire avoir une action inhibitrice sur l'activation des lymphocytes T. Enfin, d'autres cytokines vont diriger la réponse immunitaire, tels que l'IL-6 (principale cytokine de l'inflammation) qui permet la différenciation en Th17, l'*Interferon Gamma* (IFN- γ) et l'IL-4 qui orientent respectivement vers la réponse Th1 (réponse cellulaire) et Th2 (réponse

humorale et activation lymphocytaire B), et le *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) qui intervient dans la réponse de cellules T régulatrices.

I-3 La réponse immunitaire

Les lymphocytes, cellules compétentes pour initier les réponses immunes, peuvent être divisés en deux principaux groupes donnant lieu à deux types de réponse : les lymphocytes T dérivés du thymus responsables de la réponse cellulaire (i.e. l'hypersensibilité retardée) et les lymphocytes B dérivés de la moelle osseuse qui produisent des molécules d'immunoglobulines (anticorps) et sont impliqués dans la réponse humorale (J. F. Miller, 1975).

I-3.1 La réponse cellulaire

La réponse effectrice cellulaire varie selon le type de réponse Th (T helper) des lymphocytes T CD4⁺ générés durant la phase d'amplification de la réponse T. En 1986, Robert Coffman et Timothy Mossmann décrivent pour la première fois la division des lymphocytes T CD4⁺ en différentes sous-populations fonctionnelles appelées Th1 et Th2 (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann & R. L. Coffman, 1989). En fonction du phénotype des DC, de l'environnement cytokinique et de l'incompatibilité du CMH, les précurseurs CD4 alloréactifs Th0 vont se différencier en cellules de phénotype Th1 ou Th2 principalement (Mosmann & Sad, 1996). Les mécanismes qui les régulent sont maintenant bien connus mais depuis, de nombreuses études ont mis en évidence d'autres sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ comme les cellules T régulatrices, les cellules Th3, les cellules Th17, les cellules T folliculaires auxiliaires (TFH) et plus récemment les cellules Th22 et les cellules Th9.

En général, les DC induisent une réponse de type Th1 envers des pathogènes intracellulaires comme des bactéries, des virus ou des parasites intracellulaires. Dans ce cas, elles sécrètent des cytokines de la famille de l'IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27), de l'IL-18 et des interférons de type I (IFN- α , IFN- β) (de Jong *et al.*, 2005). Les lymphocytes Th1 expriment le facteur de transcription T-bet, ce qui leur fait produire des quantités importantes d'IFN- γ ; cette cytokine va activer les macrophages et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques qui vont ensuite pouvoir détruire les cellules infectées. Les cellules CD8⁺ vont agir par différents mécanismes : l'interaction de Fas/FasL (Rouvier *et al.*, 1993) ou la sécrétion d'enzymes cytotoxiques comme granzyme B ou les perforines (Kägi, Ledermann, Bürki, Hengartner & Zinkernagel, 1994; Kägi, Ledermann, Bürki, P. Seiler, *et al.*, 1994) (Kägi *et al.*, 1994) qui initient

l'apoptose (mort cellulaire programmée) de leurs cibles. Les lymphocytes CD4⁺ peuvent également se différencier en cellules cytotoxiques, exerçant leur activité de lyse via l'interaction Fas/FasL (Kägi *et al.*, 1996). Les macrophages, quant à eux, vont contribuer à la destruction des cellules cibles via la sécrétion de médiateurs oxydants et pro-inflammatoires (*i.e.* l'hypersensibilité retardée) (Kobayashi *et al.*, 2001) (**Figure 2**).

En transplantation, la présence d'incompatibilités CMH de classes I et II favorise la réponse Th1 à cause de la reconnaissance simultanée du classe I et du classe II par les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes T CD8⁺ produisent alors l'IFN- γ nécessaire pour générer une réponse Th1 des lymphocytes T CD4⁺ activés par les voies directe et indirecte. Une réponse Th1 est également prédominante lors d'incompatibilités de classe I isolées, toujours due à la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ activés agissant alors sur les lymphocytes T CD4⁺ activés de manière indirecte. En revanche, dans le cas d'incompatibilités CMH de classe II uniquement, l'absence de la composante CD8 et donc de l'IFN- γ , favorise l'orientation vers un environnement Th2 pour les lymphocytes T CD4⁺ activés par les voies directe et indirecte (Le Moine *et al.*, 2002). Dans la réponse Th2, les DC vont produire de l'IL-4 et/ou la chimiokine MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) pour induire une réponse de type Th2. L'interaction Ox40/Ox40L semble également contribuer au développement d'une réponse Th2 (de Jong *et al.*, 2005). Les lymphocytes Th2 expriment le facteur de transcription GATA-3 et vont sécréter de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, ce qui va promouvoir la production d'IgE et ainsi activer les mastocytes et les éosinophiles qui exercent une action de destruction par dégranulation (Kadowaki, 2007). Les cellules Th2 vont également soutenir la réponse immune humorale dont l'effecteur principal est le lymphocyte B (**Figure 2**).

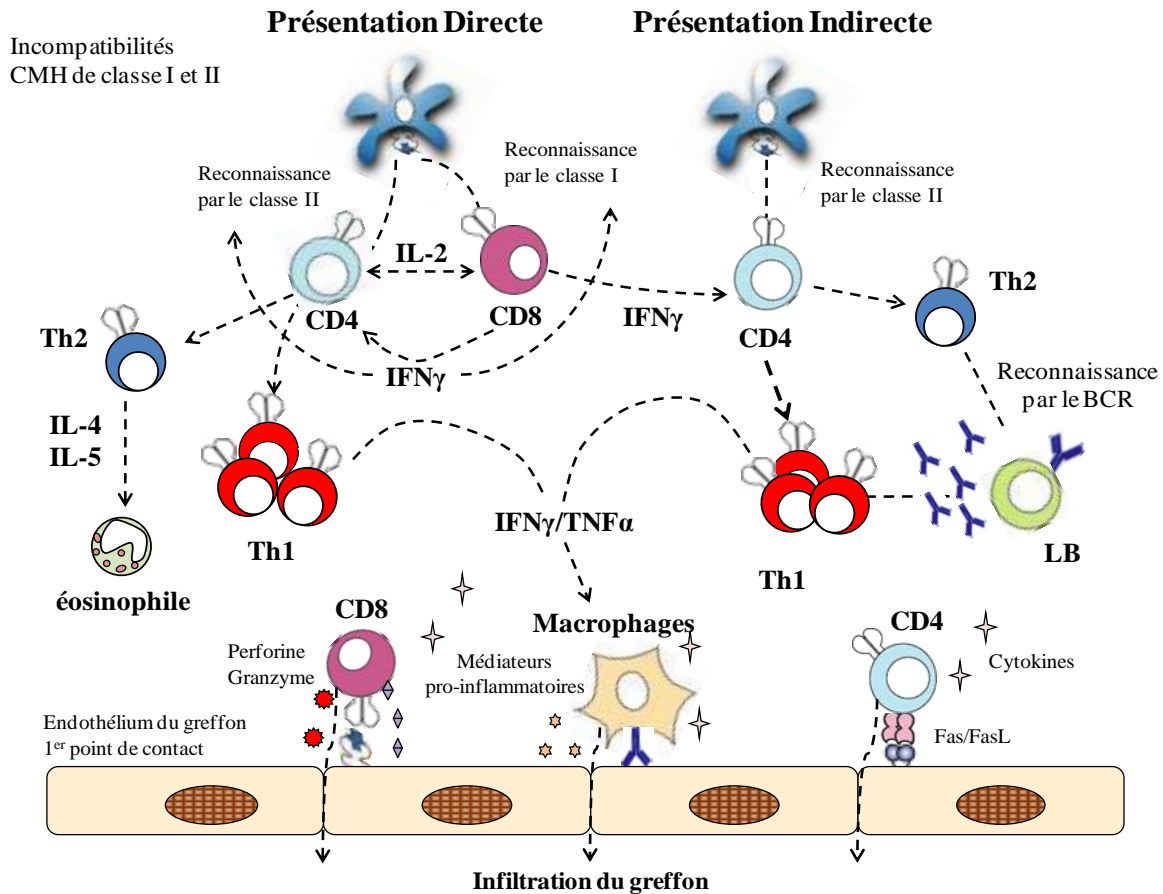


Figure 2 : Représentation schématique des réponses cellulaires en transplantation.

I-3.2 La réponse humorale

Les lymphocytes B sont les acteurs majeurs de l'immunité humorale spécifique. Ils agissent par l'intermédiaire du récepteur spécifique pour l'antigène qu'ils expriment à leur membrane, l'immunoglobuline de surface (sIg). Les lymphocytes B ne possèdent qu'une seule spécificité antigénique (un site anticorps unique) qui reste la même sur des isotypes différents. Le stade ultime de l'activation des lymphocytes B par leur antigène spécifique les différencie en plasmocytes dont la seule fonction est de sécréter un anticorps porteur du même paratope que l'sIg des lymphocytes B primordiaux.

En périphérie, les lymphocytes B naïfs vont rencontrer leur antigène spécifique dans le ganglion lymphatique au sein du follicule lymphoïde. Leur maturation finale nécessite la présence de cellules folliculaires dendritiques qui leur présentent l'antigène. Pour la majorité des antigènes, il est nécessaire d'avoir également la collaboration d'une sous-population particulière de lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ dits Th2. Ces derniers interagissent avec les lymphocytes B qui leur présentent l'Ag par leurs molécules de CMH de classe II, l'interaction de molécules de costimulation (CD40/CD40L, ICOS/ICOSL et CD28/CD80-86) et de

cytokines qu'ils sécrètent (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10). Cette différenciation a lieu dans le centre clair germinatif du follicule secondaire : par un mécanisme d'hypermutations somatiques, les centroblastes de la zone sombre augmentent la diversité et l'affinité de leurs sIg que leurs descendants (centrocytes) sélectionnent au contact de l'antigène dans la zone claire du centre germinatif, avant de donner naissance soit à des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, soit à des lymphocytes B de type mémoire.

Lors d'une première rencontre avec un antigène donné (réponse primaire) ou lors de la réintroduction du même antigène (réponse secondaire), la réponse diffère par le délai d'apparition, sa rapidité et son intensité, l'affinité et la classe des anticorps. La réponse anticorps secondaire apparaît après une phase de latence plus courte. Elle atteint un plateau de niveau plus élevé avec des anticorps d'affinité plus forte et de nature IgG principalement, alors qu'ils sont de classe IgM pour la réponse primaire. Ainsi les anticorps, qui sont les médiateurs de l'immunité humorale, remplissent leur rôle de défense grâce à 4 modes d'actions : la neutralisation des micro-organismes et de leurs toxines, l'opsonisation facilitant l'ingestion par les cellules phagocytaires, l'ADCC (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*), et surtout l'activation du complément (pour les IgM et IgG) conduisant à l'opsonisation et la lyse des cellules ciblées.

I-4 Le rejet d'allogreffe

La conséquence naturelle d'une greffe de cellules, de tissus ou d'organes entre individus de la même espèce mais génétiquement différents est le rejet d'allogreffe. Trois formes de rejet ont été initialement décrites (**Tableau 2**). Elles se caractérisent par leur cinétique plus ou moins précoce après la greffe, par les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu et par les types de lésions constituées au niveau du greffon.

| Type de rejet | Survenue | Histologie | Pathologie | Acteurs du rejet | Thérapie/Issue |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Rejet hyperaigu | Echec de la greffe immédiat Quelques minutes à quelques heures après la reperfusion | Neutrophiles dans les glomérules et les CPT, hémorragie, nécrose et thrombose | Cellules endothéliales endommagées et thrombose vasculaire | Anticorps anti-donneur, complément et activation des cellules endothéliales | Presque toujours irréversible |
| Rejet aigu | Perte rapide des fonctions du greffon (jours) à n'importe quel moment après la transplantation | Neutrophiles et macrophages dans les glomérules et les CPT, nécrose artérielle et tubulaire | Activation des lymphocytes T par les antigènes du greffon et destruction progressive des tissus infiltrés | Lymphocytes T, B, macrophages et cellules NK | Souvent réversible avec un traitement approprié |
| Rejet chronique | Perte lente et progressive des fonctions du greffon (mois à années) avec protéinurie et hypertension | Fibroses interstitielles et intimales, infiltration de cellules mononucléaires | Activation vasculaire pathologique | Traumatisme vasculaire et activation des lymphocytes T | Thérapie optimale pas encore définie |

CPT : capillaires péritubulaires

Tableau 2 : Résumé des rejets d'allogreffes chez l'homme.

(D'après (Colvin, 2007))

I-4.1 Le rejet hyper aigu

Le rejet hyperaigu survient rapidement après la greffe (en moins de 24h) chez des individus dits hyperimmunisés. Ce rejet est principalement dû aux anticorps préformés dans le sérum de l'hôte suite à une transfusion, une greffe ou une grossesse. Ces anticorps sont majoritairement dirigés contre les antigènes ABO (PORTER, 1965; Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1966) ou les molécules du CMH présentes à la surface des cellules endothéliales du greffon (G. M. Williams *et al.*, 1968). Leur fixation va entraîner l'activation intense de la cascade du complément qui aboutit à la destruction des cellules cibles par le complexe d'attaque membranaire (C5b9) ainsi qu'à la libération de médiateurs inflammatoires comme l'IL-8, MCP-1 ou le facteur de Von Willebrand (S. Nakashima *et al.*, 2002). Les cellules de l'endothélium vont alors se rétracter, ce qui va augmenter la perméabilité des vaisseaux, provoquant des hémorragies, des thromboses, puis l'ischémie et la mort rapide de l'organe (Rocha *et al.*, 2003). La prévention du rejet hyperaigu s'effectue par la recherche systématique d'alloanticorps présents chez le receveur et par l'assurance de la compatibilité du système ABO par un test de « cross-match » entre le donneur et le receveur. De ce fait, ce type de

rejet est devenu un évènement rare en transplantation clinique. Cependant, le rejet hyperaigu constitue encore à l'heure actuelle une barrière majeure en xénotransplantation (Phelps *et al.*, 2003).

I-4.2 Le rejet aigu

Le rejet aigu se développe chez l'homme durant le premier trimestre suivant la transplantation. Jusqu'à la découverte des traitements immunosuppresseurs, il était la principale cause du rejet de greffe. Il peut être médié par les lymphocytes T et/ou par les anticorps, donnant lieu à un rejet aigu à médiation cellulaire et/ou à un rejet aigu à médiation humorale, respectivement. Il est ainsi dépendant de l'activation lymphocytaire T du receveur, spécifique du donneur, aboutissant à l'activation de cellules CD4⁺ auxiliaires et CD8⁺ cytotoxiques (Auchincloss *et al.*, 1993; Pietra *et al.*, 2000; Popov *et al.*, 1995) et de plasmocytes produisant des alloanticorps (Steele *et al.*, 1996).

Les DC présentes dans le greffon migrent vers les ganglions lymphatiques et stimulent une réponse immunitaire allogénique primaire. Ainsi, après une première activation suite à l'alloreconnaissance des antigènes du donneur au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Lakkis *et al.*, 2000), les lymphocytes T auxiliaires alloréactifs migrent vers le greffon et endommagent le tissu par différents mécanismes effecteurs. Le contexte proinflammatoire au niveau des cellules endothéliales du greffon va ainsi faciliter le recrutement et donc l'infiltration massive du greffon par des cellules mononuclées comme les macrophages et les lymphocytes T du receveur (Pober & Cotran, 1990; T. Collins *et al.*, 1984).

Cette infiltration s'accompagne de la génération de cellules T cytotoxiques. Ces dernières vont s'accumuler, une fois activées, dans le greffon (S. Y. Chan *et al.*, 1995) où elles vont pouvoir exercer leur activité cytotoxique à l'encontre de leurs cellules cibles selon deux voies essentielles : la voie perforine/granzyme de façon prédominante et la voie Fas/FasL (Kreisel, Krupnick, Balsara, *et al.*, 2002).

Par ailleurs, une fois activé, les lymphocytes T CD4⁺ vont notamment fournir aux cellules B l'aide nécessaire pour leur division et pour leur production d'anticorps. Après fixation à la surface de la cellule cible, notamment les cellules endothéliales du greffon, les anticorps peuvent entraîner directement la mort de la cible par l'activation de la cascade du complément. Parallèlement, après s'être associées à leurs récepteurs Fcγ présents, entre autres, à la surface des cellules NK (*Natural Killer*), les immunoglobulines peuvent tuer indirectement leur cible via l'ADCC en activant les mécanismes cytolytiques de la cellule NK.

I-4.3 Le rejet chronique

Grâce à l'utilisation des immunosuppresseurs, le rejet aigu est plus ou moins contrôlé avec succès. La découverte des drogues immunosuppressives a, de ce point de vue, permis des progrès importants en transplantation. La survie à court terme des greffons a ainsi considérablement augmenté. Cependant, malgré ces avancées, une faible quantité de patients perdent leur transplant. Cette observation est due à une destruction lente, progressive et irréversible des fonctions du greffon, appelée pendant longtemps rejet chronique (RC) puis dénommée vasculopathie chronique d'allogreffe (CAV). Contrairement au rejet aigu qui est la conséquence d'une réponse immunitaire exacerbée à l'encontre de l'organe étranger transplanté, celui-ci est dominé par le remodelage pathologique du tissu greffé (Orosz & Pelletier, 1997). En effet, la CAV n'est pas caractérisée par une destruction de l'organe, mais par une diminution de la lumière des vaisseaux du greffon liée à un épaississement de leur paroi suite à une prolifération des cellules musculaires lisses. Par ailleurs, le greffon est envahi par de la fibrose interstitielle. De physiopathologie toujours mal définie, la CAV ne répond que faiblement aux traitements immunosuppresseurs suggérant que ses origines ne sont pas uniquement d'ordre immunologique. Cependant, diverses études de biopsies de greffons développant des dysfonctions chroniques ont permis de mieux la caractériser histologiquement, comme l'atteste la dernière classification de Banff pour le rein (Sis *et al.*, 2010). Ainsi, la CAV est subdivisée en deux parties : le RC actif médié par les anticorps et la néphropathie du transplant. Le RC est défini par la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques ou non du donneur et de produits issus de l'activation du complément au sein du greffon, comme le C4d. Histologiquement, ce RC est également associé à divers signes de souffrance chronique : glomérulopathie d'allogreffe (dédoublage de la membrane basale du glomérule) et/ou épaississement fibreux de l'intima des artères et/ou des capillaires péri-tubulaires (CPT) multicouches et/ou fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FI/AT). Ce RC doit être distingué, en pratique clinique, de la néphropathie chronique du greffon ou FI/AT, qui est la résultante de lésions non immunologiques, comme l'hypertension artérielle chronique, la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine (CNI), des pyélonéphrites bactériennes ou infections virales, ... Cette classification énumère ainsi les aspects non-immunologiques et immunologiques, tels que les alloanticorps et l'activation du complément, mais ne prend pas en compte la composante cellulaire dans le RC actif. En effet, le développement du RC est un processus comportant plusieurs étapes clefs qui peuvent être distinguées en fonction des types de cellules infiltrantes, de cytokines et de facteurs de croissance impliqués dans les lésions tissulaires. Les étapes initiales du RC sont associées à une réponse inflammatoire, proche

d'une DTH (*Delayed-Type Hypersensitivity*) et dominée par une infiltration massive de monocytes/macrophages dans l'intima. Dans des modèles de greffe chez le rat, il a pu être montré que ces étapes précoces étaient aussi caractérisées par l'attachement de nombreuses cellules T et la production *in situ* d'IL-1, d'IFN- γ et de TNF- α . Il a de plus été rapporté que la production de la chimiokine MCP-1 par les macrophages résidents amplifiait le recrutement de cellules inflammatoires (D. H. Adams *et al.*, 1993). Dans les phases plus tardives, l'infiltration cellulaire est dominée par les macrophages, le nombre de cellules T diminuant peu à peu. Ces étapes sont caractérisées par la prolifération des cellules musculaires lisses et endothéliales, et l'épaississement secondaire de l'intima. Avec le temps, ces phénomènes s'amplifient et des cytokines de type Th2, telles que l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β , cytokines impliquées dans le remodelage et la fibrose tissulaire, apparaissent dans le greffon. Ces cytokines vont conduire au dérèglement de la balance synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire, et ainsi, à l'apparition d'une fibrose concentrique (Waaga *et al.*, 2000; Bojakowski *et al.*, 2000). Parallèlement, les cellules musculaires lisses expriment à des niveaux élevés les récepteurs aux facteurs de croissance *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF- α , - β) et *Epidermal Growth Factor* (EGF), critiques pour leur prolifération et leur migration vers l'intima. Ces deux événements aboutissent à la formation d'un épaississement diffus : la néo-intima, pouvant entraîner, dans les cas les plus graves, une obstruction artérielle totale conduisant à l'ischémie de l'organe, la fibrose de son parenchyme et ainsi à la mort du greffon.

Ainsi, la prévention du RC demeure une priorité dans la transplantation et semble réalisable. En effet, certaines études mettent en relation le rôle du blocage sélectif de la costimulation CD28/CD80-86 et l'absence de développement de RC chez le rongeur (Haspot *et al.*, 2002; A.-S. Dugast *et al.*, 2008; Guillonnet *et al.*, 2005).

I-5 La tolérance

La mise en place d'une réponse immunitaire effectrice est nécessaire afin de défendre l'organisme. Néanmoins, cette réponse immunitaire doit être contrôlée afin de ne pas être exacerbée et ne doit pas générer de réponse effectrice envers le soi. Malgré la sélection négative des lymphocytes autoréactifs dans le thymus, qui constitue la tolérance centrale, certaines cellules qui reconnaissent les antigènes du soi se retrouvent en périphérie. Une régulation de la réponse immunitaire en périphérie, définie comme étant la tolérance périphérique, est donc indispensable à la fois pour réguler les cellules T autoréactives afin

d'éviter l'apparition de maladies autoimmunes et pour réguler l'intensité des réponses immunitaires contre le « non-soi ». Ainsi, la reconnaissance du « soi » et du « non-soi » est une des propriétés fondamentales du système immunitaire.

Dans le cas de l'allogreffe, la tolérance se caractérise par l'acceptation sur le long court du greffon en l'absence de traitement immunosuppresseur. Le receveur doit, par ailleurs, être toujours capable de produire une réponse immune contre d'autres antigènes. L'état de tolérance devrait permettre à terme de prévenir le rejet chronique. Seuls quelques cas de tolérance à l'allogreffe rénale ont été décrits chez des patients ayant arrêté leur traitement immunosuppresseur suite à une non compliance ou à l'apparition de cancer (Ashton-Chess *et al.*, 2007).

I-5.1 La tolérance centrale

Pour assurer une réponse immune efficace, le système immunitaire doit comporter des cellules T capables de reconnaître et de répondre à un nombre important d'antigènes étrangers. Pour une large part, ceci est réalisé par les multiples réarrangements des gènes du TCR au cours de l'ontogénie qui aboutit à la production d'une grande variété de spécificités antigéniques. Le thymus joue un grand rôle dans la génération de ce répertoire lymphocytaire T (J. F. A. P. Miller, 2002; Zinkernagel *et al.*, 1978; Bevan, 1977) et donc dans l'induction de la tolérance (**Figure 3**). Pour permettre au lymphocyte T d'assurer sa fonction, le TCR ainsi généré doit être capable de reconnaître le CMH du soi. En raison du caractère stochastique du réarrangement somatique, seuls 5% des précurseurs de lymphocytes T (G. Anderson *et al.*, 1998), les thymocytes double-positifs ($CD4^+CD8^+$), vont être réellement capables d'interagir avec les complexes CMH/peptide du soi présentés par les cellules épithéliales corticales du thymus (Hogquist & Bevan, 1996). Une sélection des lymphocytes T dits « utiles » est donc indispensable. Cette étape de « sélection positive » s'effectue par défaut. Près de 90% des thymocytes meurent donc par négligence, car ils ne peuvent intégrer les signaux dépendants de l'engagement du TCR, nécessaires à leur survie. Ainsi, selon la classe du CMH que leur TCR a pu lier, les thymocytes double-positifs perdent l'un des deux marqueurs et deviennent simple-positifs. Cependant, le compartiment lymphocytaire T ainsi sélectionné est fortement enrichi en cellules ayant une forte affinité pour les antigènes du soi et donc dangereuses pour l'organisme. Dans des modèles expérimentaux dans lesquels l'expression des molécules du CMH est restreinte aux cellules épithéliales du cortex (cTEC), il a en effet été montré que le répertoire de lymphocytes T qui se développe est en partie autospécifique (Capone *et al.*, 2001; Laufer *et al.*, 1996). Ces cellules sont fonctionnelles et potentiellement autoréactives

puisque, *ex vivo*, elles sont capables de répondre à une stimulation délivrée par des CPA syngéniques. Une étape de sélection, visant à éliminer ces cellules dangereuses, est donc nécessaire : c'est la sélection négative. Contrairement à la sélection positive qui a lieu au niveau des cellules épithéliales dans le cortex thymique, la sélection négative se fait dans la médulla du thymus. C'est là que seront éliminées les cellules T qui réagissent fortement aux interactions entre le CMH présentant un peptide du soi. Il a notamment été montré que l'épithélium médullaire est susceptible d'induire la délétion partielle de thymocytes spécifiques de superantigènes (Degermann *et al.*, 1994) ou d'antigènes tissulaires (Gallegos & Bevan, 2004). L'implication des cellules épithéliales thymiques de la médulla a été renforcée avec l'identification de AIRE (*Autoimmune regulator*), une protéine présentant des similitudes importantes avec des facteurs de transcription, et dont l'expression, restreinte aux tissus lymphoïdes, est particulièrement élevée dans les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) (Kyewski & Derbinski, 2004). AIRE entraîne l'expression de nombreuses protéines dans le thymus pouvant être rencontrées en périphérie. De ce fait, l'expression de AIRE permet donc d'établir un état de tolérance de soi par délétion clonale des thymocytes autoréactifs (Zuklys *et al.*, 2000; Derbinski *et al.*, 2005). En effet, différentes études ont montré que des souris déficientes pour ce gène (AIRE^{-/-}) présentent un défaut dans l'induction de tolérance, traduit par le développement de maladies autoimmunes (M. S. Anderson *et al.*, 2002; Liston *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2005). Chez l'homme également, sa déficience provoque une pathologie semblable, autosomique récessive monogénique (Aaltonen *et al.*, 1994), baptisée APECED (*Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*). L'activité de la protéine AIRE permettrait donc, via l'induction ectopique d'antigènes présentant une spécificité tissulaire, de prévenir l'autoimmunité.

Environ 1 à 3% seulement des précurseurs de cellules T qui entrent dans le thymus survivent à la sélection positive et négative. Ces lymphocytes quittent le thymus pour se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires (R. G. Scollay *et al.*, 1980; Egerton *et al.*, 1990; Goldrath & Bevan, 1999).

Outre l'élimination des clones autoréactifs permettant d'induire une tolérance aux molécules du soi, la médulla favorise également la sélection positive de lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (S. Sakaguchi, 2004; Watanabe *et al.*, 2005; Fontenot, Rasmussen, L. M. Williams, *et al.*, 2005). Les cellules épithéliales médullaires permettent le développement des lymphocytes T régulateurs (Treg) en favorisant l'expression de Foxp3 dans les thymocytes doubles positifs de façon dépendante des signaux via CD28 (S. Sakaguchi, 2005; Aschenbrenner *et al.*, 2007; S. Sakaguchi *et al.*, 2008). Une étude a suggéré

que l'expression des ligands de CD28 (les molécules CD80 et CD86, appelées également B7.1 et B7.2, respectivement) n'était pas restreinte à la zone médullaire du thymus et qu'elle s'étendait aussi aux cellules épithéliales du cortex rendant la localisation de la sélection positive des Treg incertaine (D. H. D. Gray *et al.*, 2006).

En transplantation, une tolérance centrale peut être obtenue à la suite du développement d'un chimérisme hématopoïétique, correspondant à la colonisation du thymus par des cellules hématopoïétiques du donneur qui vont participer à la sélection du répertoire lymphocytaire (Goldrath & Bevan, 1999). Les thymocytes capables de reconnaître les auto-antigènes, mais également les antigènes du donneur, comme éléments du soi meurent ainsi par apoptose suite à la sélection négative dans le thymus. De nombreuses études montrent ainsi que l'établissement d'un chimérisme hématopoïétique en allotransplantation conduit à un état de tolérance immunologique, non seulement chez le rongeur, mais aussi chez le porc, le primate et chez l'homme (Sykes & Sachs, 1988; Kawai *et al.*, 1995; Bühler *et al.*, 2002; Kawai *et al.*, 2008). Cependant, les applications cliniques restent limitées et peu développées, notamment en raison de la toxicité des traitements d'induction (greffe de moelle combinée, irradiation totale ou thymique, ...).

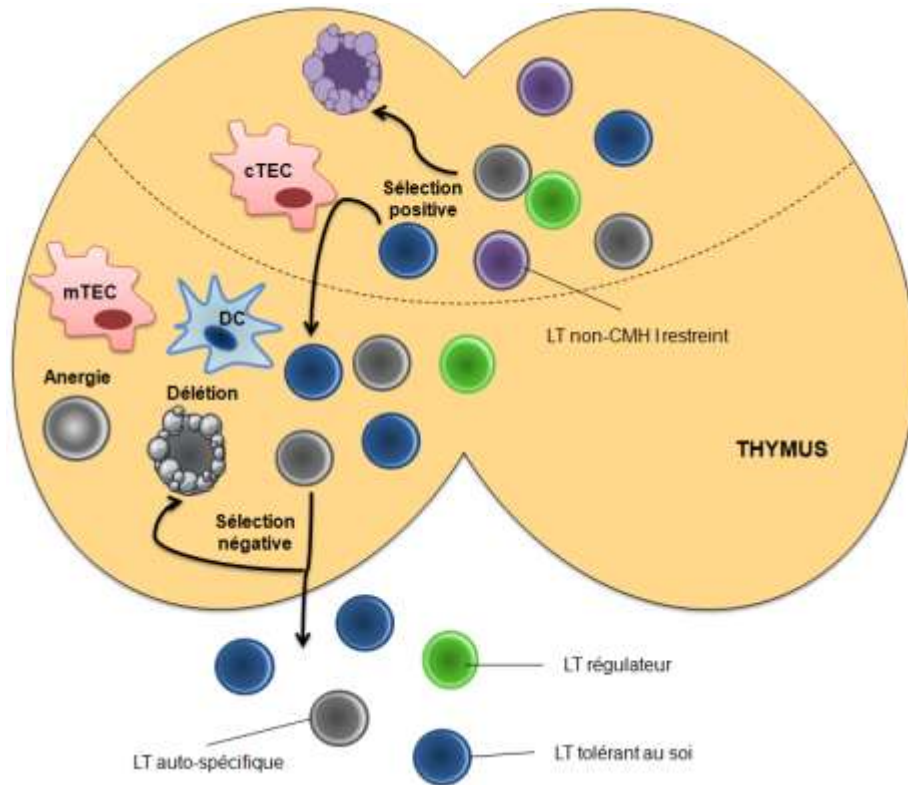


Figure 3 : Les mécanismes de la tolérance centrale.

mTEC : cellule épithéliale thymique médullaire ; **cTEC** : cellule épithéliale thymique corticale ; **LT** : lymphocyte T ; **DC** : cellule dendritique

I-5.2 La tolérance périphérique

Les différentes étapes de sélection que connaît un lymphocyte T permettent ainsi d'éliminer les cellules T « inutiles » car incapables de reconnaître les molécules de CMH du soi, et, les cellules dangereuses car présentant une trop forte affinité pour les antigènes du soi. Pourtant malgré l'activité d'AIRE, tous les antigènes tissulaires ne sont pas exprimés dans le thymus (L. Klein *et al.*, 2000) ou sont exprimés à des niveaux insuffisants pour induire la délétion de l'ensemble des cellules auto-spécifiques. Il en résulte la sortie du thymus de lymphocytes T matures auto-spécifiques et donc potentiellement autoréactifs (Bouneaud *et al.*, 2000; R. Liblau *et al.*, 1991; Lohmann *et al.*, 1996). L'existence d'une tolérance périphérique est donc nécessaire pour inactiver les cellules T autoréactives. Cette tolérance périphérique repose sur plusieurs mécanismes : la tolérance passive (*i.e.* l'ignorance, la délétion, l'anergie et la déviation phénotypique) (**Figure 4**) et la tolérance active (*i.e.* et la régulation/suppression).

I-5.2.1 La tolérance passive

L'ignorance

L'ignorance est une absence d'activation de la cellule T qui conduit à une relation d'acceptation mutuelle de l'antigène et de la cellule effectrice (Melero *et al.*, 1997). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine du phénomène d'ignorance. Ainsi, chez l'adulte, l'ignorance réside principalement dans la séquestration des antigènes pour que les cellules immunitaires ne puissent pas atteindre certains tissus et organes vitaux où une réaction inflammatoire pourrait s'avérer délétère (*i.e.* le cerveau, la chambre antérieure de l'œil ou les testicules). En effet, l'encapsulation d'îlots pancréatiques de porc dans une membrane d'alginate semi-perméable permet une survie du xélogreffon supérieure à 6 mois chez le primate en absence d'immunosuppression (Dufrane *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'absence d'activation des lymphocytes T autospécifiques a aussi été associée à une trop faible expression de l'antigène, en dépit de DC pleinement fonctionnelles (Kurts *et al.*, 1998). Enfin, des cellules T autospécifiques demeurent ignorantes car elles expriment un TCR de trop faible affinité pour son ligand. En effet, le seuil d'affinité de l'interaction TCR/CMH/peptide conduisant à la délétion clonale des thymocytes est plus faible que le seuil requis pour l'activation des cellules T en périphérie (Pircher *et al.*, 1991). Toutefois, même si elle aboutit à l'absence de déclenchement des pathologies autoimmunes, l'ignorance ne peut être considérée comme un mécanisme d'induction de tolérance à part entière. En effet, les cellules T autospécifiques, ni éliminées, ni anergisées, demeurent physiquement et fonctionnellement présentes au sein du répertoire T périphérique.

La délétion/L'apoptose

Bien qu'essentielle dans le thymus, la délétion clonale des cellules alloréactives peut également avoir lieu en périphérie par plusieurs mécanismes. Deux mécanismes d'apoptose sont impliqués dans la délétion clonale des lymphocytes T : d'une part l'apoptose passive lorsque les cellules T sont privées de facteurs de croissance (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21) permettant l'activation de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xl, d'autre part l'apoptose active induite par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur (*Activation-Induced Cell Death* ou AICD) (Y. Li, X. C. Li, *et al.*, 1999). L'AICD peut également survenir lors de stimulations par de fortes concentrations en antigène chez les lymphocytes T CD8⁺ (Alexander-Miller *et al.*, 1996) ou CD4⁺ (R. S. Liblau *et al.*, 1994) et par un mécanisme mettant essentiellement en jeu la voie Fas/FasL (CD95/CD95L) (Dhein *et al.*, 1995).

L'importance de cette voie est suggérée par l'analyse des animaux déficients pour l'une ou l'autre des molécules. En effet, les souris CD95^{-/-} (lpr/lpr) et CD95L^{-/-} (gld) développent une pathologie autoimmune proche du lupus érythémateux (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992; T. Takahashi *et al.*, 1994). De même, un défaut dans la voie Fas est associée chez l'homme à un syndrome autoimmun lymphoprolifératif (Rieux-Laucat *et al.*, 1995; G. H. Fisher *et al.*, 1995). Par ailleurs, cette voie Fas/FasL est un des mécanismes impliqués dans la tolérance foëto-maternelle chez l'homme où les trophoblastes (exprimant FasL) sont capables d'induire une apoptose des lymphocytes T maternels activés (exprimant Fas) (Makrigiannakis *et al.*, 2001). Cependant, l'établissement d'une tolérance, après une allogreffe cardiaque par délétion clonale chez souris déficientes pour la molécule Fas, suggère que d'autres mécanismes de délétion existent en périphérie (X. C. Li, Y. Li, *et al.*, 1999). Il existe, toutefois, certaines stratégies thérapeutiques qui se basent sur ces mécanismes de délétion clonale. C'est notamment le cas des anticorps induisant une apoptose sélective des lymphocytes T activés : les anti-CD40L qui agissent par un mécanisme Fc-dépendant (Monk *et al.*, 2003) et également certains anti-CD28 agonistes qui agissent par un mécanisme IFN- γ dépendant (X.-Z. Yu *et al.*, 2004).

L'anergie/L'inhibition

L'anergie, ou paralysie lymphocytaire, est l'incapacité fonctionnelle de lymphocytes T naïfs activés par un antigène à proliférer lorsqu'ils sont restimulés par cet antigène (M. K. Jenkins & Schwartz, 1987). La cellule reste vivante mais est incapable de proliférer et de synthétiser de l'IL-2 (Schwartz, 1990). L'anergie est un processus en deux étapes :1) un processus d'activation « incomplète », généralement lié à l'engagement du TCR (signal 1) sans signaux de costimulation (signal 2), mais aussi dans certains modèles à l'altération du premier signal par liaison du récepteur avec un ligand peptidique modifié, de faible affinité pour le récepteur. Cette anergie est réversible en présence de grandes quantités d'IL-2 ou par un signal via Ox40 (Schwartz, 2003). Au niveau moléculaire, l'interaction avec CD28 induit l'hétérodimère AP-1 (*Activator Protein 1*), qui se complexe avec le facteur de transcription NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*), activé par la signalisation calcique soutenue qui suit l'engagement du TCR. Un programme transcriptionnel alternatif est accompli par NFAT en absence d'AP-1, conduisant à l'incapacité du lymphocyte T d'engager une réponse proliférative, de produire de l'IL-2 ou de se différencier, et à la synthèse d'IL-10 (Macián *et al.*, 2002). Enfin, l'anergie va également dépendre des molécules de costimulation inhibitrices comme CTLA-4 ou PD-1. En effet, l'absence de l'expression de CTLA-4 procure aux cellules une résistance à l'induction

de l'anergie (Greenwald *et al.*, 2001). La présence de l'antigène est nécessaire au maintien de l'anergie (Schwartz, 2003). L'interaction PD-1/PD-L1, quant à elle, inhiberait la prolifération et la sécrétion de cytokines.

En transplantation, l'exposition au préalable, *in vitro*, des cellules T du receveur aux CPA du donneur, en présence d'un blocage de la costimulation par des anticorps anti-CD80/86 (anti-B7), leur confère des propriétés anergiques. Ainsi, le transfert de ces lymphocytes rendus anergiques induit une tolérance à l'allogreffe rénale chez le primate après une courte induction par immunosuppression classique (Bashuda *et al.*, 2005).

La déviation phénotypique

En détournant la réponse immune vers une réponse peu agressive ou inadaptée, la déviation phénotypique permet à certains tissus de se préserver d'une inflammation dangereuse en privilégiant la fonction humorale et en inhibant l'inflammation et la cytotoxicité. D'autre part, la déviation phénotypique est l'orientation, notamment par la sécrétion de cytokines, vers une réponse qui bien qu'effectrice est non pathogène ou inadaptée. Ainsi, la mise en place d'une réponse Th2 peut s'avérer protectrice contre les pathologies de type I, et vice-versa (B. Scott *et al.*, 1994). L'exemple en est donné dans un modèle d'EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) (D. A. Young *et al.*, 2000) et un modèle de diabète (Bradley *et al.*, 1999) où les cytokines de type Th2 ont été liées à la régulation négative de l'autoimmunité, bien que ce ne soit pas toujours le cas (Pakala *et al.*, 1997). L'environnement en cytokines peut moduler le trafic des lymphocytes, en jouant un rôle dans l'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs aux chimiokines à la surface des lymphocytes T, et ainsi contrôler leur interaction avec les cellules accessoires. Ainsi, en réponse à une stimulation tolérogène, les lymphocytes T prolifèrent, mais sont en revanche incapables de migrer dans les zones folliculaires des organes lymphoïdes secondaires pour y délivrer une aide efficace aux lymphocytes B (E. R. Kearney *et al.*, 1994). L'entrée dans cette zone est en effet dépendante du récepteur CXCR5 dont l'expression optimale est associée à l'engagement de CD28 (L. S. Walker *et al.*, 1999). Dans un modèle murin, l'expression aberrante de CXCL13 ou BLC (*B-Lymphocyte Chemoattractant*, ligand de CXCR5) par les DC aboutit au développement d'un lupus autoimmun (Ishikawa *et al.*, 2001).

Outre le rôle de certaines cytokines et chimiokines promouvant la pathogénicité, la régulation des cellules autoréactives par certaines représente ainsi un autre mécanisme empêchant notamment le développement de l'autoimmunité en périphérie.

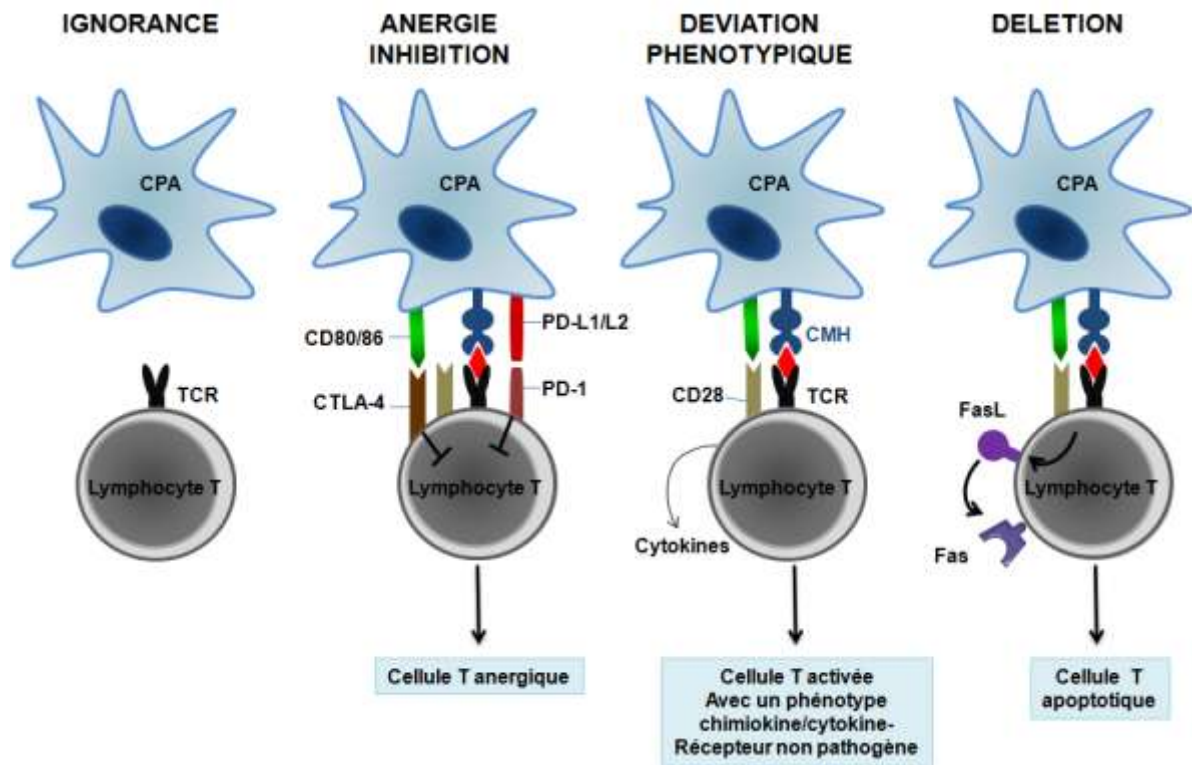


Figure 4 : Les mécanismes passifs de tolérance périphérique. D'après (L. S. K. Walker & Abbas, 2002).

I-5.2.2 La tolérance active

Régulation/suppression et modulation

La tolérance périphérique implique également de nombreuses sous-populations de cellules du système immunitaire qui vont, de par leurs propriétés immunosuppressives, inhiber l'activation et/ou les fonctions effectrices des lymphocytes autospécifiques. Ces cellules régulatrices seront décrites dans la seconde partie de cette introduction, en détaillant particulièrement les lymphocytes T régulateurs (Treg) $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ et les cellules myéloïdes suppressives (cellules régulatrices non-T).

I-5.3 La tolérance clinique dite « opérationnelle »

Malgré l'avancée majeure dans l'industrie pharmaceutique en termes d'immunosuppresseurs, qui permet de contrôler les rejets aigus et de prolonger la survie des greffons, aucun traitement ne permet à l'heure actuelle de prévenir le développement du rejet chronique. Bien qu'établi dans de nombreux modèles animaux, l'établissement d'un état de tolérance

reproductible fait toujours défaut chez l'homme. La définition de l'état de tolérance opérationnelle est ainsi basée sur la stabilité de la fonction du greffon plusieurs années après interruption du traitement immunosuppresseur, accompagnée d'une réponse immunitaire compétente (M. J. I. Ansari & Sayegh, 2004). Compte tenu de la difficulté d'accéder à des biopsies, l'état de tolérance opérationnelle ne repose pas sur une définition histologique, mais sur des critères fonctionnels du greffon, tels que les taux de créatinine et de protéinurie dans le cas de la transplantation rénale. La prévalence de la tolérance opérationnelle est dépendante de l'organe transplanté. En effet, 20-25 % des patients ayant subi une transplantation hépatique vont développer une tolérance spontanée après un protocole de sevrage des immunosuppresseurs (Martínez-Llordella *et al.*, 2007). En transplantation rénale, les cas sont beaucoup plus rares et sont dus à un arrêt des immunosuppresseurs suite à une non-compliance des patients ou à une toxicité des traitements à long terme (Ashton-Chess *et al.*, 2007).

Diverses études comparatives entre ces patients opérationnellement tolérants dans la greffe rénale, des patients « stables » sous traitement, des patients présentant un rejet chronique et des individus sains ont permis d'identifier une signature transcriptionnelle dans le sang des patients tolérants (Brouard *et al.*, 2007) et récemment un profil d'expression de gènes associé à la tolérance opérationnelle chez des patients « stables » (Brouard *et al.*, 2011).

L'analyse du sang de ces patients ne montre aucune accumulation des transcrits de cytokines inflammatoires dans les clones cellulaires T (Brouard *et al.*, 2005) et présente un taux normal de Treg (S. Louis *et al.*, 2006) avec un effet suppresseur normal (Braudeau *et al.*, 2007). A la suite d'une vaccination contre la grippe, les réponses cellulaire et humorale de ces patients ne semblent également pas différentes de celles développées chez des individus sains (Ballet *et al.*, 2006). Ils développeraient un phénomène de tolérance naturelle absent chez les patients en rejet chronique, qui ont moins de Treg en périphérie et plus de cellules mémoires que les patients stables, tolérants ou individus sains (S. Louis *et al.*, 2006; Baeten *et al.*, 2006).

II- La tolérance en transplantation : les cellules régulatrices

II-1 Les cellules T régulatrices

Contrairement aux autres mécanismes de tolérance périphérique passive, il s'agit d'un processus actif dans lequel une population de cellules contrôle ou régule l'activité d'une autre population. À l'heure actuelle, différentes populations de lymphocytes T ont été identifiées comme dotées de capacités régulatrices leur permettant de contrôler les réponses immunitaires normales et pathologiques. Ces cellules jouent un rôle indiscutable dans la tolérance périphérique, notamment en induisant la survie à long terme dans la transplantation ou en prévenant le développement de maladies autoimmunes. Elles sont classées selon deux catégories : les cellules induites dans des conditions de stimulations particulières et les cellules T régulatrices naturellement présentes dans l'organisme. Parmi les lymphocytes T régulateurs induits figurent les Tr1, les Th3, les cellules « CD4⁺CD25⁺ nTreg-like » et certaines cellules CD8⁺. Les principales cellules régulatrices naturelles décrites sont des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺, mais des cellules régulatrices ont également été décrites dans la population T CD8⁺. Enfin, d'autres types cellulaires ont été caractérisés par leur activité suppressive, comme les cellules NKT, les cellules T $\gamma\delta$, les cellules doubles négatives CD3⁺CD4⁻CD8⁻ et les cellules CD4⁺CD25⁻. Seront décrites, ci-dessous, la plupart des cellules ayant été identifiées et étudiées en transplantation. Une attention particulière sera portée aux Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

II-1.1 Les cellules T régulatrices induites

II-1.1.1 Les cellules Tr1

Les cellules Tr1 ont été décrites par le groupe de Roncarolo qui a montré que des cellules T CD4⁺ murines activées en présence d'IL-10 se différencient en cellules régulatrices produisant de forts taux d'IL-10, capables d'inhiber la colite autoimmune (Groux *et al.*, 1997). Spécifiques de l'antigène, les Tr1 peuvent se différencier à partir de cellules CD4⁺ naïves et supprimer les réponses naïves ou mémoires des Th1 et des Th2 via leur grande production d'IL-10 et TGF- β , en l'absence d'IL-4 (Groux *et al.*, 1997; M. G. Roncarolo *et al.*, 2001). Cependant, une récente étude décrit un nouveau mécanisme de suppression de ces cellules régulatrices Tr1. En effet, les cellules Tr1 vont spécifiquement lyser les CPA d'origine myéloïde via un mécanisme granzyme B (GZB) et perforine dépendant (Magnani *et*

al., 2011). Cette activité cytotoxique par les Tr1 nécessite, en outre, une reconnaissance de la molécule HLA de classe I par le TCR et est médiée par l'adhésion de la molécule CD54 avec LFA-1 et l'activation via les molécules CD2 et CD226. Par ailleurs, une fréquence élevée de cellules T CD4⁺ exprimant GZB est détectée chez des patients tolérants et corrèle avec la présence élevée de cellules T CD4⁺ produisant de l'IL-10 (Magnani *et al.*, 2011).

Les capacités régulatrices de Tr1, ainsi que leur facilité de génération, a conduit au développement de thérapies. Dans le domaine de la transplantation, leur utilisation a paru tout indiquée en raison de nombreuses données corrélant la tolérance du greffon avec la présence de cellules productrices d'IL-10 (M. G. Roncarolo *et al.*, 2006). En effet, l'induction *in vivo* de cellules Tr1 par une combinaison d'IL-10 et de rapamycine permet chez la souris d'établir une tolérance spécifique à long terme à une allogreffe d'îlots pancréatiques (Battaglia, Stabilini, Draghici, *et al.*, 2006). Un premier essai clinique de transfert de Tr1 est, par ailleurs, mené en Italie par Maria Grazia Roncarolo dans le cadre de la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte (M.-G. Roncarolo & Battaglia, 2007).

II-1.1.2 Les cellules Th3

Les cellules Th3 constituent une population de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induits et spécifiques d'antigène, qui a été décrite dans les années 1990. Elles ont été identifiées initialement chez la souris lors d'études des mécanismes associés à la tolérance orale. L'administration orale de faibles doses de MBP (*Myelin Basic Protein*) à des souris les protégeait du développement de l'EAE via l'établissement d'une tolérance périphérique (Y. Chen *et al.*, 1994). Ces cellules sont caractérisées par leur forte production de TGF-β et de cytokines de type Th2 comme l'IL-4 ou l'IL-10 (Y. Chen *et al.*, 1995). Cependant, elles sont différentes des cellules Th2 classiques ; elles sont capables de générer des mécanismes suppresseurs via leur sécrétion de TGF-β qui supprime la production et la prolifération de cytokines des cellules Th1 et Th2 (Y. Chen *et al.*, 1994). De plus, elles permettent d'induire la commutation des IgA, ainsi que la production d'IgA par les lymphocytes B (van Vlasselaer *et al.*, 1992; Weiner, 2001). Des cellules régulatrices similaires aux lymphocytes Th3 décrits chez la souris ont également été observées chez l'homme : l'administration de myéline par voie orale à des patients souffrant de sclérose en plaques génère des lymphocytes T régulateurs spécifiques d'antigènes et sécrétant du TGF-β (Fukaura, Kent, Pietrusewicz, Khoury, Weiner & Hafler, 1996b; Fukaura, Kent, Pietrusewicz, Khoury, Weiner & Hafler, 1996a). Plus tard, le groupe de Carrier a identifié un rôle majeur des Th3 dans la tolérance

immune via l'induction de la différenciation de cellules $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ en périphérie (Carrier *et al.*, 2007). En effet, le TGF- β produit par ces cellules Th3 peut induire l'expression de Foxp3 au sein de cellules $CD4^+CD25^-$ qui deviennent alors régulatrices (W. Chen, W. Jin, *et al.*, 2003). Enfin, en transplantation, les lymphocytes Th3 sont associés à la tolérance de greffe allogénique induite par transfusion des cellules sanguines du donneur (DST) chez le rat (Josien *et al.*, 1998).

II-1.2 Les cellules T $CD8^+$ régulatrices

L'existence de cellules $CD8^+$ suppressives (Ts) fut longtemps controversée. Elles furent d'abord décrites dans les années 1970. Puis des études ont décrit beaucoup plus tard une population de cellules régulatrices distinctes chez l'homme caractérisée par le phénotype $CD8^+CD28^-$. Ces lymphocytes T $CD8^+CD28^-$ peuvent être stimulés *in vitro* après plusieurs cycles de stimulation par des CPA allogéniques (Z. Liu *et al.*, 1998), xénogéniques (Ciubotariu *et al.*, 1998) ou par des CPA syngéniques chargées avec des antigènes peptidiques conventionnels (Suciu-Foca *et al.*, 2005). Les mécanismes d'action de ces cellules sont multiples puisqu'elles sont efficaces *in vitro* en absence de CPA, ce qui implique un contact direct, et que leur fonction *in vivo* dépend de leur aptitude à sécréter des cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10 et le TGF- β . Leur action suppressive est restreinte par le CMH de classe I (Qa-1) et est spécifique de l'antigène (S. Jiang *et al.*, 1998) (**Figure 5**). Elle s'exerce sur les lymphocytes T $CD4^+$ par inhibition de leur prolifération, de leur capacité à produire de l'IL-2 et de leur capacité à exprimer CD40L (Z. Liu *et al.*, 1998), mais également sur les CPA par inhibition de leur expression des molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86 (S. Jiang *et al.*, 1998; Z. Liu *et al.*, 1998) et par induction de l'expression de molécules inhibitrices, l'ILT3 et l'ILT4 (*Immunoglobulin-Like Transcript 3 & 4*) (Ciubotariu *et al.*, 1998). Le groupe de Mak a montré dans un modèle murin d'EAE, que les lymphocytes $CD8^+CD28^-$, contrairement à leur contrepartie $CD28^+$, inhibent, sans stimulation au préalable, l'activation et l'expansion clonale de lymphocytes T $CD4^+$ Th1 étant à l'origine de la pathologie (Koh *et al.*, 1992). De plus, leur transfert protège de l'induction de l'EAE (Najafian *et al.*, 2003). Ces résultats ont été confirmés dans un autre modèle, le modèle de la colite avec des cellules $CD8^+CD28^-$ naturelles chez la souris (Ménager-Marcq *et al.*, 2006). Par ailleurs, ces cellules régulatrices expriment de nombreux marqueurs caractéristiques des cellules régulatrices naturelles comme : Foxp3, GITR, CTLA-4, CD103 et 4-1BB (Scotto *et al.*, 2004). En transplantation, les lymphocytes $CD8^+CD28^-$ ont été trouvés et étudiés chez des

receveurs suite à une greffe de cœur chez l'homme (Colovai *et al.*, 2003) ou de foie chez le rat (Y. Liu *et al.*, 2007) et chez l'homme (Y.-X. Lin *et al.*, 2009)

Par ailleurs, il existe également les lymphocytes T suppresseurs $CD8^+CD28^-$ de type 2 qui inhibent la prolifération des cellules T, mais aussi la lyse exercée par les cellules cytotoxiques. Ils sont générés *in vitro* après activation par des monocytes en présence d'IL-2 et de GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) pendant une semaine. Leur activité suppressive ne nécessite pas d'interaction avec les CPA ; elle est médiée par des facteurs solubles, notamment l'IFN- γ et l'IL-6 (Filaci & Suci-Foca, 2002).

D'autres sous-populations de Ts ont depuis été caractérisées. Ainsi, l'équipe de Saoudi décrit en 2004 les cellules T $CD8^+CD45RC^{low}$ dans un modèle de GVHD (*Graft Versus Host Disease*) chez le rat (Xystrakis, Dejean, *et al.*, 2004). L'analyse du taux d'expression de CD45C sur les cellules $CD8^+$ a permis de différencier deux sous-populations, $CD8^+CD45RC^{high}$ et $CD8^+CD45RC^{low}$, aux caractéristiques différentes, de par leur fonction, mais également par leur profil de cytokines (Xystrakis, Cavailles, *et al.*, 2004). Ainsi, seules les cellules ayant une faible expression de CD45C sont dotées de capacités régulatrices. Ces cellules $CD8^+CD45RC^{low}$, non cytotoxiques, produisent des cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13 et expriment les marqueurs caractéristiques des cellules régulatrices naturelles comme Foxp3, CTLA-4 ou GITR (Xystrakis, Dejean, *et al.*, 2004). Elles inhibent la prolifération et la différenciation des lymphocytes $CD4^+$ alloréactifs en cellules de type Th1 de manière contact-dépendante (Xystrakis, Dejean, *et al.*, 2004). Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, le blocage de la costimulation CD40/CD40L génère un clone de cellules T $CD8^+CD45RC^{low}$ régulatrices capables de prévenir le rejet aigu mais pas le rejet chronique (Guillonau, Hill, *et al.*, 2007). Dans ce modèle, les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ induisent une suppression locale via la sécrétion d'IFN- γ qui, à son tour, permet la synthèse d'IDO par les cellules endothéliales du greffon (Guillonau, Hill, *et al.*, 2007). Enfin, récemment, toujours dans ce même modèle, les auteurs ont montré qu'une interaction entre les cellules $CD8^+CD45RC^{low}$ et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) est nécessaire pour la suppression des cellules T $CD4^+$ (X. L. Li *et al.*, 2010).

Une nouvelle sous-population régulatrice, les lymphocytes $CD8^+CD122^+$, a été identifiée chez la souris. L'expression de CD28 sur les $CD8^+CD122^+$, permet de les distinguer des $CD8^+CD28^-$. Leur fonction suppressive a été mise en évidence dans un modèle d'hyperimmunité sévère chez des souris invalidées pour CD122. Elles possèdent des propriétés suppressives en culture et leur absence *in vivo* entraîne un désordre hyperprolifératif (Rifa'i *et al.*, 2004). En effet, elles sont capables d'inhiber les cellules T

CD4⁺ et CD8⁺ *in vitro* et *in vivo*. Récemment, leur rôle a également été mis en évidence dans un modèle de colite (Endharti *et al.*, 2011) et d'EAE (Y.-H. Lee *et al.*, 2008) chez la souris. Enfin, une nouvelle étude a identifié deux sous-populations de cellules CD8⁺CD122⁺ différenciées par l'expression ou non de la molécule PD-1 (H. Dai *et al.*, 2010). Ainsi, la suppression de la réponse des cellules T *in vitro* et *in vivo* (dans un modèle de greffe de peau chez la souris) est due aux cellules CD8⁺CD122⁺PD-1⁺, et non pas à leurs homologues PD-1⁻ ayant plutôt un phénotype de cellules mémoires. La suppression par ces cellules est principalement dépendante de leur production en IL-10. Par ailleurs, le signal de costimulation par les deux molécules de CD28 et PD-1 est nécessaire pour une sécrétion optimale d'IL-10 (H. Dai *et al.*, 2010).

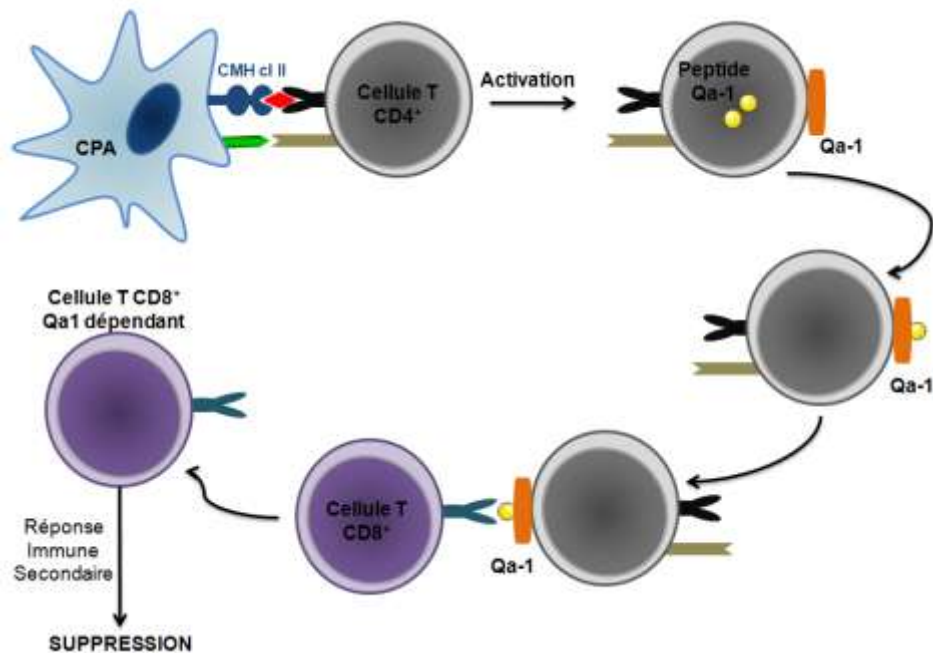


Figure 5 : Mécanismes suppresseurs des cellules T CD8⁺ restreintes au Qa-1. D'après (Chess & H. Jiang, 2004).

II-1.3 Les cellules T CD4⁺CD25⁻ régulatrices

Tout comme les cellules CD4⁺CD25⁺, les cellules CD4⁺CD25⁻ peuvent également avoir des fonctions régulatrices. Cependant, leur pouvoir de suppression est 10 fois plus faible (Graca *et al.*, 2002). Les propriétés suppressives de ces cellules ont par ailleurs été mises en évidence dans plusieurs modèles de maladies autoimmunes (L. A. Stephens & D. Mason, 2000; Furtado *et al.*, 2001; Curotto de Lafaille *et al.*, 2001). Le transfert de cellules T CD4⁺CD25⁻,

issues de cellules déficientes pour le gène de l'IL-2, protège les souris naïves receveuses de l'EAE (Furtado *et al.*, 2002). Ainsi, ces cellules sont capables d'exercer leur pouvoir suppresseur en absence d'IL-2 (Furtado *et al.*, 2002). De même, le transfert de ces cellules empêche le rejet de greffe de peau chez la souris (Graca *et al.*, 2002). Enfin, les cellules T CD4⁺CD25⁻ provenant de rats tolérant une allogreffe cardiaque suite à une DST sont capables de transférer la tolérance à une nouvelle allogreffe (Degauque *et al.*, 2007). Cependant, il a été montré *in vivo* que les cellules T CD4⁺CD25⁻ peuvent être converties en cellules T CD4⁺CD25⁺ avec les mêmes propriétés régulatrices et fonctionnelles, suggérant ainsi que leur activité régulatrice peut être due à leur conversion en cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices (Curotto de Lafaille *et al.*, 2004).

II-1.4 Les cellules régulatrices double négatives CD3⁺CD4⁻CD8⁻

Les cellules T régulatrices double négatives (DN Treg) de phénotype TCRαβ⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻NK1.1⁻ représentent 1 à 3 % des lymphocytes périphériques chez l'homme et chez la souris (Z. X. Zhang *et al.*, 2000; K. Fischer *et al.*, 2005). Elles sont capables d'inhiber et de supprimer les réponses immunes auto-, allo- et xénogéniques des cellules T CD8⁺ (Z. X. Zhang *et al.*, 2000; Ford *et al.*, 2007; W. Chen, Ford, K. J. Young, Cybulsky, *et al.*, 2003) et des cellules T CD4⁺ (W. Chen, Ford, K. J. Young, Cybulsky, *et al.*, 2003; Voelkl *et al.*, 2011; D. Zhang *et al.*, 2007; W. Chen, D. Zhou, *et al.*, 2005) de façon dose dépendante, mais également la réponse des lymphocytes B (Hillhouse *et al.*, 2010; Z.-X. Zhang, Y. Ma, *et al.*, 2006). Les DN Treg sécrètent, suite à leur activation, de grandes quantités d'IFN-γ et de TNF-α, mais pas d'IL-2, d'IL-4 ou d'IL-10 (Z. X. Zhang *et al.*, 2000). Cependant, leur stimulation et leur expansion nécessitent de nombreuses cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-15 (W. Chen *et al.*, 2004). Par ailleurs, les DN Treg génèrent une inhibition spécifique de l'antigène suite à l'expression des complexes CMH/peptide à la surface des CPA (Z. X. Zhang *et al.*, 2000) et lysent ainsi les cellules T CD8⁺ ou CD4⁺ via l'interaction Fas/FasL alors qu'elles sont, elles-mêmes, résistantes à l'induction de l'apoptose (Q. Khan *et al.*, 1999; Marra *et al.*, 2004). Des études récentes ont également montré que les DN Treg peuvent tuer des cellules B autologues via la voie perforine/granzyme (Z.-X. Zhang, Y. Ma, *et al.*, 2006). Enfin, le groupe de Zhang a récemment décrit un nouveau mécanisme de régulation associé à ces cellules. En effet, une forte expression de CTLA-4 est retrouvée sur les DN Treg et leur permet ainsi d'inhiber l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 par les DC matures (J. F. Gao *et al.*, s. d.). *In vivo*, les DN Treg contribuent à la prévention du rejet de greffe (Z. X.

Zhang *et al.*, 2000; D. Zhang *et al.*, 2007) et de la GVHD (K. J. Young *et al.*, 2003) dans de nombreux modèles animaux. En transplantation, les DN Treg prolongent la survie d'allogreffe de peau (Z. X. Zhang *et al.*, 2000) et de cœur (W. Chen, Ford, K. J. Young & L. Zhang, 2003). Dans un modèle de xéno greffe cardiaque du rat chez la souris, la réponse anti-donneur de cellules T xénoréactives est contrôlée par une augmentation de cellules DN Treg et par une réduction de la stimulation antigénique par les DC au sein de la greffe (W. Chen *et al.*, 2007). Une corrélation entre la fonction et la localisation de cellules DN Treg a été établie. Ainsi leur activité suppressive apparaît plus importante au sein du greffon que dans la rate suggérant que l'environnement local de la greffe potentialise les fonctions régulatrices de cette population (W. Chen *et al.*, 2004).

II-1.5 Les cellules T régulatrices $\gamma\delta$

Les cellules T $\gamma\delta$ sont majoritairement des cellules $CD4^-CD8^-$ (Guidos, 2006), mais des cellules T $\gamma\delta$ $CD4^+$ ou T $\gamma\delta$ $CD8^+$ ont cependant été caractérisées (P. Lusso *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 1996). Contrairement aux cellules T $\alpha\beta$ (Schild *et al.*, 1994), les cellules T $\gamma\delta$ reconnaissent directement les antigènes sur les CPA sans qu'ils soient apprêtés et présentés par les molécules du CMH (Brenner *et al.*, 1986; S. Shin *et al.*, 2005). Par ailleurs, différentes études ont permis d'analyser leurs propriétés régulatrices (**Figure 6**). En effet, l'utilisation de souris déficientes en cellules T $\gamma\delta$ a établi leur rôle dans la défense contre les infections, les cancers ou le développement de la GVHD via la lyse des cellules infectées ou la régulation des fonctions des cellules T $\alpha\beta$ (Mombaerts *et al.*, 1993; Raulet, 1994; Maeda *et al.*, 2005). Elles exercent leur activité régulatrice en sécrétant des chemokines ou des cytokines tels que l'IL-10 et le TGF- β qui suppriment les fonctions effectrices des cellules T $\alpha\beta$ ou des cellules Th1. Par ailleurs, elles semblent générer une suppression par l'intermédiaire de signaux TLR (*Toll Like Receptor*) (G. Peng *et al.*, 2007) et expriment de fort taux de FasL permettant d'induire la cytolysse des cellules exprimant le récepteur Fas. En transplantation, les cellules T $\gamma\delta$ jouent un rôle important dans la tolérance à l'allogreffe. Ainsi, une étude a démontré la contribution de ces cellules dans la génération de l'ACAID (*Anterior Chamber-Associated Immune Deviation*) et dans la survie d'une greffe cornéenne (H. M. Ashour & Niederkorn, 2006).

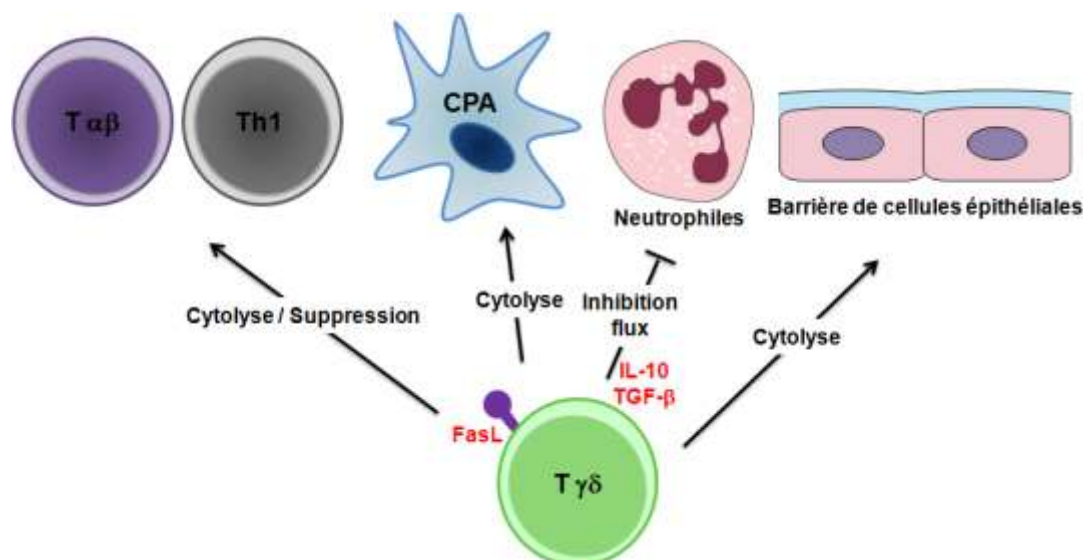


Figure 6 : Mécanismes suppresseurs des cellules T $\gamma\delta$.
D'après (Hayday & Tigelaar, 2003).

II-1.6 Les cellules NKT

Les cellules NKT (*Natural Killer T*) expriment à la fois des récepteurs de cellules NK comme le CD161 (NK1.1) et un TCR semi-invariant, composé d'une chaîne α invariante (V α 14-J α 28 chez la souris, V α 24-J α 18 (J α Q) chez l'homme) et d'une chaîne β peu variable (Kronenberg, 2005). Chez l'homme, la plupart des cellules NKT expriment V α 24-J α 18 avec V β 11 (Kronenberg, 2005). Les cellules NKT ont donc un répertoire TCR restreint, c'est pourquoi elles sont souvent appelées les cellules NKT invariantes. Les cellules NKT reconnaissent les antigènes glycolipidiques tels que le α -galactosyl-ceramide (α -GalCer) ou les glycosphingolipides bactériens présentés par la molécule du CMH de classe I non classique CD1d (La Cava *et al.*, 2006). Leur action est dépendante de l'IFN- γ et de l'engagement de chemokines avec leur récepteur comme CXCR6/CXCL6 (X. Jiang, T. Shimaoka, *et al.*, 2005). Par la sécrétion de cytokines de type Th2 ou pro-inflammatoires, les cellules NKT sont responsables de la régulation d'une large variété de maladies autoimmunes et de cancers (Kronenberg, 2005). Les cellules NKT activées semblent par ailleurs moduler, quantitativement et qualitativement, la fonction des Treg CD4⁺CD25⁺ via des mécanismes dépendants de l'IL-2, tandis que les Treg peuvent supprimer leur prolifération, leur sécrétion de cytokines et leur activité cytotoxique via des mécanismes contact-dépendants (La Cava *et al.*, 2006). En transplantation, les cellules NKT, tout comme les Treg CD4⁺CD25⁺, préviennent le développement de la GVHD suite à la greffe de moelle osseuse allogénique

(Kohrt *et al.*, 2010). Elles sont également responsables de la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris suite au blocage des voies de costimulation LFA-1/ICAM ou CD28/CD80-86 (K. I. Seino *et al.*, 2001). En effet, le blocage de la costimulation permet la production d'IFN- γ par les cellules NKT, contribuant partiellement à l'induction de la tolérance. De plus, l'activation spécifique des cellules NKT restreinte au CD1d permet la production de TGF- β responsable du développement de Treg (K. I. Seino *et al.*, 2001). Les cellules NKT semblent aussi être impliquées dans l'acceptation d'une allogreffe de foie (Kiyomoto *et al.*, 2005), de peau (K. Oh *et al.*, 2005) ou de cornée (Sonoda *et al.*, 2002). Cependant, les cellules NKT provoquent le rejet de greffe dans un modèle d'allogreffe d'îlot (Yasunami *et al.*, 2005; Toyofuku *et al.*, 2006). Il a aussi été montré que la réponse immune, induite par les cellules T effectrices et responsable du rejet de greffe de peau, est médiée par la production d'IFN- γ , et non d'IL-17, par les cellules NKT (Matarollo *et al.*, 2010). Enfin, récemment les cellules NKT ont été associées au rejet aigu dans une modèle orthotopique de transplantation de foie chez le rat. Ainsi, dans ce modèle, l'IL-23 induit leur production d'IL-17 (X. C. Liu *et al.*, 2011).

II-1.7 Les cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ régulatrices

II-1.7.1 Identification et caractérisation

Au début des années 70, le concept de lymphocytes T régulateurs, capables d'inhiber une réponse immunitaire, est apparu. Le groupe de Gershon et Kondo a, en effet, montré que certains lymphocytes T, qu'il nomme lymphocytes T suppresseurs, pouvaient diminuer l'intensité de la réponse immune (Gershon & Kondo, 1970). Dès 1969, Nishizuka et coll. montrent que la thyméctomie néonatale chez la souris induit le développement de manifestations autoimmunes spécifiques d'organes qui peuvent être prévenues par le transfert de cellules spléniques de souris normales adultes (Nishizuka & Sakakura, 1969). Cependant, l'incapacité à identifier un marqueur de surface pour ces cellules ou des médiateurs solubles associés à leur fonction a conduit à l'essoufflement des recherches dans ce domaine. Ce n'est qu'en 1982 puis en 1985 que Sakaguchi et coll. ont amené de nouvelles évidences dans la caractérisation des lymphocytes T suppresseurs en montrant que les cellules responsables pouvaient être restreintes au marqueur CD5^{high} (ou Lyt-1^{high}) (S. Sakaguchi, T. Takahashi & Nishizuka, 1982a; S. Sakaguchi, T. Takahashi & Nishizuka, 1982b; S. Sakaguchi *et al.*, 1985). Dans la continuité de ces travaux, Sakaguchi et ses collaborateurs ont donné un regain d'intérêt au concept des Treg dans le milieu des années 1990. En effet, ils ont décrit pour la

première fois le phénotype d'une population de cellules T CD4⁺ suppressives, définies par l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), cruciales pour le contrôle des cellules T *in vivo* (S. Sakaguchi *et al.*, 1995; Asano *et al.*, 1996). Ce travail est confirmé par celui d'une autre équipe qui met en évidence le rôle de cette population régulatrice dans la prévention de l'autoimmunité (Suri-Payer *et al.*, 1998) et démontre l'activité régulatrice de ces cellules *in vitro* de façon reproductible (Thornton & Shevach, 1998). Depuis, de nombreux autres marqueurs de surface ont été proposés pour mieux définir les Treg tels que GITR (*Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related protein*) (J. Shimizu *et al.*, 2002), CTLA-4 (T. Takahashi *et al.*, 2000), CD62L (Szanya *et al.*, 2002), CD103 ($\alpha\beta$ *Integrin*) (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2002), LAG-3 (CD223) (C.-T. Huang *et al.*, 2004) ou Nrp1 (*Neuropilin*) (Bruder *et al.*, 2004). Mais l'expression de ces marqueurs n'est pas spécifique et est également modifiée après activation rendant alors impossible la distinction entre les Treg et les lymphocytes T conventionnels. Récemment, il a été montré que l'utilisation de CD127 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-7) couplé au marqueur CD25 (CD127^{low}CD25^{high}) permet une meilleure discrimination des cellules régulatrices par rapport aux cellules activées (W. Liu *et al.*, 2006; Codarri *et al.*, 2007). Un autre grand pas a été franchi dans l'identification des Treg avec la découverte du facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box P3*) (Khattari *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003). Foxp3, un nouveau membre de la famille des régulateurs transcriptionnels forkhead/winged helix, a été identifié comme un facteur de transcription majeur pour le contrôle du développement et de la fonction des Treg. En effet, l'expression ectopique de Foxp3 dans des cellules CD4⁺CD25⁻ leur confère un phénotype et une activité de cellules suppressives (Hori *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003). Les souches de souris Scurfy, qui possèdent une mutation invalidant le gène Foxp3 conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée, présentent un désordre lymphoprolifératif (Brunkow *et al.*, 2001). Par ailleurs chez l'homme, les individus exprimant une protéine Foxp3 mutée développent un syndrome IPEX (*Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X linked*) lié à une immunodéficience associée à des maladies autoimmunes (Bacchetta *et al.*, 2006). La localisation intracellulaire de Foxp3 reste aujourd'hui un des marqueurs les plus fiables pour identifier les Treg, même si chez l'homme, son expression peut augmenter de façon transitoire dans les lymphocytes T activés sans pour autant leur conférer des fonctions régulatrices (Morgan *et al.*, 2005). La relation entre l'expression de Foxp3 par les lymphocytes T activés et la mise en place des fonctions suppressives reste donc un sujet de débat. Walker et coll. montrent que l'expression de Foxp3 par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ activés est suffisante pour les convertir en cellules

régulatrices (M. R. Walker *et al.*, 2005). Or, Gavin et coll. montrent au contraire que la population Foxp3 induite n'est ni anergique, ni suppressive *in vitro* et que l'expression de Foxp3 est transitoire (M. A. Gavin *et al.*, 2006). Cette expression décline dans le temps lors de cultures prolongées.

II-1.7.2 Origine, développement et homéostasie des Treg

L'origine thymique des Treg naturels est démontrée d'une part grâce aux expériences de Sakaguchi qui observe l'absence de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ en périphérie chez des souris ayant subi une thymectomie à l'âge de 3 jours malgré un développement normal des autres lymphocytes T (Papiernik & Banz, 2001; S. Sakaguchi *et al.*, 1995), et d'autre part par Papiernik et ses collaborateurs (Papiernik *et al.*, 1998). Ces Treg générés au niveau du thymus sont qualifiés de lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) et composent 5 à 10 % du répertoire des lymphocytes T CD4⁺ (M. Itoh *et al.*, 1999). Dans le thymus, une partie des lymphocytes T CD4⁺ est sélectionnée par la reconnaissance de haute affinité pour les antigènes du soi (C.-S. Hsieh *et al.*, 2004). En plus d'une interaction TCR/ligand forte, il semble que le développement des Treg soit dépendant des molécules de costimulation exprimées à la surface des cellules épithéliales de l'environnement thymique. En effet, les souris invalidées pour CD28 ne présentent qu'une population très réduite de Treg dans le thymus et la périphérie (Salomon *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2003). Le groupe de Singer a identifié le domaine de liaison de Lck comme la clef de la fonction de CD28 dans la différenciation qui permet aux thymocytes double-positifs de devenir des lymphocytes T CD4⁺Foxp3⁺ (Tai *et al.*, 2005). De plus, il a été très récemment montré que l'expression de CD40 par les cellules épithéliales thymiques et les DC influencerait quantitativement la génération des Treg (Spence & E. A. Green, 2008). Une fois en périphérie, les Treg migrent, via la circulation sanguine, dans les organes lymphoïdes secondaires. L'homéostasie et la survie des Treg sont principalement assurées par la présence d'IL-2. En effet, une approche utilisant des souris Foxp3-GFP possédant une déficience soit en IL-2, soit en CD25 (IL-2R α -/-) a permis de montrer que l'IL-2 n'est pas impliquée à proprement dit dans le développement intra-thymique des Treg (Fontenot, Rasmussen, M. A. Gavin, *et al.*, 2005), mais que cette cytokine est indispensable *in vivo* pour le maintien et l'homéostasie périphérique des Treg. Cependant, l'homéostasie des Treg n'est pas uniquement dépendante de l'IL-2. D'autres cytokines participent à la modulation du compartiment régulateur. C'est notamment le cas de l'IFN- γ qui agit de manière provisoire (Sawitzki *et al.*, 2005). Par

ailleurs, la cytokine clef impliquée dans le maintien en périphérie et la mise en place des fonctions effectrices des Treg est le TGF- β (Marie *et al.*, 2005; Y. Liu *et al.*, 2008).

En plus de la génération thymique des Treg, des phénomènes similaires, mais aux mécanismes différents, se produisent en périphérie et sont à la base des vieux concepts de tolérance infectieuse (Gershon & Kondo, 1970). Ainsi, des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ naïfs peuvent être convertis en Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ après stimulation par un antigène du non-soi. Ainsi, ces Treg induits (iTreg) se différencient des nTreg par leur répertoire, les nTreg ayant un TCR autoréactif. Les mécanismes à la base de cette conversion sont nombreux (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009). Le plus décrit et étudié est celui obtenu chez la souris, *in vitro* et *in vivo*, suite à une stimulation antigénique en présence d'IL-2 et surtout de TGF- β (W. Chen, W. Jin, *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans tous les modèles de génération d'iTreg, la costimulation, en particulier CD86 et CD28, s'avère néfaste et empêche l'induction de Foxp3 dans ces cellules (Kretschmer *et al.*, 2005). Ainsi, des CPA CD80-86 KO (*Knock-Out*) induisent plus d'iTreg et une stimulation de CD28 par un anticorps immobilisé inhibe leur génération de façon dose-dépendante (Benson *et al.*, 2007). Il semblerait donc que l'environnement et les conditions de la présentation de l'antigène influent sur l'induction de Treg.

II-1.7.3 Mécanismes de suppression

Une fois le marqueur CD25 associé aux Treg, l'objectif de nombreuses équipes a été de découvrir par quel mécanisme passent leurs propriétés immunosuppressives. Cependant, ce n'est pas un mais plusieurs mécanismes qui ont rapidement été mis à jour. De plus, les mécanismes moléculaires précis par lesquels les cellules régulatrices inhibent l'activation et la prolifération d'autres cellules sont très controversés. À l'heure actuelle, plusieurs mécanismes de suppression ont été décrits : suppression par l'intermédiaire des cytokines, par interaction entre les cellules régulatrices et les cellules effectrices ou les CPA, et enfin la lyse des cellules effectrices par les Treg (**Figure 7**) (D. A. A. Vignali *et al.*, 2008). Par cette diversité de mécanismes, les Treg sont ainsi capables d'inhiber une quantité de réponses cellulaires. Ils inhibent la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, la prolifération, la production d'anticorps et la permutation de classe des lymphocytes B, la cytotoxicité des cellules NK et NKT, la maturation et la fonctionnalité des DC ainsi que la fonction et la survie des neutrophiles, des ostéoblastes et des mastocytes (Shevach, 2009; Rouse, 2007).

In vitro, il semblerait que l'activité suppressive des Treg nécessite un contact direct entre le Treg et la cellule répondeuse par l'intermédiaire de la CPA (S. Sakaguchi, 2004; Thornton & Shevach, 1998). En effet, les Treg n'exercent pas d'activité suppressive lorsqu'ils sont séparés des lymphocytes T répondeurs par une membrane semi-perméable ; de plus, le surnageant de Treg activés n'inhibe pas la prolifération des lymphocytes T répondeurs (S. Sakaguchi, 2004). L'action suppressive des Treg nécessite donc un contact *in vitro*. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'identité de molécules impliquées et certaines études sur ce sujet sont contradictoires.

Il semblerait que le GITR joue un rôle dans l'activité suppressive des Treg. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-GITR *in vitro* inhibe l'activité suppressive de ces cellules tout en préservant leur état anergique. Néanmoins, il a été montré que le GITR exerce un effet stimulant sur les CD4⁺CD25⁻, ce qui les rend résistant à l'activité suppressive des Treg (W. Chen, 2006; G. L. Stephens *et al.*, 2004; M. Tone *et al.*, 2003). Le GITR a donc une action inverse selon le type de cellules (régulatrice ou effectrice) activé par cette voie.

Le CTLA-4 pourrait également intervenir dans l'activité suppressive des Treg. *In vitro*, comme pour le GITR, l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA-4 abolit l'activité régulatrice des Treg. De plus, l'injection d'un anticorps anti-CTLA-4 à des souris engendre l'apparition de maladies autoimmunes sans réduire le nombre de Treg chez ces animaux (S. Sakaguchi, 2004). Le CTLA-4 des Treg est également nécessaire à la suppression dans le contact direct des Treg avec les lymphocytes T effecteurs qui expriment CD80/86 après activation (Greenwald *et al.*, 2005). Ainsi, des cellules CD4⁺CD25⁻ de souris CD80/86 KO sont résistantes à la suppression par les nTreg (Paust *et al.*, 2004).

Cependant, la réelle démonstration du rôle de CTLA-4 dans la fonction suppressive des Treg est, elle, très récente. Wing et coll. ont généré des souris déficientes pour CTLA-4 uniquement dans les cellules exprimant Foxp3 (KO conditionnel), les Treg chez la souris (Wing *et al.*, 2008). Ces souris développent rapidement un sévère désordre autoimmun en périphérie, similaire à celui des souris CTLA-4 KO, démontrant que la déficience de CTLA-4 dans les Treg uniquement est suffisante pour causer la pathologie autoimmune et que le maintien de l'expression sur les lymphocytes T effecteurs activés est insuffisant pour la prévenir.

Les mécanismes de suppressions dépendant de CTLA-4 sont divers. Ainsi Fallarino et coll. ont démontré que, à la manière de CTLA4-Ig, les Treg peuvent induire une expression d'IDO (*Indoleamine 2,3-Dioxygenase*) dans les CPA de façon CTLA-4 dépendante et ainsi générer des CPA tolérogéniques (Fallarino *et al.*, 2003), favorisant la génération d'iTreg et inhibant

l'activation des autres lymphocytes T par la privation du tryptophane. Les Treg peuvent également induire une sous-expression des molécules CD80-86 sur les CPA par un mécanisme CTLA-4-dépendant (Onishi *et al.*, 2008; Wing *et al.*, 2008), conduisant à la génération de CPA moins stimulatrices pour les lymphocytes T et favorisant l'induction de Treg en périphérie (condition sous-optimales de costimulation). De même, les Treg sont capables d'induire une « trans-endocytose » des molécules CD80-86 par une fonction extrinsèque de CTLA-4 induisant également une diminution de l'expression des molécules CD80-86 par les CPA (Qureshi *et al.*, 2011).

Les Treg peuvent sécréter des cytokines suppressives (IL-10, IL-35 et TGF- β) qui peuvent inhiber les fonctions des cellules T répondeuses (McGeachy *et al.*, 2005; Collison *et al.*, 2007; R. Li *et al.*, 2007). Le rôle essentiel de l'IL-10 dans l'activité suppressive des Treg a été mis en évidence *in vivo* dans des modèles murins d'inflammation du tube digestif, de transplantation, d'autoimmunité et d'infection parasitaire chronique (S. Sakaguchi, 2004). Les premières cibles de l'IL-10 sont les cellules myéloïdes dont elle restreint l'expression des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des molécules de CMH de classe II et de costimulation (K. W. Moore *et al.*, 2001). Une partie de l'effet de l'IL-10 pourrait également découler de l'induction de lymphocytes Tr1 ou de DC tolérogènes, cellules qui amplifieraient la suppression en produisant elles-mêmes cette cytokine (Kryczek *et al.*, 2006; M. G. Roncarolo *et al.*, 2006). Toutefois par opposition à ses propriétés immunosuppressives, l'IL-10 a un effet stimulateur sur la prolifération et la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ (Groux *et al.*, 1998).

L'autre cytokine immunosuppressive majeure est le TGF- β , et, une part importante de l'action des Treg lui est attribuée. Le TGF- β intervient entre autres sur la maturation des DC (Y. Yamaguchi *et al.*, 1997), la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ (Kehrl *et al.*, 1986; Sad & Mosmann, 1994) et des lymphocytes B (Briskin *et al.*, 1988; Petit-Koskas *et al.*, 1988), ou les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺ (M.-L. Chen, Pittet, *et al.*, 2005) et des NK (Ghiringhelli *et al.*, 2005). Une propriété non négligeable est sa participation à la génération *de novo* de Treg à partir de lymphocytes T CD4⁺Foxp3⁻ (W. Chen, W. Jin, *et al.*, 2003; Y. Chen *et al.*, 1994). Ainsi, à la sécrétion de TGF- β par les Treg pourrait venir s'ajouter celle induite par ces dernières chez les DC de manière à créer un microenvironnement tolérogène. Néanmoins, le rôle de TGF- β est controversé. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-TGF- β ne reverse pas la suppression exercée par les Treg (W. Chen, 2006).

Récemment, une nouvelle cytokine inhibitrice, l'IL-35, a été décrite. (Collison *et al.*, 2007). Composée de deux chaînes, IL-12 α et IL-27 β , son expression semble spécifique aux Treg, car IL-27 β est régulée par Foxp3. En son absence, les Treg sont inefficaces à endiguer la prolifération homéostatique de lymphocytes T transférés dans un animal immunodéficient et échouent à protéger du développement de la colite. Par ailleurs, elle est la seule cytokine dont le défaut a une influence sur leur capacité à inhiber la prolifération des cellules CD4⁺ *in vitro*. Les Treg peuvent aussi médier leur effet suppresseur en entraînant des perturbations dans le métabolisme des lymphocytes T effecteurs. Par exemple, la privation d'IL-2, fortement consommée par les Treg, jouerait aussi un rôle dans les mécanismes de suppression en induisant l'apoptose des cellules effectrices (Pandiyani *et al.*, 2007). Cette diminution d'expression pourrait être due, au moins en partie, à la consommation compétitive de la cytokine par les Treg qui expriment le récepteur à un fort niveau (de la Rosa *et al.*, 2004). Les Treg peuvent aussi inhiber l'activation des lymphocytes T *in vitro* en inhibant la production d'IL-2 (Thornton & Shevach, 1998), cytokine essentielle à la survie des lymphocytes T après activation. Il faut cependant noter que les lymphocytes déficients pour CD25 restent sensibles à l'activité suppressive des Treg (Fontenot, Rasmussen, M. A. Gavin, *et al.*, 2005).

Les Treg sont aussi capables d'induire l'apoptose des cellules cibles par des mécanismes cytolytiques. Ces mécanismes nécessitent que les cellules régulatrices soient activées. Selon le mode de stimulation, les Treg CD4⁺CD25⁺ expriment les protéines granzyme A ou granzyme B et lysent les cibles autologues, de façon dépendante ou non de la perforine (Grossman *et al.*, 2004). Plus récemment, deux autres molécules ont été décrites comme jouant un rôle dans la cytotoxicité médiée par les Treg, la galectine-1 et TRAIL/DR5 (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand / Death Receptor 5*) (Garín *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2007). Ainsi, la galectine-1 est capable d'induire un arrêt du cycle et une apoptose des lymphocytes T effecteurs (Garín *et al.*, 2007) et la survie prolongée des greffes de peau allogénique induite par les Treg est inhibée par des anticorps anti-DR5 bloquants (Ren *et al.*, 2007). Enfin, Boissonnas *et coll.* ont mis en évidence que des cellules T Foxp3⁺, les Treg chez la souris, semblent limiter la réponse de cellules T CD8⁺ en induisant la mort cellulaire des DC par un mécanisme perforine dépendant au niveau des tumeurs de ganglions lymphatiques (Boissonnas *et al.*, 2010).

Cependant, l'action des Treg ne s'arrête pas à ces quelques mécanismes. En effet, LAG-3 (CD223), un homologue de CD4 qui se lie avec une forte affinité au CMH de classe II, est notamment exprimé par les lymphocytes T après activation ou par les Treg. En se liant au CMH de classe II des CPA immatures, il induit un signal inhibiteur dans la CPA qui inhibe sa

maturation et ses capacités de stimulation (B. Liang, C. Workman, *et al.*, 2008). Un autre mécanisme, met en jeu l'ATP (*Adénosine Triphosphate*) extracellulaire. En effet, l'ATP extracellulaire est un indicateur pour le système immunitaire de la destruction d'un organe et exerce des effets inflammatoires sur les DC. Les Treg qui expriment CD39 (comme les lymphocytes B ou les DC) sont ainsi capables de réduire cet ATP extracellulaire en AMP (*Adénosine Monophosphate*), représentant alors un autre mécanisme anti-inflammatoire utilisé par ces cellules régulatrices (Borsellino *et al.*, 2007).

D'autres molécules peu connues sont également à la base de mécanisme de suppression. C'est, par exemple, le cas de la neuropiline-1 (Nrp-1) qui est principalement exprimée par les cellules Foxp3⁺ (Sarris *et al.*, 2008) et qui favorise des interactions prolongées avec les CPA immatures. Ainsi, les Treg, en restant en contact prolongé avec les CPA, empêchent l'accès aux lymphocytes T effecteurs qui ne peuvent donc pas s'activer (Shevach, 2009). De récentes études montrent que les Treg peuvent également moduler le microenvironnement redox extracellulaire, conduisant à la suppression de l'activation et de la prolifération des cellules T (Z. Yan & R. Banerjee, 2010; Z. Yan *et al.*, 2010). Les Treg utilisent de multiples stratégies pour le remodelage d'oxydoréduction extracellulaire, comme la réduction de la synthèse du glutathion dans les DC, via une diminution de l'expression de la γ -glutamylcystéine synthétase, l'enzyme limitante pour la synthèse du glutathion (Z. Yan *et al.*, 2010). Enfin, Navarrete et coll. ont montré que les Treg sont capables de modifier l'expression des récepteurs d'endocytose et le processus d'endocytose chez les DC humaines (Navarrete *et al.*, 2011). En effet, les Treg diminueraient l'expression et l'apprêtement des antigènes via les récepteurs C-type lectin-like, CD206 et DC-SIGN, limiteraient le processus de pinocytose par les DC et augmenteraient l'expression de Fc γ RIIB, un récepteur Fc γ inhibiteur de l'activation des DC (Navarrete *et al.*, 2011).

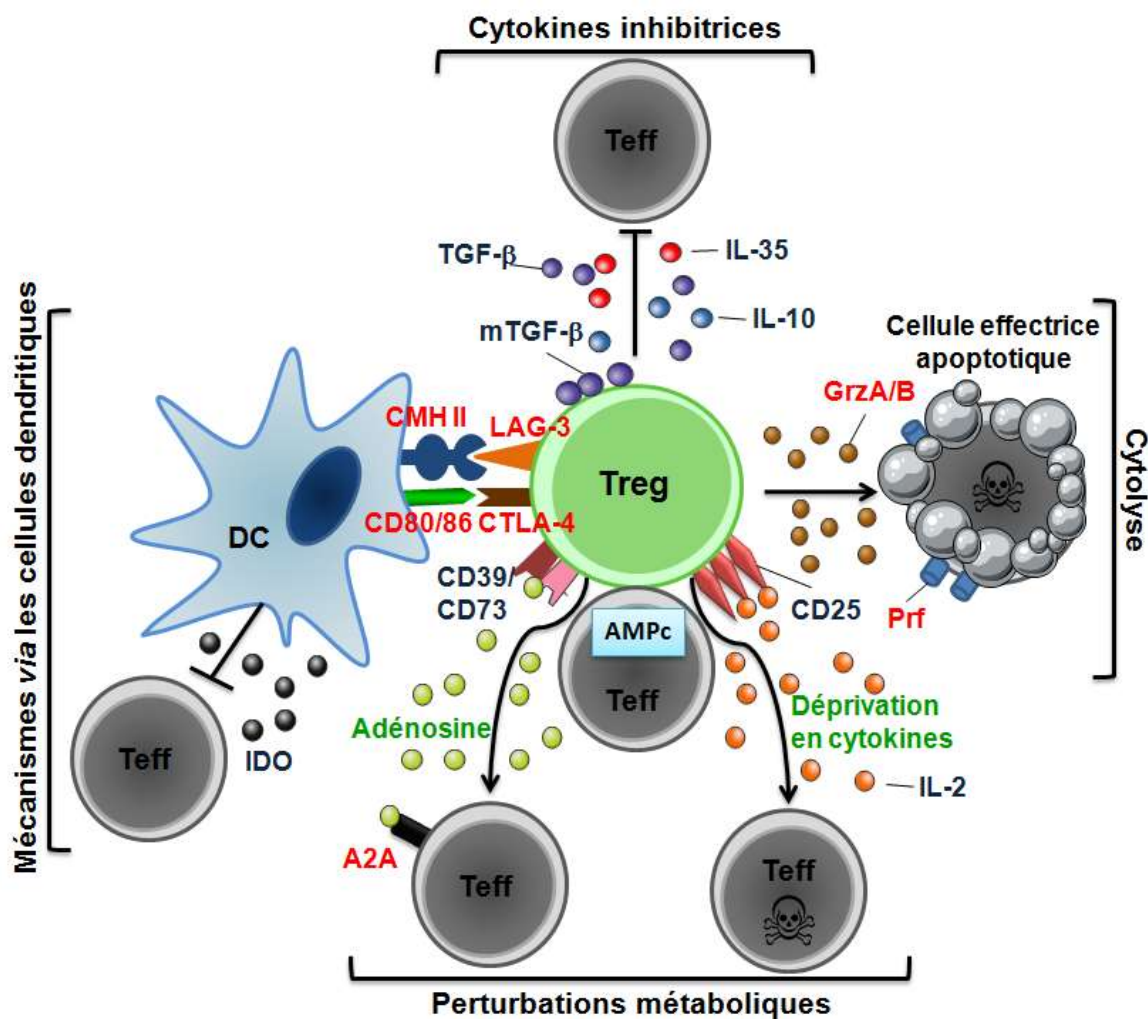


Figure 7 : Les principaux mécanismes suppresseurs des lymphocytes T régulateurs (Treg).

D'après (D. A. A. Vignali *et al.*, 2008).

mTGF-β: TGF-β membranaire ; *GrzA/B* : granzyme A et B ; *Prf* : perforine ; *Teff* : lymphocyte T effecteur.

II-1.7.4 Treg et transplantation

Rôle des Treg en transplantation

Comme dans l'autoimmunité, l'équilibre entre les cellules effectrices et les Treg dicte l'équilibre entre le rejet et la tolérance en transplantation (X. X. Zheng *et al.*, 2003). Le rôle des Treg en transplantation dans les modèles rongeurs a largement été étudié et démontré depuis les premiers travaux sur la tolérance infectieuse (Gershon & Kondo, 1971). Nombreux sont les modèles de tolérance où les Treg sont important aussi bien dans l'induction que le maintien de la tolérance (Akl *et al.*, 2005; Karim *et al.*, 2002; Sánchez-Fueyo *et al.*, 2002; P. A. Taylor *et al.*, 2001; K. J. Wood & S. Sakaguchi, 2003). En effet, la déplétion de cette

population induit rapidement un rejet ou prévient l'induction de tolérance (S. Sakaguchi *et al.*, 2001). De plus, récemment Joffre et coll. ont montré que les Treg et la voie de présentation directe de l'antigène préviennent en effet le rejet aigu. Elles sont également capables par les voies de présentation directe et indirecte de prévenir le développement du rejet chronique (Joffre *et al.*, 2008). En pratique clinique, le débat est toujours ouvert, même si de plus en plus d'études montrent un rôle de ces cellules soit dans la tolérance, soit dans la dysfonction chronique du greffon. L'importance des Treg en transplantation humaine est mieux mise en évidence par les études portant sur les profils immunitaires des patients opérationnellement tolérants qui ont une bonne fonction en dépit de ne plus être sous immunosuppression. Un nombre élevé de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ est retrouvé dans le sang périphérique de ces patients et leur présence peut aider à prédire la tolérance pendant le sevrage à l'immunosuppression (S. Louis *et al.*, 2006; Martínez-Llordella *et al.*, 2007; Pons *et al.*, 2008).

Même parmi les patients sous traitement immunosuppresseur, la différence entre la stabilité et le rejet peut être attribué en partie à l'activité des Treg. Le groupe de Sayegh a montré que 40% des transplantés rénaux stables présentaient des signes d'une population de Treg CD4⁺CD25⁺ spécifique de l'antigène, capable de supprimer *ex vivo* la réponse après restimulation par l'alloantigène (Salama *et al.*, 2003). En revanche, cette activité régulatrice est absente chez les patients ayant une dysfonction chronique d'allogreffe (Akl *et al.*, 2008). Certains patients stables, ainsi que certains patients opérationnellement tolérants, ne présentent pas d'augmentation de Treg dans le sang périphérique. En revanche, les Treg se retrouvent et se concentrent principalement l'organe, soutenant ainsi l'hypothèse que le recrutement des Treg dans le greffon peut être d'avantage plus important dans l'induction de la tolérance (Bestard *et al.*, 2007; Y. Li *et al.*, 2008).

Par ailleurs, les travaux d'autres équipes de notre laboratoire sur la signature transcriptionnelle de la tolérance dans le sang ont également mis en évidence que les patients en rejet chronique ont une concentration plasmatique en TGF- β inférieure à celle des patients stables ou tolérants, que 27% des gènes qui permettent de différencier les patients en rejet chronique des tolérants sont régulés par le TGF- β et que les transcripts Foxp3 sont plus importants chez les tolérants en comparaison aux patients en rejet chronique (Brouard *et al.*, 2007).

Impact des immunosuppresseurs actuels sur les Treg

Le dogme qui entoure les traitements immunosuppresseurs actuels est que les agents utilisés dans les traitements d'induction ou de fond sont des inhibiteurs ou des déplétants des cellules « pan-T ». Toutefois, les données émergentes suggèrent que tous ne portent pas préjudices aux Treg. Ainsi, quelques travaux, *in vitro*, ont suggéré que l'effet bénéfique de l'ATG (*Anti-Thymocyte Globulin*) ou de Campath-1H (anti-CD52, alemtuzamab) ne serait pas uniquement lié à la déplétion des populations lymphocytaires mais aussi à l'induction et l'expansion des Treg. Les Treg CD4⁺CD25⁺ sont préférentiellement épargnés par la déplétion. Par ailleurs, ces deux molécules sont en mesure de promouvoir *de novo* la conversion de cellules T CD25⁻ en Treg (Lopez *et al.*, 2006; Minamimura *et al.*, 2006; Noris *et al.*, 2007; X. Feng *et al.*, 2008; Bloom *et al.*, 2008), capables d'inhiber les cellules T alloréactives. En revanche, dans les modèles murins, les CNI inhibent l'expansion et la fonction des Treg, *in vitro* et *in vivo*, probablement parce que la fonction des Treg dépend de l'IL-2, dont la production est calcineurine dépendante (Furtado *et al.*, 2002; W. Gao *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007; H. Wang *et al.*, 2006; Zeiser *et al.*, 2006). Des taux réduits d'IL-2 conduisent à une diminution de l'expression de Foxp3 (Burchill *et al.*, 2007). *In vitro*, l'administration d'IL-2 exogène à la suite d'une exposition des Treg aux CNI renverse ce défaut fonctionnel (Zeiser *et al.*, 2006). En contraste, des données murines et humaines montrent que les inhibiteurs de mTOR inhibent préférentiellement la croissance de lymphocytes T effecteurs, alors qu'ils agrandissent le « pool » de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ via l'induction de leur prolifération, mais également par leur induction *de novo* à partir de cellules T CD4⁺ naïves (W. Gao *et al.*, 2007; Battaglia, Stabilini, Migliavacca, *et al.*, 2006; Baan *et al.*, 2005; S. A. Long & Buckner, 2008; Segundo *et al.*, 2006). Par ailleurs, la rapamycine semble profondément affecter la fonction des CPA par le biais de ses effets sur l'expression des molécules de costimulation. Cette différenciation en CPA tolérogènes induit à son tour une expansion de la population Treg, qui semble conserver sa fonction suppressive (Turnquist *et al.*, 2007). Malheureusement, ce résultat n'a pas vraiment d'impact à ce jour sur la survie des allogreffes. En effet, Ruggenenti et coll. ont montré qu'un traitement d'induction par le Campath-1H suivi de rapamycine induit bien une augmentation des Treg circulants, mais qu'aucun effet bénéfique n'est observé quant à la survie à long terme de l'allogreffe en transplantation rénale (Ruggenenti *et al.*, 2007).

Les anticorps monoclonaux (mAb) anti-CD25 (anti-IL-2R), le basiliximab (Simulect) et le daclizumab (Zenapax), sont utilisés chez les patients transplantés depuis la fin des années 1990. Ces anticorps ne semblent pas induire de déplétion lymphocytaire, mais exercent plutôt

leur action en bloquant la fixation de l'IL-2 sur son récepteur. Des essais randomisés sur leur utilisation à long terme ont montré une réduction de 30% à 40% dans l'incidence de rejet (Kahan *et al.*, 1999; Nashan *et al.*, 1997; Ponticelli *et al.*, 2001). Dans le traitement d'induction, l'efficacité de ces anticorps est comparable à elle de l'ATG chez les patients sans problème d'ordre immunologique (Brennan *et al.*, 2006). Cependant, la découverte que la déplétion des cellules T CD25⁺ chez la souris conduit à l'autoimmunité, et l'observation que des souris CD25 déficientes ne développent pas de Treg, soulève des inquiétudes quant à l'effet néfaste de ces anticorps sur les Treg. En effet, l'interaction IL-2/CD25 est indispensable pour l'activation, l'expansion et le maintien des Treg (Sadlack *et al.*, 1993). Chez les patients traités par des mAb anti-CD25, une profonde déplétion des Treg est observée à court terme. Toutefois, à long terme, le phénotype et la fonction de ces Treg sont similaires aux Treg des patients traités avec un placebo (Z. Wang *et al.*, 2008). Le groupe de Bluestone a également montré que le basiliximab induit transitoirement une diminution des Treg en périphérie chez des patients en transplantation rénale, mais qu'il diminue aussi d'autres lymphocytes T CD25⁻ (Bluestone *et al.*, 2008). Dans cette même étude, ils montrent également que les patients recevant du CTLA4-Ig (belatacept) + basiliximab n'ont pas moins de Treg que les patients recevant du basiliximab et de la CsA. Ainsi, le belatacept ne semble pas plus affecter les Treg qu'un traitement CNI, qui lui est néfaste. A noter tout de même que dans cette étude, ils observent une infiltration Foxp3⁺ plus importante dans le greffon des patients ayant reçu du belatacept en comparaison à ceux sous CsA. Une autre étude de Chavez *et coll.* avait précédemment montré que dans la phase II de belatacept, les patients sous MMF (*mycophenolate mofetil*), stéroïdes et belatacept ont une fréquence de Treg en périphérie similaire aux patients recevant de la CsA, du MMF et des stéroïdes (Chavez *et al.*, 2007). Il semble donc que l'inhibition de la voie de costimulation CD28/CD80-86/CTLA-4, en association avec de l'immunosuppression chronique, ne résulte pas en l'induction ou l'expansion de Treg chez l'homme. Cependant, le belatacept bloque toute la voie de costimulation. Notre équipe a montré que le blocage spécifique de CD28, sans modifier l'interaction CTLA-4/CD80-86, induit une augmentation des Treg en périphérie et dans le greffon dans un modèle d'allogreffe rénale chez le PNH (primate non-humain) (Poirier *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'association d'un anticorps antagoniste monovalent anti-CD28 et d'un CNI prévient le rejet aigu d'allogreffe rénale et le rejet chronique d'allogreffe cardiaque chez le PNH (Poirier *et al.*, 2010). Ainsi, il existe de toute évidence des différences entre les divers régimes immunosuppresseurs en fonction de leur impact sur les Treg.

II-2 Les cellules non-T régulatrices

Outre les cellules T régulatrices qui interviennent dans la tolérance périphérique, de nombreuses cellules non-T régulatrices ont été caractérisées. Aujourd'hui encore de nouvelles cellules régulatrices et de nouveaux mécanismes de suppression sont identifiés. Les cellules non-T régulatrices sont composées entre autres des DC tolérogènes, des DC plasmacytoïdes, des cellules souches mésenchymateuses, des macrophages activés alternatifs, des lymphocytes B régulateurs, des cellules myéloïdes suppressives... Une coopération entre cellules régulatrices T et non-T semble réguler de façon précise les cellules autoréactives et permet ainsi le maintien d'un équilibre dans les réponses du soi et du non-soi. Seront décrites, ci-dessous, la plupart des cellules ayant été identifiées et étudiées en transplantation, notamment les cellules myéloïdes suppressives.

II-2.1 Les cellules dendritiques tolérogènes

Les DC sont essentielles pour le maintien de la tolérance centrale et périphérique. En effet, la déplétion de toutes les sous-populations de DC induit une réaction autoimmune fatale chez la souris (Ohnmacht *et al.*, 2009). Il y a maintenant également de nombreuses preuves du rôle des DC dans l'induction de la tolérance. Pendant longtemps, on a considéré que ce rôle était dévolu aux DC immatures alors que les DC matures généreraient une réponse immune effectrice. Néanmoins, même si des DC immatures sont bien capables de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires, il n'est pas certain que leur rôle soit majeur dans l'induction de Treg au niveau des ganglions lymphatiques. Les DC immatures semblent avoir plus une fonction au niveau local dans les tissus périphériques afin de limiter une inflammation excessive. De ce fait, plusieurs études se sont axées sur le développement de DC « semi-matures » (M. B. Lutz & Schuler, 2002). Il s'agit de cellules exprimant plus ou moins faiblement les marqueurs de surface mais qui sécrètent peu de cytokines inflammatoires. Ainsi, il a été montré que les deux populations de DC, immatures et semi-matures/matures, jouent un rôle dans la tolérance périphérique, ces cellules sont nommées les DC « tolérogènes ». Ainsi, l'équipe de Kurts a été la première à mettre en évidence un rôle des DC immatures dans la tolérance faisant suite au transfert de cellules T CD8⁺ spécifiques du peptide de l'ovalbumine (OVA) dans une souris transgénique OVA (Kurts *et al.*, 1997). De même, des DC murines immatures différenciées *in vitro* puis injectées à une souris prolongent

l'acceptation d'une allogreffe cardiaque (M. B. Lutz *et al.*, 2000; F. Fu *et al.*, 1996; Kurts *et al.*, 1997).

En l'absence d'inflammation, les DC tolérogènes maintiennent la tolérance aux antigènes du soi en périphérie à travers divers mécanismes, comme la suppression des cellules T, l'anergie des cellules T, l'induction de Treg, l'expression de molécules immunomodulatrices, et la production de facteurs immunosuppresseurs (IL-10; TGF- β et IDO) (**Figure 8**).

Les DC tolérogènes peuvent donc produire des cytokines connues pour être anti-inflammatoires et pro-tolérogènes comme l'IL-10 et le TGF- β (Legge *et al.*, 2002; Coombes *et al.*, 2007), et ainsi favoriser l'activation et/ou l'émergence de Treg. En effet, des DC générées *in vitro* puis stimulées par du TNF- α et injectées à de souris augmentent l'expression de Treg CD4⁺IL-10⁺ inhibant l'EAE (M. B. Lutz & Schuler, 2002). De plus, les DC immatures peuvent induire la différenciation de cellules régulatrices de types Tr1 et Th3 suite à la sécrétion d'IL-10 ou de TGF- β (Jonuleit *et al.*, 2000).

Bien qu'aucun marqueur spécifique des DC tolérogènes ne soit décrit, l'expression des molécules ILT3 et ILT4, exprimées essentiellement sur les monocytes, macrophages et DC, a été associée à des DC tolérogènes. Ces DC expriment notamment fortement les molécules ILT3 et ILT4, lorsqu'elles sont mises en contact avec les cellules T régulatrices CD8⁺CD28⁻, et très faiblement les marqueurs de costimulation, conduisant ainsi à une anergie des cellules T (C. C. Chang *et al.*, 2002; Manavalan *et al.*, 2003). Par ailleurs, les molécules ILT ont préférentiellement pour ligand, HLA-G qui est une molécule clé dans la tolérance foeto-maternelle. Récemment, il a été démontré que l'interaction ILT4/HLA-G1 inhibait la maturation des DC humaines et murines, associée à une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II, des molécules de costimulation CD80 et CD86, et, à une prolongation de survie d'allogreffe de peau (Ristich *et al.*, 2007). L'interaction ILT4/HLA-G1 induirait le recrutement des protéines tyrosine phosphatases, SHP-1 et SHP-2, impliquées dans l'activation des voies de signalisation de l'IL-6 et de STAT3 (S. Liang, Ristich, *et al.*, 2008).

L'expression de la molécule IDO a également été associée à certaines DC tolérogènes (Munn *et al.*, 2002; Mellor & Munn, 2004). Il s'agit d'une enzyme clé du catabolisme du tryptophane qui entraîne une déplétion du milieu en tryptophane ainsi que l'arrêt de la prolifération des cellules T car le tryptophane est un acide aminé essentiel à leur prolifération (Munn *et al.*, 2002; Mellor & Munn, 2004). Ces lymphocytes T activés dont leur prolifération est inhibée par IDO sont bloqués en phase G1 du cycle cellulaire et sont plus sensibles à l'apoptose (G. K. Lee *et al.*, 2002). L'expression de cette molécule est induite dans les DC par la PGE2

(*Prostaglandine 2*), l'IFN- γ et CTLA-4 (D. Braun *et al.*, 2005; Grohmann *et al.*, 2002; Mellor & Munn, 2004). Ceci implique que des cellules exprimant CTLA-4 (comme les Treg) peuvent induire l'expression d'IDO sur les DC, qui à leur tour deviennent tolérogènes et peuvent potentialiser l'action des Treg en limitant la prolifération des lymphocytes T effecteurs.

D'autres molécules exprimées par les DC tolérogènes ont par ailleurs été identifiées : SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*), PD-L1 (*Programmed Death Ligand 1*) et DEC-205 (CD205). Bien qu'il apparaisse être un bon marqueur des DC tolérogènes, DEC-205 ne semble pas lui-même être responsable de la transmission d'un signal négatif aux lymphocytes T (Kronin *et al.*, 2000). *In vitro*, alors que la sous-population de DC CD8 α ⁻DEC-205⁻ induit la prolifération des cellules T CD4⁺ ou T CD8⁺ chez la souris, les DC CD8 α ⁺DEC-205⁺ inhibent la réponse cellulaire T par deux mécanismes différents en fonction des T CD4⁺ ou T CD8⁺. En effet, elles inhibent la réponse cellulaire T CD4⁺ en induisant leur apoptose via l'interaction Fas/FasL (Süss & Shortman, 1996), alors qu'elles bloquent celle des T CD8⁺ en limitant la production de cytokines (Kronin *et al.*, 1996).

Un autre mécanisme a été attribué aux DC tolérogènes, ils joueraient un important rôle dans la fonction des cellules B naïves et mémoires, notamment dans leur différenciation, leur activation, leur survie, leur migration, leur prolifération et leur activité effectrice (Wykes & MacPherson, 2000; Dubois *et al.*, 2001; Douagi *et al.*, 2009; Giordani *et al.*, 2009). Toutefois, à ce jour, peu d'éléments ont été apportés concernant la possibilité d'inhibition des cellules B par les DC tolérogènes. Cependant, Obayashi et coll. ont rapporté que certaines DC immatures peuvent inhiber fortement la recombinaison de commutation de classe des IgE (Obayashi *et al.*, 2007). Dans le contexte de la transplantation, Tanriver et coll. ont montré que cibler, *in vivo*, les molécules intactes de CMH de classe I exprimées par les DC au repos inhibe la voie indirecte de l'alloreconnaissance et la génération des alloanticorps de type IgG, conduisant à la survie à long terme de la greffe de peau (Tanriver *et al.*, 2010). Cette dernière étude démontre ainsi que la fonction des DC tolérogènes peut être exploitée pour inhiber la fonction des cellules B et le rôle des alloanticorps dans le rejet. L'utilisation de mAb anti-ICAM-1 (CD54) et du CTLA-4Ig agit en synergie avec les DC immatures du donneur et induit une tolérance donneur-spécifique dans un contexte de transplantation. Cette tolérance est notamment associée à la suppression des IgM et IgG (Q. Wang *et al.*, 2003). Par ailleurs, un traitement local avec la protéine humaine CD83 recombinante, qui interfère dans la maturation des DC, diminue nettement les taux d'anticorps circulants et les dépôts d'IgM et d'IgG dans le greffon, se traduisant par la prévention du rejet chronique dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat (Lan *et al.*, 2010).

Enfin, les travaux d'autres équipes de notre laboratoire ont permis d'identifier de nouveaux mécanismes des DC tolérogènes. En effet, ils ont décrit, pour la première fois, que HO-1 (*Heme Oxygenase-1*) est capable de bloquer la maturation des DC, conduisant à l'inhibition des réponses immunitaires pro-inflammatoires et allogéniques, et en préservant toutefois leur production d'IL-10 (Chauveau *et al.*, 2005). Dans un modèle d'allogreffe de cœur chez le rat, Hill et coll. montrent également pour la première fois que l'injection de DC tolérogènes autologues chez le receveur induit une tolérance à l'allogreffe dépendant de l'IFN- γ et de la molécules EBI3 (*Epstein-Barr virus-Induced gene 3*), appartenant à la famille de l'IL-12 et exprimée par les DC tolérogènes autologues (Hill *et al.*, 2011).

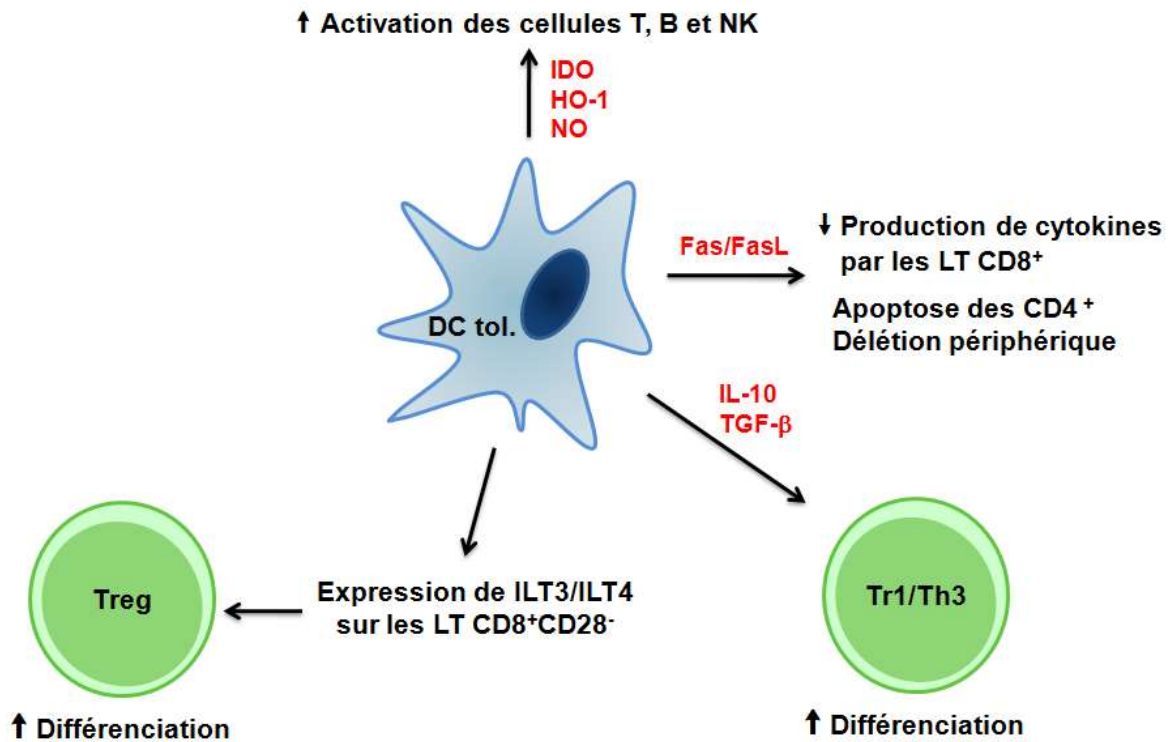


Figure 8: Mécanismes responsables de la tolérance périphérique par les DC (DC tol.). D'après (A.-S. Dugast & Vanhove, 2009).

II-2.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), présentes dans les tissus lymphoïdes (sang périphérique et moelle osseuse majoritairement) (Dzionek *et al.*, 2001) et non lymphoïdes, sont les producteurs majeurs d'IFN de type I et jouent un rôle central dans l'immunité innée et adaptative, l'induction et le maintien de la tolérance ainsi que dans la défense contre les virus

(Arpinati *et al.*, 2003). Elles constituent un sous-type de DC immatures capables de se différencier *in vitro* en DC matures en réponse à différents types de stimulation (Grouard *et al.*, 1997). En effet, en présence d'IL-3, de CD40L ou de virus, ces DC matures augmentent l'expression en surface de molécules de CMH de classe II, de molécules de costimulation et de récepteurs de chemokines tel que CCR7 et deviennent ainsi capables d'activer efficacement les lymphocytes T (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Cella *et al.*, 2000; Grouard *et al.*, 1997). La caractérisation phénotypique des pDC n'est pas aussi clairement définie que celle des autres sous-populations de DC. Les pDC ont longtemps été identifiées comme une population de cellules B220⁺CD11c^{low}CD11b⁻GR-1⁺ (Hochrein *et al.*, 2002). Chez l'homme, elles expriment BDCA-2 (*Blood DC Ag-2*, CD303), (Dzionek *et al.*, 2001), BDCA-4, CD123 (la chaîne α du récepteur à l'IL3) (Jahnsen *et al.*, 2000) et l'ILT7 (W. Cao & Bover, 2010). Elles expriment aussi les marqueurs lymphoïdes tels que CD2, CD5, CD7, et la chaîne α du récepteur des pré- lymphocytes T, mais elles n'expriment pas de molécules myéloïdes spécifiques telles que CD13, CD14, CD33 et CD11b (Shortman & Y.-J. Liu, 2002; Brière *et al.*, 2002; Dzionek *et al.*, 2002). Chez la souris, les pDC expriment les marqueurs CD317 (BST2) (Blasius *et al.*, 2006), Siglec-H (J. Zhang, Raper, *et al.*, 2006), Ly49Q (Omatsu *et al.*, 2005) et CCR9 (Hadeiba *et al.*, 2008), mais également la molécule LAG-3 (C. J. Workman *et al.*, 2009) connue pour réguler négativement l'expansion des cellules T activées (C. J. Workman & D. A. A. Vignali, 2003).

Bien que les pDC soient capables d'activer l'immunité innée et adaptative, leur rôle principal est l'induction et le maintien de la tolérance périphérique. Les pDC vont réagir différemment, en fonction de la nature de la stimulation, de la dose d'antigène et de leur état d'activation.

Ainsi, la molécule BDCA-2, une lectine C de type II (Dzionek *et al.*, 2002), joue un rôle dans l'internalisation et la présentation de l'antigène ainsi que dans la suppression de la production d'interféron α/β par les pDC selon un mécanisme dépendant à la fois de la mobilisation du calcium, de la phosphorylation des tyrosines et de la voie des Src kinases (Dzionek *et al.*, 2001). Plus récemment, une étude a permis de montrer que la liaison de BDCA-2 avec son ligand génère un signal similaire aux signaux via le BCR (le récepteur des lymphocytes B) (Röck *et al.*, 2007). En se liant à son ligand, BDCA-2 inhibe la production d'IFN- α/β par les pDC et favorise ainsi leur production d'IL-12 (Dzionek *et al.*, 2002). Contrairement aux pDC matures, les pDC immatures isolées chez l'homme ou chez la souris expriment des taux peu élevés de molécules de CMH de classe II et de molécules de costimulation et de ce fait sont incapables de présenter efficacement un antigène aux lymphocytes T ou d'induire la polarisation de cytokines (Grouard *et al.*, 1997; Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Boonstra *et al.*,

2003). Chez l'homme, les pDC induisent la génération de Treg CD4⁺CD25⁺ (Moseman *et al.*, 2004). Chez la souris, les pDC inhibent la réponse lymphocytaire T sans pour autant induire leur anergie mais en leur permettant d'acquérir des propriétés suppressives afin de supprimer la prolifération d'autres cellules T spécifiques de l'antigène (Martín *et al.*, 2002). *In vivo*, l'injection d'une population de pDC isolée du foie prolonge significativement la survie d'une allogreffe cardiaque chez la souris (L. Lu *et al.*, 2001). De manière intéressante, dans un modèle de tolérance d'allogreffe cardiaque chez le rat induite par CD40Ig, les pDC s'accumulent dans le greffon et la rate, mais pas les ganglions lymphatiques, et induisent des Treg CD8⁺ (X. L. Li *et al.*, 2010). Le potentiel tolérogénique des pDC CCR9⁺, ayant un phénotype de pDC immatures, est également démontré par leur capacité à prévenir la GVHD chez la souris, via l'induction de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ qui inhibent l'accumulation des cellules T effectrices produisant l'IL-17 (Hadeiba *et al.*, 2008). La stimulation de pDC par la protéine de fusion CD200-Ig (Fallarino *et al.*, 2004), CTLA-4 Ig ou GITR-Ig (Puccetti & Fallarino, 2008) permet de renforcer leur propriétés immunosuppressives en induisant la synthèse d'IDO par l'intermédiaire de la sécrétion d'IFN de type 1 et favorisant la voie tolérogène du catabolisme du tryptophane (Fallarino *et al.*, 2007). Davantage d'études ont montré que les pDC de ganglions drainant les tumeurs chez la souris expriment constitutivement IDO. *In vitro*, ces pDC suppriment la réponse de cellules T face à un antigène présenté soit par les pDC elles-mêmes soit par d'autres CPA non suppressives (Munn *et al.*, 2004). Les pDC interagissent également avec les mDC (cellules dendritiques myéloïdes) pour leur conférer la propriété de présenter efficacement un antigène spécifique *in vivo* et d'induire une réponse anti-tumorale (Lou *et al.*, 2007).

Ainsi, selon leur activation, les pDC peuvent devenir tolérogènes ou stimulatrices. En effet, activées en présence de CD40L et d'IL-3 mais en absence de ligands de TLR, les pDC développent des fonctions tolérogènes (**Figure 9**). Cependant, suite à leur activation en présence de CD40L, d'IL-3 et de ligands de TLR, elles développent des fonctions immunostimulatrices produisant de grandes quantités d'IFN de type I et favorisant la différenciation de cellules de l'immunité.

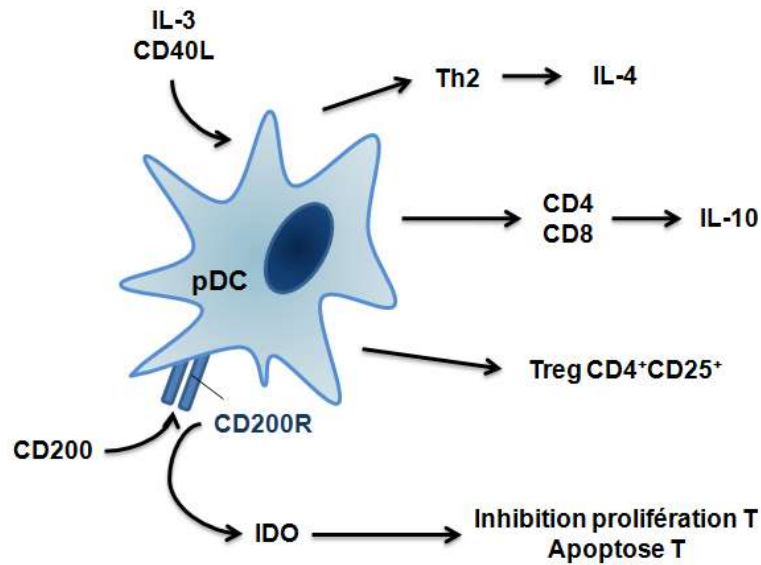


Figure 9 : Les fonctions tolérogènes des pDC.
D'après (M. Colonna *et al.*, 2004).

II-2.3 Les cellules souches mésenchymateuses

Découvertes dans les années 1960 par Friedenstein (Friedenstein *et al.*, 1968), et alors appelées colony-forming unit-fibroblasts (Perl *et al.*, 2010), les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont habituellement localisées dans la moelle osseuse où elles servent de soutien aux cellules souches hématopoïétiques. Elles ne représentent qu'une faible proportion (0,01%) des cellules mononuclées issues de la moelle. Ce sont des cellules multipotentes capables de se différencier en plusieurs types de cellules : cellules musculaires squelettiques, ostéoblastes, chondrocytes ou adipocytes (Pittenger *et al.*, 1999; R. J. Deans & A. B. Moseley, 2000). Elles ne possèdent pas à leur surface les marqueurs de cellules sanguines comme le CD45, CD34, CD11b ou le CD14, CD79 α ou CD19 et HLA-DR (Dominici *et al.*, 2006). Par contre, elles expriment les marqueurs tels que CD105, CD44, CD90, STRO-1 ou des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 ou ICAM-1. Cependant aucun de ces marqueurs n'est spécifique des MSC (Dominici *et al.*, 2006; Psaltis *et al.*, 2008). Ces MSC sont habituellement extraites de la moelle osseuse, mais il a été montré qu'elles pouvaient provenir d'autres tissus, plus facilement accessibles, comme le sang de cordon ombilical ou les tissus adipeux sous-cutanés (van der Bogt *et al.*, 2009). De manière très intéressante, les MSC ne provoquent pas de réaction immunologique lorsqu'elles sont transplantées d'un organisme à un autre car ne portent pas de molécules CMH (A. Kawamoto *et al.*, 2003) et une fois implantées dans les tissus, elles montrent un important rôle immunomodulateur (Uccelli *et al.*, 2006) (**Figure 10**). *In vitro*, les MSC sont capables d'inhiber l'activation et la prolifération de lymphocytes T induites par des alloantigènes (Tse *et al.*,

2003) ou suite à une stimulation polyclonale (Bartholomew *et al.*, 2002) (Di Nicola *et al.*, 2002; Krampera *et al.*, 2003) chez l'homme, les rongeurs et les primates en bloquant leur cycle cellulaire en phase G0/G1 et en les rendant anergiques (Glennie *et al.*, 2005). L'identification du ou des facteurs, synthétisés par les MSC et responsables de cet effet, porte encore à controverse comme l'indique les résultats divergents de différentes équipes. En effet, le rôle de diverses molécules a été supposé. Tout d'abord, Di Nicoli et coll. ont montré le rôle potentiel du TGF- β et du HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) (Di Nicola *et al.*, 2002). Cependant, l'ajout d'anticorps dirigés contre le TGF- β et le HGF ne semble pas restaurer la prolifération lymphocytaire (Le Blanc *et al.*, 2004). D'autres molécules plus prometteuses ont été évoquées comme l'IL-2 et l'IL-10 (Rasmusson *et al.*, 2005; S.-H. Yang *et al.*, 2009), l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15 (Bocelli-Tyndall *et al.*, 2009), la PGE2 dont l'inhibition annule les effets immunosuppresseurs, (Spaggiari *et al.*, 2008), l'IDO (Spaggiari *et al.*, 2008; Meisel *et al.*, 2004) ou encore le monoxyde d'azote (NO) synthétisé par les MSC après contact avec des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ activés (K. Sato *et al.*, 2007). Enfin, une molécule inhibitrice de la costimulation, B7-H4, a récemment été identifiée sur les MSC (Xue *et al.*, 2010). B7-H4 participe à l'activité régulatrice des MSC via l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T et l'inhibition de la translocation nucléaire de NF- κ B. De plus, le blocage de B7-H4 *in vitro* diminue la sécrétion de TGF- β (Xue *et al.*, 2010). Les MSC semblent devoir être activées pour pouvoir exercer leur activité immunosuppressive. En effet, Krampera et coll. ont montré que la présence d'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T était nécessaire pour que les MSC puissent inhiber leur prolifération (Krampera *et al.*, 2006). Par ailleurs, les MSC peuvent induire une expansion des Treg CD4⁺CD25⁺ *in vitro* (Aggarwal & Pittenger, 2005) et *in vivo* (Augello *et al.*, 2007), qui pourraient ensuite participer à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T. Cependant, il a été montré que la déplétion en Treg ne modifie pas les capacités immunosuppressives des MSC chez l'animal (Krampera *et al.*, 2003). De manière similaire aux effets observés sur les lymphocytes T, la prolifération de lymphocytes B murins, activés par de l'IL-4, un anticorps dirigé contre le CD40 ou le mitogène du teinturier (*Phytolacca americana*; *pokeweed mitogen*), est inhibée lorsque des MSC sont ajoutées (Augello *et al.*, 2005; Glennie *et al.*, 2005). Ces effets ont par la suite été observés sur des cellules humaines (Corcione *et al.*, 2006). Les MSC sont également capables de modifier le potentiel chimiotactique des lymphocytes B ainsi que leur différenciation en plasmocytes. L'effet immunosuppresseur des MSC sur les lymphocytes B semble très proche du mécanisme observé sur les lymphocytes T avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1

induit par un effecteur sécrété. Les voies de signalisation impliquées sont encore peu connues mais il a cependant été suggéré un rôle de la voie du tryptophane des lymphocytes B permettant une inhibition de la prolifération. Cette voie serait activée après expression d'IDO par les MSC (Krampera *et al.*, 2006). Les MSC sont également capables d'inhiber la prolifération des cellules NK stimulées par de l'IL-2 ou l'IL-15 (Krampera *et al.*, 2006; Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008). Cependant, les MSC, exprimant un faible taux de molécules du CMH I, sont elles aussi sensibles à la lyse des cellules NK (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008). Enfin, les MSC peuvent interférer avec la différenciation, la fonction et la maturation des DC, cellules clés dans l'induction d'une réponse immunitaire. En effet, l'addition de MSC entraîne une inhibition de la différenciation des monocytes et des progéniteurs CD34⁺ en DC lorsque ceux-ci sont cultivés en présence de GM-CSF et d'IL-4 (X.-X. Jiang, Y. Zhang, *et al.*, 2005; Nauta, Kruisselbrink, *et al.*, 2006). De plus, la présence de MSC dans des cultures de DC matures diminue le taux d'expression des marqueurs de surface de cellules matures (CD83), des molécules de présentations d'antigènes (HLA-Dr et DC1a), des molécules de costimulation (CD80 et CD86) et de l'IL-10 (X.-X. Jiang, Y. Zhang, *et al.*, 2005). En transplantation, une étude a permis de montrer que, chez les primates, les MSC retardent le rejet d'allogreffe de peau (Bartholomew *et al.*, 2002). Les MSC sont aussi capables de diminuer le rejet d'une greffe de moelle osseuse allogénique chez la souris (Nauta, Westerhuis, *et al.*, 2006) et protègent de l'ischémie/reperfusion dans un modèle de greffe de rein chez le rat (Tögel *et al.*, 2005). Cependant, même si le transfert de MSC améliore la GVHD suite à la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSC) (Ringdén *et al.*, 2006), il peut aussi induire des cellules T mémoires et accélérer le rejet de greffe (Fibbe *et al.*, 2007).

Ainsi, les MSC sont des cellules non hématopoïétiques multipotentes qui suggèrent un intérêt particulier en thérapie du fait de leur capacité à moduler les réponses immunes *in vitro* et *in vivo*. Suite à une irradiation sublétales des receveurs de moelle osseuse, elles sont cependant capables de développer une réponse allogénique qui conduit au rejet de greffe. Ces résultats suggèrent que les MSC allogéniques ne se comportent pas comme des cellules suppressives et sont capables d'activer une réponse lymphocytaire T du fait de leur immunogénicité dans des conditions où les receveurs sont immunocompétents.

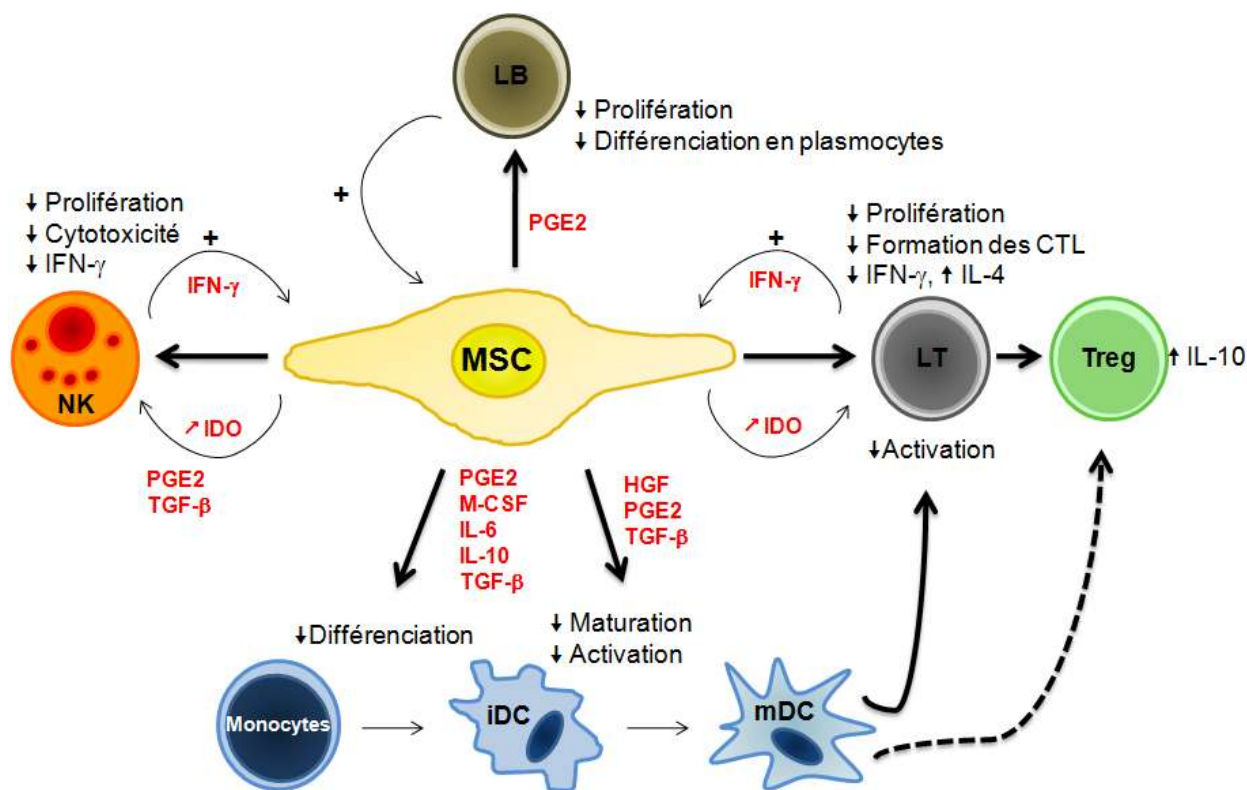


Figure 10 : Fonctions immunorégulatrices des MSC.

D'après (Nauta & Fibbe, 2007).

iDC : DC immature ; *mDC* : DC mature ; *CTL* : lymphocyte T cytotoxique ; *HGF* : Hepatocyte Growth Factor.

II-2.4 Les macrophages alternatifs activés

De nombreuses publications font état du caractère versatile et plastique des macrophages, leur permettant d'adapter la réponse inflammatoire à leur environnement. En particulier, les cytokines de type Th1, tels que l'IFN-γ, l'IL-1β ou le LPS, induisent un état d'activation des macrophages dit « classique » ou M1 (CAMΦ). En revanche, les cytokines Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-13 induisent une activation « alternative » ou M2 des macrophages (AAMΦ) (S. Gordon, 2003). Les macrophages M1 sont des cellules effectrices qui détruisent les microorganismes et produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires de type Th1, tels que le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-12 (J. Louis *et al.*, 1998; Hölscher *et al.*, 2001)). En outre, les macrophages activés alternatifs M2 (AAMΦ) présentent des propriétés anti-inflammatoires car ils produisent des facteurs de type Th2 tels que l'IL-10, le TGF-β et l'antagoniste du récepteur à IL-1β (IL-1Ra) (Munder *et al.*, 1999; S. Gordon, 2003). L'IL-4 et l'IL-13 sont les inducteurs directs typiques des AAMΦ, mais d'autres cytokines comme l'IL-

33 et l'IL-25 peuvent induire indirectement les AAMΦ, notamment via les cellules de type Th2 (O'Shea & Paul, 2010). Les macrophages alternatifs sont impliqués dans diverses pathologies et tout particulièrement dans les réponses allergiques, cellulaires et humorales contre des parasites et des pathogènes extracellulaires. Chez un individu sain, elles sont retrouvées au niveau du placenta et des poumons où elles protègent contre les réactions immunes non désirées et dans les tissus endommagés où elles diminuent la réponse inflammatoire (M. D. Chang *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1988; Song *et al.*, 2000; Mues *et al.*, 1989). Au niveau fonctionnel, les AAMΦ sont immunosuppresseurs et bloquent la prolifération de cellules T CD4⁺ activées (Goerdt & Orfanos, 1999; Schebesch *et al.*, 1997). Cependant, cette inhibition semble indépendante des molécules de costimulation ou de la synthèse d'IL-10 et de NO (contrairement aux CAMΦ) (Schebesch *et al.*, 1997). Une étude a montré que le blocage de la voie de costimulation CD28/CD80-86 favorise la génération d'AAMΦ responsables de la suppression de la réponse lymphocytaire T, suggérant un rôle des AAMΦ dans l'induction de la tolérance en transplantation (Tzachanis, Berezovskaya *et al.* 2002). Par ailleurs, une autre étude a permis de mettre en évidence une fonction encore non caractérisée des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, à savoir leur capacité à différencier les monocytes en AAMΦ par l'intermédiaire d'une voie partiellement indépendante des cytokines (Tiemessen *et al.*, 2007). Enfin, récemment le groupe de Bishop a montré qu'un traitement par l'IL-4 conduit à l'acceptation d'une allogreffe hépatique chez le rat, via une induction des AAMΦ hépatiques et des cellules NK exprimant le NO (C. Wang *et al.*, 2010).

II-2.5 Les lymphocytes B régulateurs

L'existence d'une ou plusieurs sous-populations de lymphocytes B régulateurs (Breg) a été évoquée par la première fois à la fin des années 1960 par des expériences de transferts adoptifs. Des animaux ayant reçu des injections des cellules d'origine splénique productrices d'anticorps ont présenté une résistance à l'immunisation induite par le SRBC (*Sheep red blood cells*) (A. Morris & Möller, 1968). Ce n'est que dans les années 1990 que Janeway *et coll.* confirment l'existence d'une fonction régulatrice portée par les cellules B, en utilisant un modèle d'EAE induit par un peptide de la MOG chez une souche murine déficiente en lymphocytes B (souris μ MT) (Wolf *et al.*, 1996). Les auteurs ont observé que l'absence de lymphocyte B provoque une exacerbation de la sévérité de la maladie. Par la suite, il a été démontré que la fonction régulatrice de lymphocytes B est liée à leur capacité à sécréter l'IL-10 (Fillatreau *et al.*, 2002). En effet, le transfert adoptif de lymphocytes B sécréteurs d'IL-10

chez la souris μ MT immunisée conduit à une diminution de la sévérité clinique de l'EAE. À la différence des Treg, la caractérisation phénotypique des Breg reste mal définie. Plusieurs travaux signalent en effet que les Breg sont composés de plusieurs types de lymphocytes B. La production d'IL-10 constitue un aspect bien connu des cellules B CD5⁺ présentes dans la cavité péritonéale (O'Garra & Howard, 1992; C.-M. Sun *et al.*, 2005). Il a également été décrit que la sous-population de cellules B transitionnelles, appelées T2-MZP (CD1d^{high}CD21^{high}CD23⁺IgM⁺) est capable de sécréter de l'IL-10 et d'améliorer l'évolution clinique de l'arthrite à collagène (J. G. Evans *et al.*, 2007). En accord avec ces résultats, chez l'homme, une population de lymphocytes B immatures régulateurs CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} a été décrite. Ces cellules seraient défailtantes quantitativement et qualitativement dans le lupus systémique (P. A. Blair *et al.*, 2010). Bien que de nombreuses publications décrivent différentes populations régulatrices, des études plus récentes ont mis en évidence une sous-population splénique unique CD5⁺CD1d^{high} comme source principale d'IL-10 du compartiment B. Ils sont communément appelés cellules B10. Ces cellules jouent un rôle déterminant dans l'initiation et le développement de l'EAE (Matsushita *et al.*, 2008; Yanaba *et al.*, 2008). Chez l'homme, l'expression du marqueur CD5 témoignerait d'un état d'activation et non d'une spécificité. De plus, aucune donnée ne permet d'affirmer l'équivalence fonctionnelle entre le CD1c humain et le CD1d exprimé par les Breg murins.

L'engagement du BCR, la coopération avec les lymphocytes T et l'activation des TLR (Fillatreau *et al.*, 2008; Yanaba *et al.*, 2009) va conduire à l'activation des Breg. La fonction la plus connue est leur capacité à sécréter l'IL-10 qui va agir à la fois sur les lymphocytes T en inhibant la différenciation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2 et Th17), et sur les DC en limitant la présentation d'Ag et la sécrétion des médiateurs proinflammatoires (Moulin *et al.*, 2000). Par ailleurs, d'autres travaux expérimentaux ont permis de mettre en évidence que les lymphocytes B présentent la capacité de sécréter du TGF- β , induisant ainsi l'apoptose des lymphocytes Th1, l'anergie des lymphocytes T CD8⁺ et l'inhibition de la fonction des CPA (Wolf *et al.*, 1996; Parekh *et al.*, 2003; Takenoshita *et al.*, 2002; J. Tian *et al.*, 2001). Les Breg auraient aussi la capacité à produire des anticorps à fonction régulatrice qui activent entre autres le récepteur inhibiteur FC γ RIIB exprimé par les DC (Bayry *et al.*, 2005; Jankovic *et al.*, 1998). Les Breg peuvent aussi réguler la réponse immune par des interactions directes avec d'autres cellules. Ils présentent la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs (E. Mizoguchi *et al.*, 2000) et d'induire la prolifération et l'activation des Treg Foxp3⁺ par l'engagement du CD40 (L. C. Chen *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2008). L'interaction Treg/Breg est également contrôlée par les molécules de

costimulation de la famille B7 (CD80 et CD86) (Mann *et al.*, 2007; Salomon *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2005). Ainsi, chez la souris EAE, l'expression de CD86 semble être particulièrement indispensable à l'induction de l'activation et à la mobilisation des cellules Treg Foxp3⁺ dans le SNC (Mann *et al.*, 2007). L'effet des Breg n'est pas seulement limité aux Treg Foxp3⁺. En effet, les Breg sont capables d'activer d'autres populations de cellules T régulatrices tels que les Treg CD8⁺ et les NKT (B. Wei *et al.*, 2005). En transplantation, leur rôle a été mis en évidence dans un modèle de tolérance induit par un anticorps anti-CD45RB dans l'allogreffe cardiaque chez la souris (L. C. Chen *et al.*, 2009; X. Huang *et al.*, 2008). Par ailleurs, une autre équipe de notre laboratoire a mis en évidence une augmentation de cellules B présentant aussi bien un phénotype de cellules B mémoires IgD⁻CD38^{+/+}CD86⁺CD40⁺CD62L⁺ ou de Breg CD19⁺FcγRIIB⁺BANK1⁺ chez des patients opérationnellement tolérants ayant subi une transplantation rénale et n'étant plus sous immunosuppression (Pallier *et al.*, 2010). De manière intéressante, une nouvelle étude issue de notre laboratoire montre l'accumulation dans le greffon de cellules B dans un modèle de tolérance dans l'allogreffe cardiaque chez le rat (Le Texier *et al.*, 2011). Tout comme chez les patients transplantés rénaux, les lymphocytes B dans ce modèle animal surexpriment les molécules FcγRIIB et BANK1. De plus, ces Breg issus d'animaux tolérants sont capables de transférer la tolérance à l'allogreffe (Le Texier *et al.*, 2011).

II-2.6 Les cellules myéloïdes suppressives

II-2.6.1 Identification et caractérisation

Dans les années 80, une nouvelle population cellulaire dénommée cellules naturelles suppressives, distincte des cellules T et NK, a été largement décrite chez la souris portant des tumeurs transplantables (S. Strober, 1984; Maier *et al.*, 1989). Ces cellules, générées dans la moelle osseuse sous l'influence de facteurs solubles produits par les tumeurs, dérivent d'une population mixte et hétérogène de cellules myéloïdes retrouvées à différents stades de différenciation et définies comme des cellules myéloïdes suppressives (MSC) du fait de leur capacité à supprimer des réponses immunes (Bronte *et al.*, 1998; Bronte *et al.*, 1999; Bronte *et al.*, 2000). Afin de minimiser la confusion existante avec les cellules souches mésenchymateuses (MSC), Gabrilovitch a récemment proposé de nommer ces cellules : « les cellules dérivées de cellules suppressives myéloïdes » (MDSC) (D. I. Gabrilovich, 2007). Ces cellules s'accumulent dans les organes lymphatiques chez la souris (Ezernitchi *et al.*, 2006), suite au développement de différentes pathologies incluant les infections bactériennes (Goñi

et al., 2002), l'inflammation chronique, la progression tumorale, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Bobé *et al.*, 1999) ou le stress immun (Cauley *et al.*, 2000). Chez la souris, les MDSC sont caractérisées par la co-expression de marqueurs de cellules myéloïdes tels que Gr-1 (Ly6G et Ly6C) et de CD11b (Bronte *et al.*, 1998) ainsi que des marqueurs de cellules immatures comme CD31 (Bronte *et al.*, 2000). Deux sous-populations de MDSC ont par ailleurs été identifiées : les MDSC dites « granulocytiques » CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} et les MDSC dites « monocytiques » CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} (Movahedi *et al.*, 2008; Youn *et al.*, 2008). D'autres marqueurs en corrélation avec la fonction suppressive de ces cellules sont caractérisés comme le CD80 (Mencacci *et al.*, 2002; R. Yang *et al.*, 2006), F4/80, CD115 (M-CSF récepteur) (B. Huang *et al.*, 2006) ou CD16 (M. A. Marshall *et al.*, 2001). Elles expriment également le CMH de classe I mais pas le CMH de classe II (D. I. Gabrilovich *et al.*, 2001). Chez l'homme, les MDSC accumulées chez les patients cancéreux (Pak *et al.*, 1995; Almand *et al.*, 2001) sont définies par l'expression de marqueurs immatures tels que CD34⁺, CD33⁺, CD15⁺, CD14⁻ et CD13⁺. Cependant, une nouvelle population de MDSC CD14⁺HLA-DR^{-low} a été récemment caractérisée chez des patients cancéreux (Hoechst *et al.*, 2008), suggérant que comme chez la souris, les différentes tumeurs humaines sont susceptibles d'induire des différents sous-types de MDSC. En présence de facteurs de croissance appropriés, les MDSC peuvent se différencier en CPA, en DC ou en macrophages en augmentant l'expression de molécules de costimulation et du CMH de classe II (Bronte *et al.*, 2000; Q. Li, P.-Y. Pan, *et al.*, 2004; S. Kusmartsev & D. I. Gabrilovich, 2003).

II-2.6.2 Origine et microenvironnement des MDSC

De nombreuses études ont montré que le milieu inflammatoire était responsable de la production et de l'accumulation de MDSC capables de bloquer la réponse immune T CD4⁺ et CD8⁺ et de conduire au développement de cancers. En effet, les cellules tumorales sécrètent de grandes variétés de cytokines qui permettent le recrutement des MDSC dans les organes lymphoïdes ou le sang et influencent leur différenciation en cellules suppressives (S. Kusmartsev *et al.*, 2003). Le but en cancérologie est donc d'empêcher l'accumulation de ces cellules suppressives ou de leur permettre de se différencier en DC ou en macrophages en bloquant les facteurs solubles produits par les cellules tumorales pour activer la réponse immune nécessaire à la régression tumorale (S. Kusmartsev *et al.*, 2003). En effet, la réduction du potentiel inflammatoire chez des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-1 permet de retarder l'accumulation des MDSC et de réduire la progression tumorale et métastatique (Bunt *et al.*, 2007). De plus, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), un

facteur de croissance nécessaire au recrutement (Melani *et al.*, 2003) et à l'expansion (Ohm & D. P. Carbone, 2001) des MDSC, M-CSF, IL-6 ou PGE2 bloquent la différenciation des MDSC en DC matures par l'intermédiaire d'un mécanisme nécessitant l'activation de la voie de signalisation STAT3 (D. Gabrilovich, 2004; Nefedova *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2007). De même, Chalmin et coll. montrent dans des modèles de cancers que Hsp72 est indispensable à l'expansion, l'activation et la fonction suppressive des MDSC murines ou humaines, également via la voie de signalisation de STAT3 (Chalmin *et al.*, 2010). Une autre étude utilisant un adénovirus codant pour le Flt3L (*fms-like tyrosine kinase 3 ligand*) a permis d'induire l'expansion des MDSC bloquant ainsi l'effet thérapeutique obtenu dans un modèle de cancers suite à l'utilisation de DC et de lymphocytes T, B ou NK (Solheim *et al.*, 2007). A l'inverse, l'utilisation de siRNA bloquant l'expression du facteur SCF (*Stem Cell Factor*) ou le blocage de l'interaction de SCF avec son récepteur c-kit dans un modèle de cancer chez la souris a permis de réduire l'expansion des MDSC, de restaurer la réponse proliférative de cellules T infiltrant la tumeur et ainsi de provoquer le rejet tumoral (P.-Y. Pan *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que la cyclophosphamide empêche la croissance tumorale en favorisant le développement de MDSC capables d'inhiber la réponse immunitaire par l'intermédiaire de la production de NO (Peláez *et al.*, 2001). Le GM-CSF induit lui aussi l'expansion des MDSC qui suppriment la réponse cellulaire T CD8⁺ spécifiques de la tumeur. En revanche en combinaison avec l'IL-4, le GM-CSF induit la différenciation des MDSC en DC matures capables d'activer la réponse immune (Bronte *et al.*, 1999; Mellstedt *et al.*, 1999). Enfin, il a été récemment montré que le complément C5a, appelé aussi anaphylatoxine, augmentent l'infiltrat de MDSC au niveau de la tumeur et leur confère une activité suppressive via la régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (Markiewski *et al.*, 2008).

II-2.6.3 Mécanismes de suppression

De nombreux mécanismes de régulations ont été associés aux MDSC, probablement dus à leur caractère hétérogène. Encore aujourd'hui de nouveaux mécanismes sont identifiés.

Suite à un stress immun, les MDSC s'accumulent dans les organes lymphoïdes où elles suppriment la prolifération et la production de cytokines de cellules T et B activées par des alloantigènes (Schmidt-Wolf *et al.*, 1992) ou par une stimulation via le CD3 (M. R. Young *et al.*, 1996) en les bloquant en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Mazzoni *et al.*, 2002; P. Serafini *et al.*, 2004) de façon contact dépendante (D. I. Gabrilovich *et al.*, 2001; S. Kusmartsev *et al.*, 2004). Les MDSC sont aussi capables d'inhiber l'activité des cellules NK

(Brooks & Hoskin, 1994). Une étude *in vitro* a montré que l'ajout de seulement 3% de MDSC était capable de bloquer totalement la prolifération des lymphocytes T (Mazzoni *et al.*, 2002). De nombreuses études ont montré que l'interaction cellulaire entre les MDSC et les lymphocytes T, ainsi que la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T, étaient nécessaires au déclenchement de l'activité suppressive par les MDSC (Mazzoni *et al.*, 2002). Ainsi, l'étude de souris tumorales a permis de montrer que l'IFN- γ produit par les lymphocytes T activés et la stimulation T par le CD40 (Lejeune *et al.*, 1994; Angulo *et al.*, 2000; Mazzoni *et al.*, 2002) permet aux MDSC d'utiliser les signaux provenant de l'IFN- γ et de l'IL-13 qu'elles sécrètent pour supprimer la réponse cellulaire (Gallina *et al.*, 2006).

Afin de contrôler la réponse cellulaire T et en réponse aux signaux fournis par les lymphocytes T activés, les MDSC activées utilisent deux types d'enzymes impliquées dans le métabolisme de la L-arginine: iNOS qui permet la génération de NO (S. A. Kusmartsev *et al.*, 2000) et Arg1 (arginase 1) qui appauvrit le milieu en arginine (Mills *et al.*, 1992; Bronte & Zanovello, 2005; Gallina *et al.*, 2006; Makarenkova *et al.*, 2006). L'activation de l'une ou l'autre de ces enzymes inhibe la prolifération cellulaire T en interférant avec les voies de transduction des signaux intracellulaires et en induisant l'apoptose des cellules T (Brito *et al.*, 1999; Bronte *et al.*, 2003). En effet, l'appauvrissement de la L-arginine inhibe la prolifération des cellules T à travers plusieurs mécanismes différents telles que la diminution de leur expression de la chaîne ζ de CD3 (P. C. Rodriguez *et al.*, 2002; P. C. Rodriguez *et al.*, 2007) et l'inhibition de leur régulation positive de l'expression de la cycline D3 régulatrice du cycle cellulaire et kinases cycline-dépendantes 4 (P. C. Rodriguez *et al.*, 2007). Ainsi, la perte de la chaîne ζ de CD3 entraîne une diminution des signaux intracellulaires qui en découlent (Otsuji *et al.*, 1996; Ezernitchi *et al.*, 2006) de façon dépendante du métabolisme de la L-arginine (P. C. Rodriguez *et al.*, 2007; P. C. Rodriguez *et al.*, 2002; Zea *et al.*, 2005). En effet, dans un milieu dépourvu en arginine, les lymphocytes T sont bloqués en phase G0/G1 du cycle cellulaire (P. C. Rodriguez *et al.*, 2002). La régulation de la concentration en L-arginine dans le microenvironnement représente donc un mécanisme important pour moduler l'expression de la chaîne CD3 ζ du TCR et ainsi la fonction cellulaire T (**Figure 11**). Le NO, quant à lui, supprime la fonction des lymphocytes T par le biais d'autres mécanismes impliquant l'inhibition de la fonction de JAK3 et STAT5 dans les cellules T (Bingisser *et al.*, 1998), l'inhibition de l'expression du CMH de classe II expression (Harari & Liao, 2004) et l'induction de l'apoptose des cellules T (Rivoltini *et al.*, 2002). *In vitro*, l'utilisation d'un inhibiteur de iNOS, le L-NMMA, (S. A. Kusmartsev *et al.*, 2000) ainsi que l'utilisation du L-

NMMA en combinaison avec l'Arg1 (Bronte *et al.*, 2005) bloquent l'inhibition de la prolifération cellulaire T par les MDSC. De même, l'utilisation d'inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 retarde la progression tumorale en diminuant l'expression de l'Arg1 et d'iNOS et ainsi en régulant la machinerie suppressive par les MDSC (P. Serafini *et al.*, 2006). De Wilde et coll. montrent pour la première fois qu'une autre enzyme, HO-1, est associée à la fonction suppressive des MDSC (De Wilde *et al.*, 2009). En effet, les MDSC induites par des endotoxines produisent de l'IL-10 et expriment HO-1 (De Wilde *et al.*, 2009), une enzyme intervenant dans la réponse au stress oxydatif et dotée de propriétés immunorégulatrices et cytoprotectrices. Ainsi, l'inhibition spécifique de HO-1 par du SnPP, annule complètement la suppression des cellules T et la production d'IL-10 par les MDSC, montrant le rôle important de cette enzyme dans la fonction des MDSC (De Wilde *et al.*, 2009).

En plus de leur action directe, l'équipe de Huang a montré que les MDSC peuvent aussi avoir une action indirecte sur l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T en induisant le développement de Treg CD4⁺CD25⁺ exprimant Foxp3 (B. Huang *et al.*, 2006). Le développement de ces cellules régulatrices est indépendant des mécanismes suppresseurs « classiques » des MDSC fonctionnant par la synthèse de NO. De plus, l'absence de l'expression de CD80 sur les MDSC ou l'utilisation d'anticorps dirigés contre la molécule CTLA-4 retarde la croissance tumorale suggérant que l'interaction CD80/CTLA-4 entre les MDSC et les Treg est nécessaire au développement de ces dernières (R. Yang *et al.*, 2006). Une autre étude a analysé l'interaction des MDSC avec les macrophages dans un modèle de cancer chez la souris. La diminution de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages est dépendante de la production d'IL-10 par les MDSC et bloque le développement d'une réponse Th1, ce qui favorise le développement tumoral (Sinha *et al.*, 2007).

Plus récemment, le peroxy-nitrite est apparu comme un médiateur essentiel de la suppression par les MDSC de la fonction des cellules T. En effet, le peroxy-nitrite est un produit d'une réaction chimique entre le NO et l'anion superoxyde, et est l'un des oxydants les plus puissants. Il induit la nitration et la nitrosylation des acides aminés comme la cystéine, la méthionine, le tryptophane et la tyrosine (Vickers *et al.*, 1999). De forts taux de peroxy-nitrites ont été retrouvés dans les régions où les MDSC et les cellules inflammatoires s'accumulent juste avant l'induction des réactions immunitaires. Ces niveaux élevés de peroxy-nitrites ont par ailleurs été associés à la progression tumorale dans de nombreux types de cancer (Vickers *et al.*, 1999; Cobbs *et al.*, 2003; Bentz *et al.*, 2000; Dairou *et al.*, 2005; Ekmekcioglu *et al.*, 2000; Kinnula *et al.*, 2004; Y. Nakamura *et al.*, 2006), qui a été liée à l'absence de réponse des cellules T. Une étude a également rapporté l'infiltration de cellules T CD8⁺ différenciées,

mais non-actives, dans l'adénocarcinome de la prostate chez l'homme (Bronte *et al.*, 2005). En effet, il semblerait que la production de peroxy-nitrites par les MDSC lors d'un contact direct avec les cellules T conduit à la nitration du TCR et de la molécule CD8, modifiant le peptide de liaison spécifique des cellules T et les rendant ainsi insensibles à la stimulation spécifique par l'antigène (Nagaraj *et al.*, 2007). Un autre facteur important qui contribue à l'activité suppressive des MDSC est la production de ROS. L'augmentation de la production de ROS est apparue comme l'une des principales caractéristiques des MDSC de souris porteuses de tumeurs et de patients atteints de cancers (Youn *et al.*, 2008; Bronte *et al.*, 2000; Schmielau & Finn, 2001; S. Kusmartsev *et al.*, 2005; Szuster-Ciesielska *et al.*, 2004; Waris & Ahsan, 2006; Mantovani *et al.*, 2003; Agostinelli & N. Seiler, 2006). *In vitro*, l'inhibition de la production de ROS par des MDSC extraites de ces souris et patients annule complètement l'effet suppressif de ces cellules (Bronte *et al.*, 2000; Schmielau & Finn, 2001; Szuster-Ciesielska *et al.*, 2004). Les intégrines, qui sont exprimées à la surface de MDSC, contribueraient à l'augmentation de la production de ROS suite à l'interaction des MDSC avec les cellules T. Cependant, plusieurs facteurs connus dérivés de tumeurs tels que le TGF- β , l'IL-3, l'IL-6, l'IL-10, les facteurs de croissance dérivés des plaquettes et le GM-CSF, peuvent également induire la production de ROS par les MDSC (Sauer *et al.*, 2001).

Deux autres mécanismes de suppression ont été récemment identifiés. Les MDSC peuvent notamment diminuer l'expression de la L-sélectine (CD62L), une molécule membranaire intervenant dans la migration des cellules T naïves vers les ganglions lymphatiques. Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont incapables de migrer vers les ganglions lymphatiques ou les sites d'inflammation où ils sont censés s'activer (Hanson *et al.*, 2009). Les MDSC peuvent également bloquer l'activation des cellules T en privant leur environnement de la cystéine, un acide aminé essentiel pour l'activation des cellules T. En effet, les cellules T ne possèdent ni l'enzyme de conversion de la méthionine en cystéine, ni le transporteur membranaire pour importer la cystine, qui pourrait ensuite être réduit au niveau intracellulaire en cystéine. Les cellules T doivent donc obtenir leur cystéine à partir de sources extracellulaires. En condition normale, les CPA (*i.e.* DC et macrophages) synthétisent la cystéine à partir de la méthionine et importent la cystine extracellulaire pour la convertir en cystéine. La cystéine excédante est ensuite exportée pendant la présentation de l'antigène et importée par les lymphocytes T. Or, les MDSC sont également incapables de convertir la méthionine en cystéine et sont donc totalement dépendants de l'importation de cystine. Lorsque les MDSC sont présentes en concentrations élevées, elles importent la plupart de la cystine disponible, privant ainsi les DC et les macrophages de cystine. Enfin, ne pouvant pas exporter la cystéine, les MDSC vont

donc induire un environnement déficient en cystéine induisant une incapacité des cellules T de synthétiser les protéines nécessaires à leur activation.

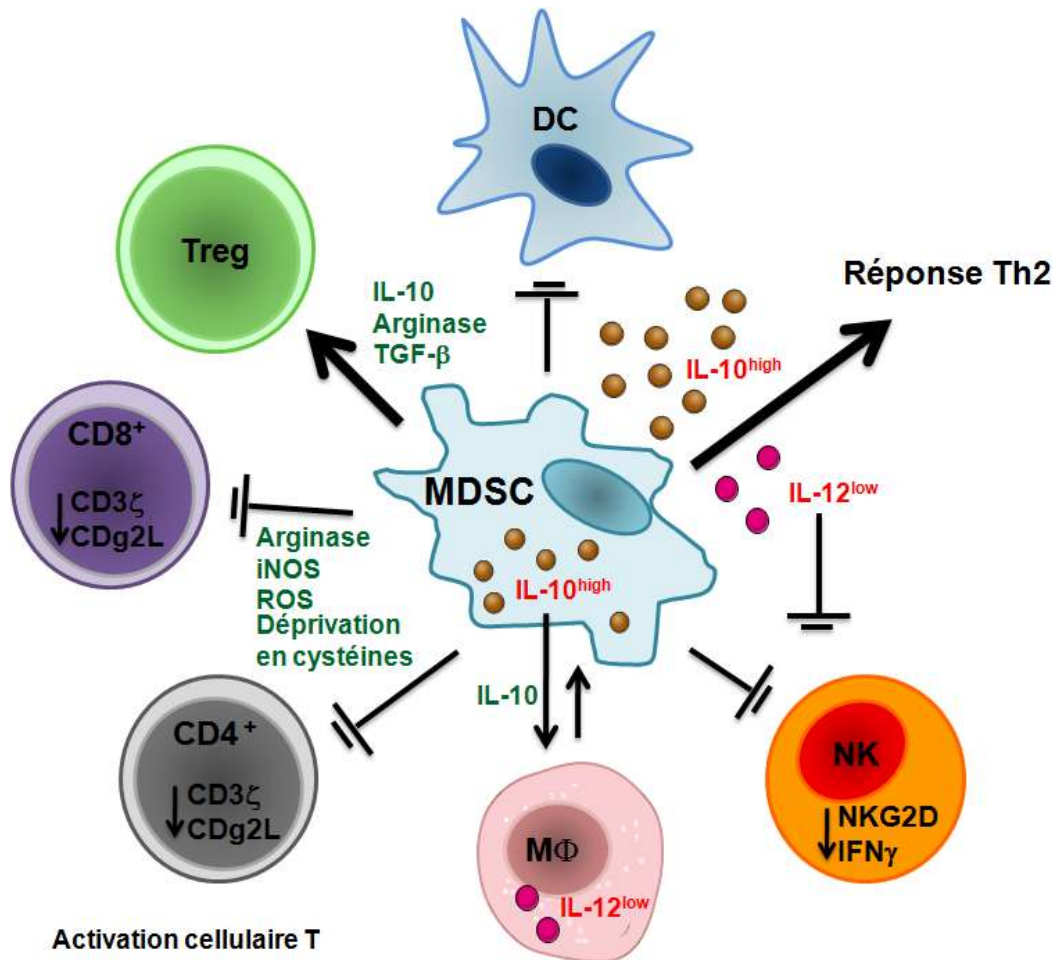


Figure 11 : Mécanismes suppresseurs des MDSC.
D'après (Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009).

II-2.6.4 MDSC et transplantation

En transplantation, le rôle des MDSC est peu caractérisé, contrairement à celui des Treg. Cependant, des données récentes montrent que les MDSC sont également associées à la survie à long terme et la tolérance en transplantation. Etant à un stade embryonnaire en transplantation, les MDSC sont principalement mises en évidence dans des modèles rongeurs. Une première étude sur des souris déficientes pour la molécule SHIP a permis de montrer qu'elles étaient capables d'accepter une allogreffe de moelle osseuse sans développer de GVHD. Or, la molécule SHIP intervient dans la régulation de la survie cellulaire, de la

prolifération, de la différenciation des cellules myéloïdes ainsi que dans la régulation de l'homéostasie des MDSC (Q. Liu *et al.*, 1999). Ainsi, l'inhibition de la GVHD chez ces souris SHIP^{-/-} semble être due à l'accumulation des MDSC qui suppriment les réponses cellulaires T allogéniques (Ghansah *et al.*, 2004; Paraiso *et al.*, 2007). Toujours chez la souris, le transfert adoptif de MDSC fonctionnelles générées *in vitro* à partir des cellules souches embryonnaires (ES) de souris prévient la GVHD (Z. Zhou *et al.*, 2010), via l'IL-10 et iNOS. Elles sont également capables d'induire le développement de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Z. Zhou *et al.*, 2010). De même, Highfill et coll. montrent que des MDSC dérivées de la moelle osseuse inhibent la GVHD par un mécanisme dépendant de l'Arg1, qui est elle-même est régulée par l'IL-13 (S. L. Highfill *et al.*, 2010). Le rôle des MDSC en transplantation d'organe a d'abord été décrit par notre équipe dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat, dans lequel la tolérance est induite par un anticorps antagoniste anti-CD28 (A.-S. Dugast *et al.*, 2008). Ainsi, une accumulation de cellules de phénotype CD3⁻ClassII⁻CD11b⁺CD80-86⁺ a été observée dans le sang des receveurs tolérants et des cellules de phénotype similaire ont également été détectées dans le greffon de ces animaux. Ces cellules, identifiées comme des MDSC, inhibent la prolifération des lymphocytes T effecteurs et induisent l'apoptose de manière contact-dépendant. Elles expriment également iNOS et leur fonction suppressive en dépend. En effet, l'injection d'un inhibiteur d'iNOS, induit le rejet d'allogreffe préalablement tolérée. Comme dans les tumeurs, les MDSC vont ici exercer leur fonction suppressive au niveau du greffon (A.-S. Dugast *et al.*, 2008). De même le transfert adoptif de MDSC traitées au LPS induit la prolongation de survie d'une allogreffe de peau chez la souris (De Wilde *et al.*, 2009). Dans ce modèle, les MDSC expriment HO-1 associée à une meilleure survie du greffon. De plus, le transfert du gène de l'HO-1 facilite l'induction de tolérance. HO-1 empêche la maturation des DC et la production de cytokines proinflammatoires, tout en préservant la sécrétion d'IL-10. Les MDSC traitées préalablement avec un inhibiteur spécifique de HO-1 ne préviennent pas le rejet de l'allogreffe de peau, suggérant que cette voie est importante pour l'induction de la tolérance en transplantation (De Wilde *et al.*, 2009). Toujours dans un modèle de peau chez la souris, l'induction *in vivo* de MDSC Gr-1⁺CD11b⁺ ou de Treg CD4⁺Foxp3⁺ par du rhG-CSF (*recombinant human Granulocyte-Colony Stimulating Factor, Neupogen*) ou par un complexe d'IL-2 (IL-2C) respectivement, prolonge la survie de l'allogreffe (Adeegbe *et al.*, 2010). De manière intéressante, lorsque les animaux sont traités avec la combinaison de Neupogen et IL-2C, une augmentation de Treg est observée (Adeegbe *et al.*, 2010), supposant un effet synergique des deux molécules. Ainsi, cette observation suggère une éventuelle coopération entre MDSC et Treg permettant une

prolongation de la survie d'allogreffe. Cependant, les mécanismes de régulation doivent être élucidés. Dans un autre modèle de greffe de peau chez la souris, l'engagement du récepteur ILT2 (un récepteur inhibiteur dont l'activation entraîne une diminution de l'activation des lymphocytes T) avec HLA-G induit l'expansion d'une population de MDSC dotée d'une importante activité suppressive (W. Zhang *et al.*, 2008). La survie des allogreffes de peau est prolongée suite à un transfert adoptif de ces MDSC provenant de souris transgéniques ILT2. L'évaluation histologique des allogreffes montre par ailleurs que les MDSC s'accumulent au niveau du greffon. L'interaction HLA-G/ILT2 induit du VEGF et du GM-CSF qui contribuent à l'expansion des MDSC. Par ailleurs, ces souris transgéniques ILT2 ont une augmentation de l'expression de l'Arg1, due probablement à la surexpression de l'IL-4 et l'IL-13 dans les MDSC (W. Zhang *et al.*, 2008). Des données récentes ont montré l'implication de MDSC dans un modèle d'allotransplantation d'îlots pancréatiques chez des souris diabétiques (Marigo *et al.*, 2010). Dans ce modèle, un transfert adoptif de MDSC, issues de la moelle osseuse et générées par le GM-CSF et l'IL-6, augmente de façon significative le pourcentage de survie à long terme des souris transplantées avec des îlots allogéniques en l'absence de toute immunosuppression. La tolérance est obtenue par une inhibition des cellules T productrice d'IFN- γ (Marigo *et al.*, 2010). Enfin, dans un modèle de transplantation cardiaque chez la souris, le groupe d'Ochando a mis en évidence des cellules CD11b⁺CD115⁺Gr1⁺ qu'ils qualifient de monocytes, présentant cependant le même phénotype que les MDSC. La tolérance à l'allogreffe est induite par le blocage de la costimulation par un anticorps anti-CD40L et est associée à l'augmentation de cellules CD11b⁺CD115⁺Gr1⁺ ayant des propriétés tolérogéniques. Peu de temps après la transplantation, les monocytes Gr1⁺ semblent migrer de la moelle osseuse vers l'organe transplanté, où ils empêchent l'initiation de réponses immunitaires adaptatives qui conduisent à un rejet d'allogreffe et participent à l'induction des Treg (M. R. Garcia *et al.*, 2010).

Ainsi, les MDSC représentent un ensemble de cellules régulatrices naturelles avec une forte capacité à contrôler la réponse immunitaire adaptative. Leur rôle potentiel dans l'induction et le maintien de la tolérance en transplantation expérimentale et clinique nécessite plus d'investigations. En effet, certains receveurs deviennent tolérants à leur allogreffes au cours des épisodes de septicémie durant lesquelles l'immunosuppression est arrêtée. Les MDSC peuvent ainsi être générées au cours de ces conditions inflammatoires, et peuvent fournir une contribution majeure à la tolérance. Le phénotype des sous-populations de MDSC humaines doit être défini de manière plus détaillée, et les facteurs impliqués dans l'induction, l'expansion et l'activation des MDSC lors de la transplantation n'ont pas encore été explorés.

Les caractéristiques de migration et la cinétique dans la distribution et l'activité des MSDC, en particulier dans le contexte de la transplantation, ne sont pas connus.

Lors de ma thèse, nous avons pu étudier la population de MDSC accumulées dans une situation de tolérance dans un modèle de greffe de rein chez le rat obtenue à la suite du blocage de la voie de costimulation CD28/CD80-86. Ceci sera plus amplement développé dans ma seconde partie intitulée « Résultats ».

III- Synapse immunologique et costimulation

III-1 Synapse immunologique

III-1.1 Formation de la synapse immunologique

L'engagement du TCR par le complexe CMH-peptide initie un signal qui est transmis au noyau par des cascades de phosphorylation et de translocations de protéines aboutissant finalement à l'activation cellulaire T. Cette initiation du signal intracellulaire est induite par un regroupement membranaire (clustering) des molécules de TCR qui s'accompagne d'un réarrangement caractéristique en surface de la cellule T pour former une structure circulaire concentrique au niveau de la zone de contact entre la cellule T et CPA, appelée synapse immunologique (SI). Divers mécanismes vont ainsi réguler positivement ou négativement cette activation cellulaire induite par le TCR. Un déséquilibre de ces modules de régulation peut affecter l'efficacité de la réponse immunitaire ou induire des phénomènes d'autoimmunité (Goodnow, 2007).

Les études d'imagerie en microscopie confocale ont montré une remarquable organisation moléculaire au sein de la SI (Monks *et al.*, 1998; Grakoui *et al.*, 1999; Bromley *et al.*, 2001; Cemerski & A. Shaw, 2006). La SI est composée de 3 régions concentriques basées sur leur composition moléculaire : (i) la c-SMAC riche en TCR, en molécules CD4 ou CD8 et en molécules de costimulation comme CD28 ; (ii) la p-SMAC entourant la c-SMAC, riche en intégrines comme LFA-1 (Monks *et al.*, 1998; Grakoui *et al.*, 1999) ; (iii) une troisième région appelée d-SMAC, riche en molécules volumineuses comme CD43 ou CD45.

Avec la formation de la synapse, le TCR initialement à l'extérieur est transporté au centre dans la c-SMAC tandis que LFA-1 initialement au centre est transporté à l'extérieur pour former la p-SMAC, aboutissant à la formation de la synapse « mature » (Grakoui *et al.*, 1999). Le complexe supramoléculaire d'activation SMAC (*SupraMolecular Activation Cluster*) se forme alors au niveau de radeaux lipidiques (micro-domaine lipidique riche en cholestérol et glycosphingolipides) formés dans la membrane plasmique favorisant l'échange de signaux. Le premier contact non spécifique entre un lymphocyte T et une CPA s'effectue par l'intermédiaire des molécules d'adhérence comme les interactions entre ICAM-1 et LFA-3 à la surface des CPA et leurs ligands LFA-1 et CD2 respectivement (**Figure 12**). Initialement, les molécules CMH et TCR sont plutôt externes et accompagnées de plusieurs protéines (CD43, CD45, ICAM-1). L'engagement du TCR provoque de petits agrégats et une

redistribution des protéines membranaires : TCR et CMH étant alors entourés d'un anneau riche en intégrines et ICAM-1, CD43, CD45 se trouvant en périphérie (Johnson et al., 2000; Sperling et al., 1998). LFA-1 joue un rôle très important dans le rassemblement des TCR avec SMAC ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette lymphocytaire et l'exclusion de la molécule CD45 de la synapse centrale (Graf *et al.*, 2007).

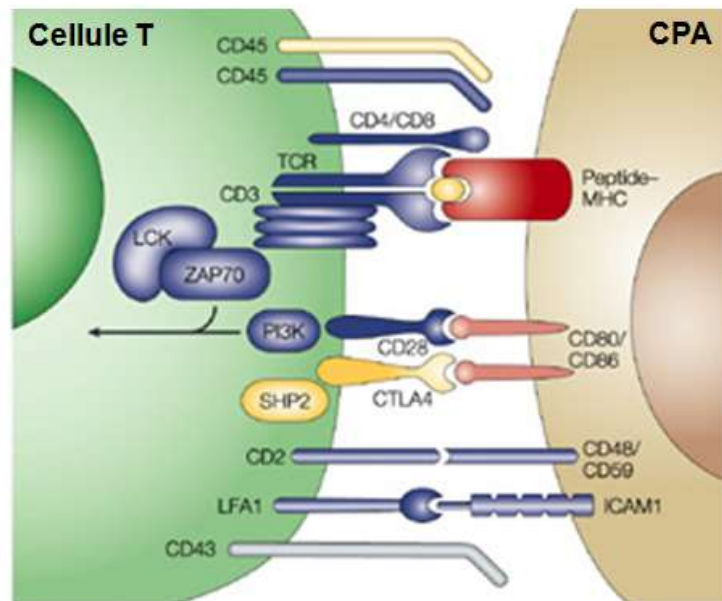


Figure 12 : L'interaction entre le lymphocyte T et la CPA.
D'après (Huppa & M. M. Davis, 2003)

III-1.2 Transduction du signal et voies de signalisation

La liaison du TCR avec le complexe CMH/peptide entraîne tout d'abord le recrutement et l'activation des Src kinases, Lck et Fyn. Ces protéines kinases vont phosphoryler les tyrosines des motifs ITAMs des domaines intracytoplasmiques des chaînes du complexe CD3 (**Figure 13**) (Smith-Garvin *et al.*, 2009). La tyrosine kinase ZAP70 se fixe alors à ces ITAMs phosphorylés via son domaine SH2 (*Src homology 2*). Parmi les plus importantes cibles de ZAP70, figurent la protéine transmembranaire adaptatrice LAT (*Linker for the Activation of T cells*) et la protéine adaptatrice cytosolique SLP-76 (*SH2 domain containing Leucocytes Phosphoprotein of 76 kDa*). Ces 2 protéines jouent un rôle central dans la mise en place et la connexion des différentes voies de transduction du signal. En effet, la phosphorylation sur de nombreuses tyrosines de ces protéines conduit à l'activation de différentes voies de signalisation dépendantes de la PLC- γ (*Phospholipase C- γ*) et de la PI3K

(*Phosphatidylinositol-3-OH Kinase*). Suite à l'activation du TCR, la PLC- γ est recrutée au niveau du complexe SLP-76, Vav1 et LAT où elle est ensuite phosphorylée par la kinase Itk (*IL-2-inducible T-cell kinase*). Une fois activée, la PLC- γ hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) conduisant à la formation de deux seconds messagers : l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) médiant la voie de signalisation calcique et le diacylglycérol (DAG) responsable de l'activation de la voie de la PKC- θ (*Protein Kinase C- θ*) et de la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*).

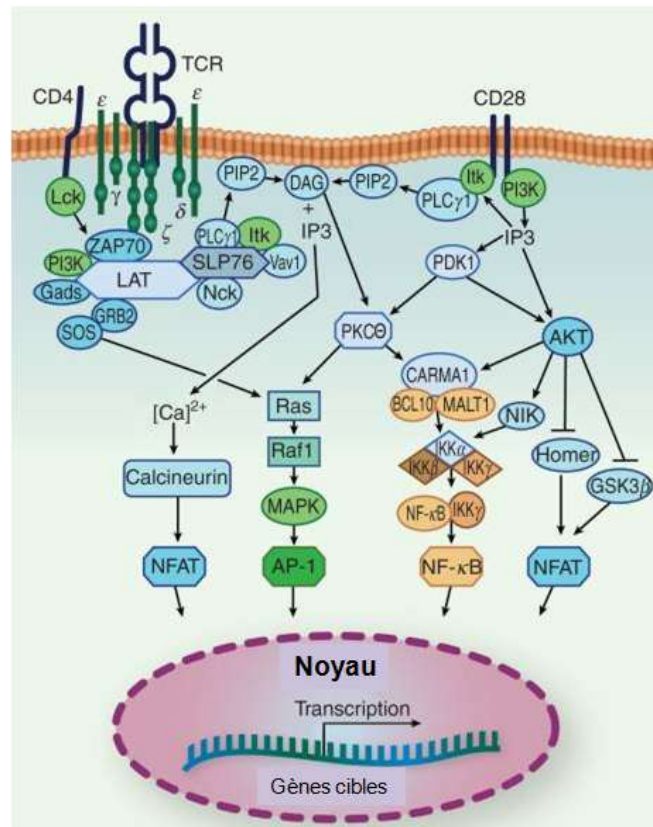


Figure 13 : Représentation schématique des voies de transduction du signal mises en place suite à l'engagement du TCR.

D'après (Padhan & Varma, 2010).

III-1.2.1 Voie de signalisation calcique

L'IP₃ se fixe à des récepteurs de la membrane du réticulum endoplasmique ouvrant ainsi des canaux calciques qui vont relarguer le calcium dans le cytoplasme (**Figure 14**) (Feske, 2007). Cette augmentation rapide mais transitoire de calcium conduit à l'ouverture de canaux calciques de la membrane plasmique du lymphocyte T, les CRAC (*Calcium Release Activated*

Calcium Channels). L'ouverture des CRAC permet une entrée du calcium depuis le milieu extracellulaire, maintenant ainsi une concentration cellulaire en calcium élevée. Le calcium se fixe alors sur la calmoduline. Le complexe calcium/calmoduline active alors la calcineurine, une phosphatase, qui va à son tour déphosphoryler le facteur de transcription NFAT et ainsi conduire à sa translocation au noyau. Dans le noyau, NFAT coopère avec de nombreux autres facteurs de transcription conduisant à l'expression différentielle de nombreux gènes dont celui de l'IL-2. La voie calcique, en agissant sur les protéines du cytosquelette, contribue aussi à l'immobilisation de la cellule T lors de la rencontre avec une CPA, formant ainsi la synapse immunologique mature.

III-1.2.2 Voie des MAP Kinases

La voie des MAP kinases (MAPK), utilisée par toutes les cellules de l'organisme, permet de réguler divers processus cellulaires allant de la différenciation cellulaire à l'apoptose. Chez les mammifères, les MAPK sont impliquées dans tous les aspects de la réponse immunitaire, allant de l'initiation de la réponse innée à l'activation de la réponse adaptative jusqu'à la mort cellulaire (C. Dong, R. J. Davis, *et al.*, 2002). Il existe 3 groupes majeurs de MAPK chez les mammifères : ERK 1 et 2 (*Extracellular signal-regulated protein kinases*), les p38 MAPK et les JNK (*c-Jun NH2-terminal kinases*). L'activation des MAPK résulte de l'enchaînement d'une cascade de phosphorylations sur des résidus sérine ou thréonine. Les MAPK sont phosphorylées par des MAP kinase kinases (MAPKK) qui sont elles-mêmes phosphorylées par des MAP kinase kinase kinases (MAPKKK). Suite à l'engagement du TCR, la protéine LAT va recruter et fixer la protéine adaptatrice GRB2 (**Figure 13**) (Smith-Garvin *et al.*, 2009). GRB2 est elle-même constitutivement associée à SOS, une GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) qui permet l'activation de la GTPase Ras. La protéine Ras active alors les MAPKKK induisant la cascade des MAP kinases qui conduit à la translocation nucléaire de ERK 1 et 2. Les kinases ERK vont activer le facteur de transcription Elk qui contribue à l'activation du complexe de transcription AP-1 (c-Jun/c-Fos) via la régulation de c-Fos. La costimulation par CD28 permet l'activation de Vav-1 conduisant à la phosphorylation de c-Jun par JNK qui pourra alors s'associer à c-Fos. De plus, le DAG, en induisant le recrutement à la membrane de la GEF RasGRP, permet aussi l'activation de Ras.

III-1.2.3 Voie de la PI3K

Une autre voie de transduction du signal implique l'intervention d'une lipide kinase, la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) qui phosphoryle le PIP₂ membranaire pour générer du PIP₃ (**Figure 13**). Après activation du TCR, la PI3K est recrutée à la membrane plasmique via le domaine SH2 de sa sous-unité régulatrice (p85). Il a été montré que la PI3K pouvait se fixer aux tyrosines phosphorylées des queues cytoplasmiques des molécules de costimulation CD28 et ICOS. L'activation de la PI3K se fait dans les secondes qui suivent l'activation du lymphocyte T, précédant même le flux calcique. Le lipide membranaire PIP₃ permet le recrutement à la membrane plasmique de nombreuses enzymes à domaine PH (*Pleckstrin Homology*) dont la sérine-thréonine kinase AKT qui joue un rôle important, notamment dans la croissance et la prolifération cellulaires, la survie et la production de cytokines. Les Tec kinases, dotées de domaines PH, dont Itk peuvent aussi être recrutées à la membrane et être activées. Elles permettent alors d'activer la PLC- γ . Il a aussi été suggéré qu'AKT et Itk pouvaient réguler la différenciation en Th1 et Th2 respectivement (Schaeffer *et al.*, 2001). De plus, la voie de la PI3K semble impliquée dans la sensibilité des T effecteurs à la suppression des lymphocytes T régulateurs (Wohlfert & R. B. Clark, 2007).

III-1.2.4 Voie de la PKC- θ

Le DAG mais aussi Lck vont favoriser l'activation de la PKC- θ (isoforme θ de la protéine kinase C) ainsi que son recrutement membranaire au niveau de la synapse immunologique (**Figure 14**) (K. Hayashi & Altman, 2007). La PKC- θ va ainsi réguler l'activation de facteurs de transcription importants pour la fonction des cellules T, tels que NF- κ B, AP-1 et NFAT. Une fois activée, la PKC- θ active la kinase IKK qui à son tour phosphoryle I κ B du complexe I κ B/NF κ B induisant ainsi la dégradation d'I κ B. Ceci permet la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B. Elle active également NF- κ B par la phosphorylation de la protéine CARMA-1 (*Caspase-recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein 1*) (Blonska & X. Lin, 2009). En effet, CARMA-1 va recruter 2 protéines, Bcl10 (*B-cell CLL-lymphoma 10*) et MALT1 (*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*), et former le complexe CBM. Ce complexe va activer la kinase IKK et conduire à l'activation de NF- κ B (Blonska & X. Lin, 2009). Le rôle de la PKC- θ dans la signalisation NF- κ B est sélectif de la voie de signalisation TCR-CD28 (Coudronniere *et al.*, 2000; X. Lin *et al.*, 2000). La PKC- θ induit aussi l'activation du facteur de transcription AP-1 via la phosphorylation de SPAK (*Ste20-related upstream mitogen-*

activated protein kinase) (Y. Li, J. Hu, *et al.*, 2004). Le rôle de PKC- θ sur NFAT est, quant à lui, controversé. En effet, une étude a rapporté que la voie calcique et l'activation de NFAT étaient *in vitro* relativement normales dans les cellules T déficientes en PKC- θ (Z. Sun *et al.*, 2000), tandis qu'un autre groupe a constaté que ces 2 voies étaient défectueuses (Pfeifhofer *et al.*, 2003). L'activation de NF- κ B et du complexe AP-1 conduit alors à l'activation de gènes impliqués dans la survie, la différenciation, l'homéostasie et les fonctions effectrices des lymphocytes T (Schulze-Luehrmann & Ghosh, 2006).

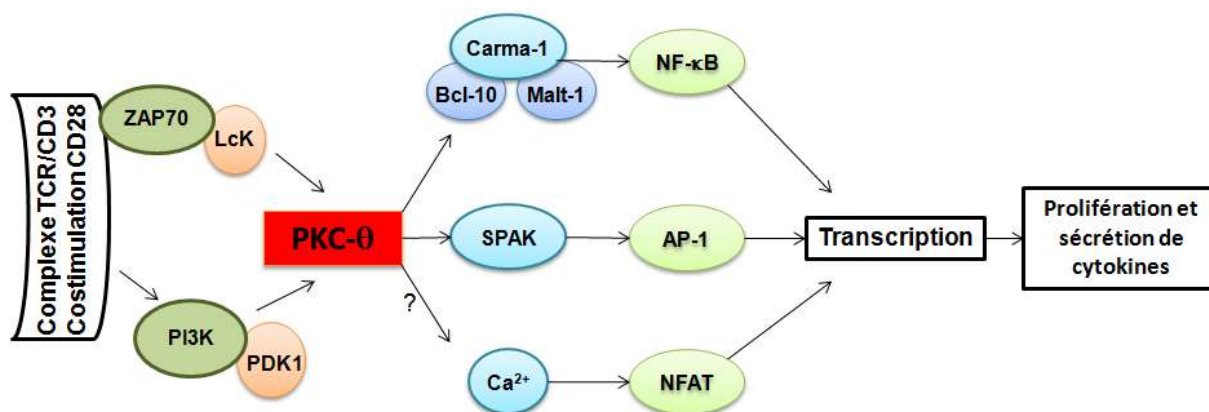


Figure 14 : Le rôle de la PKC- θ dans la signalisation induite par le TCR et CD28 dans les cellules T.

D'après (Zanin-Zhorov *et al.*, 2011).

III-2 La costimulation

Le signal fourni par le TCR n'est pas suffisant pour l'activation complète du lymphocyte T. En effet, la liaison du TCR en l'absence de signal de costimulation induit généralement l'apoptose ou un état d'anergie dans lequel les lymphocytes T sont incapables de produire de l'IL-2 et de proliférer (Schwartz, 1990). La costimulation apporte un signal supplémentaire requis pour dépasser l'état d'anergie et pour l'activation productive des lymphocytes T. Un grand nombre de co-récepteurs ont été décrits dont les mieux caractérisés sont les molécules de la superfamille des immunoglobulines, CD28, et ICOS (A. H. Sharpe & Freeman, 2002; Rudd & H. Schneider, 2003). Même si des études montrent l'importance de la costimulation via CD28 et CTLA-4 (détaillée ci-dessous), toutes les réponses immunes ne sont pas affectées par la perte de CD28 montrant que d'autres molécules peuvent costimuler les lymphocytes T. En effet, il existe de nombreuses autres molécules de costimulation parmi lesquelles figurent CD2, CD5, CD30, 4-1BB, OX40, LFA-1, PD-1 et ICOS.

ICOS, à l'inverse de CD28, n'est pas exprimé sur les lymphocytes T naïfs (Rudd & H. Schneider, 2003). En effet, l'expression d'ICOS est rapidement induite sur les lymphocytes T après activation et est influencée à la fois par la signalisation du TCR et de CD28. ICOS-L est exprimé constitutivement sur les DC, les monocytes et les lymphocytes B non stimulés, mais également sur les tissus non-lymphoïdes (Greenwald *et al.*, 2005). Lors de la phase d'initiation de l'activation des lymphocytes T naïfs, les effets d'ICOS sur la prolifération et la production d'IL-2 sont modestes. La costimulation du lymphocyte T via ICOS semble importante pour la régulation de la production de cytokines par les lymphocytes T récemment activés et par les lymphocytes T effecteurs. En effet, la liaison d'ICOS à ICOS-L peut entraîner une augmentation de la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IFN- γ , de TNF- α , et de GM-CSF (Hutloff *et al.*, 1999). De plus, ICOS intervient aussi dans l'inhibition de l'apoptose.

PD-1 est une protéine membranaire majoritairement exprimée par les lymphocytes T et B activés, mais elle peut également être présente sur les monocytes et les cellules NK activés (A. H. Sharpe & Freeman, 2002). Des études *in vitro* ont montré que PD-1 inhibait l'activation lymphocytaire et la production de cytokines (notamment l'IFN- γ) après engagement avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 principalement exprimés par les CPA (Buckland *et al.*, 2006; Latchman *et al.*, 2001). Cette propriété semble due aux motifs ITIMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs*) présents dans la queue cytoplasmique de ce récepteur. Par ailleurs, le blocage de la voie PD-1/PD-L1 dans différents modèles de greffes (moelle osseuse, cœur) accélère le rejet chronique et supprime la tolérance périphérique induite par les Treg (K. Tanaka *et al.*, 2007). Il apparaît donc que la voie PD-1/PD-L1 joue un rôle dans l'induction et le maintien de la tolérance (Habicht *et al.*, 2007; K. Tanaka *et al.*, 2007; J. Yang *et al.*, 2008).

III-2.1 La voie CD28/CD80-86/CTLA-4

Comme nous l'avons vu précédemment, la signalisation par le TCR entraîne un ensemble de signaux qui activent de multiples voies effectrices. Afin de contrôler l'amplitude et la durée de la réponse T, l'activation de ces voies est régulée par de nombreuses protéines, dont CD28 et CTLA-4 font partie.

III-2.1.1 CD28

Signalisation de CD28

CD28 peut recruter la PI3K, et l'interaction avec CD80-86 peut ainsi stimuler l'association de la PI3K avec CD28 (S. G. Ward *et al.*, 1993; K. V. Prasad *et al.*, 1994) et activer la voie de la PI3K (vue précédemment). L'activation de la signalisation de CD28 entraîne, avec le signal 1, également une modification de la conformation de la PLC- γ qui augmente la concentration de d'IP₃ à l'origine du relargage du calcium des vésicules intracellulaires vers le cytoplasme. Cette augmentation du calcium intracellulaire permet l'ouverture des canaux calciques et l'entrée massive de calcium dans la cellule provoquant la translocation des facteurs de transcription : NFAT, NF- κ B ou AP-1 (Diehn *et al.*, 2002; Acuto & Michel, 2003).

Rôle de CD28 dans la réponse lymphocytaire

La molécule de costimulation CD28 est une des premières molécules de costimulation identifiées et une des mieux caractérisées aujourd'hui. Outre son rôle potentiel dans la sélection thymique, CD28 joue un rôle primordial dans l'activation des lymphocytes T en périphérie (Harding *et al.*, 1992). En synergie avec le signal antigénique, CD28 permet de dépasser le seuil nécessaire à l'initiation de la réponse immune, notamment en diminuant le seuil et le nombre de TCR engagés nécessaires à l'activation (Viola & Lanzavecchia, 1996; Y. Itoh & Germain, 1997; Lanzavecchia *et al.*, 1999). A la suite du signal et de l'interaction de CD28 avec son ligand, la translocation calcium-dépendante des facteurs de transcriptions NFAT, NF- κ B et AP-1 contrôle la transcription d'IFN- γ , de l'IL-4 et surtout de l'IL-2 (C. B. Thompson *et al.*, 1989) qui agit de façon autocrine et fournit un signal de prolifération aux lymphocytes T. L'engagement de CD28 permet aussi l'expression de cyclines D3 responsables de l'entrée dans le cycle cellulaire des lymphocytes T alors que l'IL-2, produite après costimulation, est impliquée dans le maintien de la prolifération (Boonen *et al.*, 1999).

Par ailleurs, en synergie avec le TCR, les signaux CD28 sont à l'origine d'une protection active contre la mort cellulaire en augmentant l'expression de Bcl-x1 (molécule anti-apoptotique) (Boise *et al.*, 1995) et d'IL-2 nécessaire à la survie et l'activation des lymphocytes (Kane *et al.*, 2001). En effet, une nouvelle stimulation de lymphocytes récemment activés aboutit à une entrée en apoptose par un mécanisme d'AICD, permettant le contrôle des réponses immunes et évitant un emballement de ces dernières. En plus de l'interaction Fas-FasL, l'AICD est dépendante de la liaison TNF- α /TNFR2 qui entraîne notamment une diminution de l'expression d'ARNm codant pour Bcl-x1. Le signal CD28

restaure ainsi l'expression de Bcl-x1 et protège les lymphocytes T de l'AICD. La voie de costimulation CD28/CD80-86 est également impliquée dans la régulation de la balance Th1/Th2. En absence de CD28, il est décrit que les cytokines IL-4 et IL-5 ne sont pas produites suggérant que la différenciation Th2 dépendant de cette voie de costimulation (I. C. Rulifson *et al.*, 1997; Schweitzer & A. H. Sharpe, 1998). Par ailleurs, l'engagement de CD28 est impliqué dans la migration cellulaire et l'inflammation. Ainsi, la liaison CD28/CD80-86 permet la production de chimiokines tels que MIP-1 α et MIP-1 β (Herold *et al.*, 1997) ou de récepteurs de chimiokines comme CXCR4 (Carroll *et al.*, 1997). Enfin, l'étude *in vivo* de souris déficientes pour CD28 (ou CD80-86) a ainsi permis de montrer également un défaut dans la réponse cellulaire B dépendante de la réponse lymphocytaire T et un défaut d'expression de récepteurs de costimulation nécessaires à la progression et à la maturation de la réponse immune (A. H. Sharpe & Freeman, 2002). Enfin, une récente étude a mis en évidence la liaison d'ICOSL à CD28 et CTLA-4 (S. Yao *et al.*, 2011). Ainsi, l'interaction CD28/ICOSL semble être essentielle pour les réponses immunes contre un antigène allogénique ou les réponses mémoires. De la même façon que l'interaction CD28/CD80-86, cette interaction induit la survie cellulaire et la prolifération par l'induction de l'expression de Bcl-xL, par l'inhibition de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{kip1} et par l'activation importante des voies de signalisation passant par ERK et AKT (S. Yao *et al.*, 2011).

La synapse immunologique et CD28

CD28 ne semble pas jouer un rôle dans la formation de la SI mais plutôt dans son maintien. CD28 fait partie des microclusters ordonnés, qui associent notamment la PKC- θ . D'après le modèle de Yokosuka et coll. (**Figure 15**), après une première phase très rapide d'extension du contact, la synapse immature va se rétracter sur elle-même afin d'agréger tous ces microclusters au niveau de la c-SMAC. La formation de cette c-SMAC, qui prend une dizaine de minutes, signe la formation d'une SI mature (Yokosuka & T. Saito, 2009; Alarcón *et al.*, 2011). Sans la formation de ce cluster principal TCR/CD28 au cœur de la SI, il ne peut y avoir de transduction et de maintenance des signaux intracellulaires nécessaires pour obtenir une activation complète des lymphocytes T. Par ailleurs les flux calciques, induits par les signaux du TCR et de CD28, permettent le réarrangement et le transport vers la synapse d'autres molécules, comme CTLA-4, par des mécanismes dépendant de l'actine et de la myosine (Wülfing & M. M. Davis, 1998; Grakoui *et al.*, 1999).

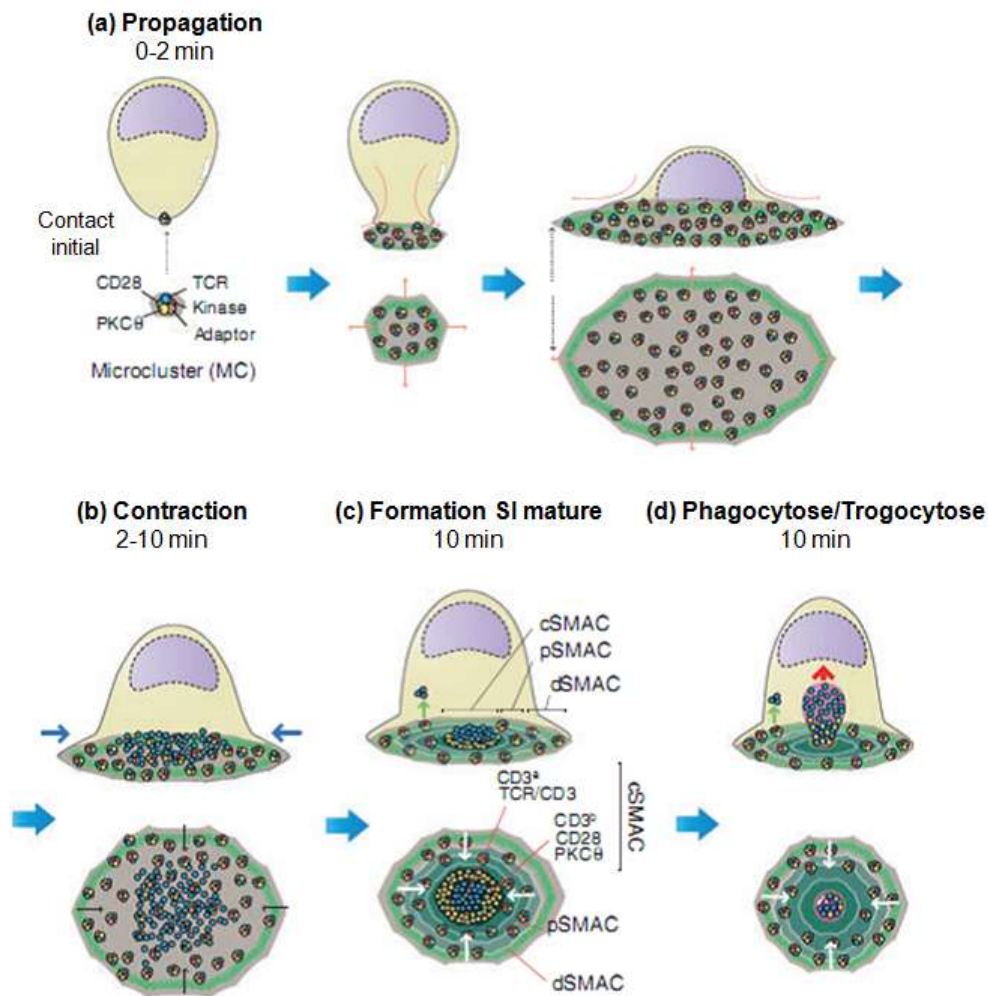


Figure 15 : Formation dynamique des microclusters de TCR-CD28 et de la synapse. D'après (Alarcón *et al.*, 2011).

III-2.1.2 CTLA-4

Signalisation de CTLA-4

CTLA-4 est un inhibiteur du signal transduit par le TCR et le CD28 qui est localisé au niveau de vésicules intracellulaires. A la suite de l'engagement du TCR, CTLA-4 est exporté à la membrane au niveau du site d'engagement du TCR (Linsley *et al.*, 1996). La proximité de CTLA-4 avec le TCR permet la phosphorylation d'une tyrosine de la partie intracytoplasmique de CTLA-4 par une protéine associée au complexe CD3, la molécule ZAP70 permettant l'activation et le maintien de la molécule à la surface. La translocation membranaire de CTLA-4 dépend également de la force du signal généré par le TCR (Egen & Allison, 2002). Ainsi, un signal généré par un peptide fortement agoniste induira une plus grande expression de CTLA-4 en surface qu'un signal généré par un peptide faiblement

agoniste. La tyrosine phosphorylée de CTLA-4 peut interagir avec la sous-unité p85 de la PI3K (H. Schneider *et al.*, 1995; Chuang *et al.*, 1999) et former un complexe avec la tyrosine phosphatase SHP-2 (Marengère *et al.*, 1996; Cilio *et al.*, 1998) permettant l'activation de la voie de signalisation de CTLA-4. L'interaction CTLA-4/SHP-2 pourrait inhiber la liaison de la tyrosine kinase Lck avec ZAP70 empêchant la phosphorylation de la chaîne ζ du CD3, nécessaire pour la transduction du signal par le TCR (Marengère *et al.*, 1996; K. M. Lee *et al.*, 1998). CTLA-4 agit tel un frein dès le début de la cascade de phosphorylation correspondant à la transduction du signal antigénique (M. Martin *et al.*, 2001). CTLA-4 a également des effets sur l'activation des facteurs de transcription consécutive à l'engagement du TCR et de CD28. En effet, la liaison CTLA-4/CD80-86 réduit la phosphorylation de I κ B- α et diminue l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (Olsson *et al.*, 1999). Enfin, à l'inverse de CD28 qui diminue le seuil d'activation du TCR, certaines études montrent qu'en présence de CTLA-4 ce seuil d'activation pourrait être plus élevé (Egen & Allison, 2002; Rudd, 2008).

Rôle de CTLA-4 dans la réponse lymphocytaire

Le rôle de CTLA-4 est très important dans le contrôle des réponses immunes, telles l'autoimmunité ou l'homéostasie lymphocytaire (Perrin *et al.*, 1996; Karandikar *et al.*, 1998). La génération d'un important désordre lymphoprolifératif accompagné d'un infiltrat de lymphocytes T et de la destruction de nombreux tissus, conduisant à la mort en trois semaines, chez les souris CTLA-4 KO en furent la première démonstration (Tivol *et al.*, 1995; Waterhouse *et al.*, 1995). CTLA-4 va agir d'une part, par un mécanisme passif de compétition qui, via le jeu des affinités entre les molécules CTLA-4 et CD28 pour leurs ligands, peut interrompre la signalisation transmise par CD28 (M. L. Alegre *et al.*, 1996; Carreno *et al.*, 2000) et ainsi conduire à la diminution de l'IL-2. D'autre part, un rôle majeur de CTLA-4 est dans la régulation par les Treg (voir partie sur les Treg). En effet, les désordres lymphoprolifératifs chez les souris CTLA-4 KO se retrouvent également chez des souris n'ayant qu'une invalidation conditionnelle de CTLA-4 uniquement dans les cellules Foxp3+, c'est-à-dire les Treg chez la souris (Wing *et al.*, 2008). Enfin, une signalisation intrinsèque de CTLA-4 conduit à divers effets inhibiteurs. CTLA-4 agit en bloquant la progression de la cellule dans le cycle cellulaire, notamment via le blocage de la cycline D3 ou Cdk4 et 6 (*Cyclin Dependant Kinase*), arrêtant la prolifération lymphocytaire T en phase G0 et G1 (Krummel & Allison, 1996; P. J. Blair *et al.*, 1998). L'arrêt du cycle cellulaire peut également conduire à l'apoptose des cellules activées par un mécanisme indépendant de la voie Fas/FasL

(Scheipers & Reiser, 1998). Par ailleurs, Hara et coll. ont montré que l'effet inhibiteur par CTLA-4 nécessite l'activation d'une GTPase, Rap-1 (Hara *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes précis ne sont pas connus. Dans une autre étude, en absence de CTLA-4, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se différencient en cellules de type Th2 et non en cellules de type Th1 (Ubaldi *et al.*, 2003), montrant un rôle de CTLA-4 dans la balance Th1/Th2. Enfin, l'engagement de CTLA-4 pourrait induire la sécrétion de cytokines immunosuppressives, comme le TGF- β , bien que le rôle de CTLA-4 dans sa production soit toujours controversé (W. Chen *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2001).

La synapse immunologique et CTLA-4

A l'inverse de CD28 une nouvelle fois, CTLA-4 joue a un rôle très important également dans la SI, notamment en empêchant sa stabilité. Ainsi, Schneider et coll. ont mis en évidence le rôle de CTLA-4 dans la SI : il inverse le « signal STOP » induit par le TCR après contact (H. Schneider *et al.*, 2006). Ils ont en effet montré *in vitro* et *in vivo* que CTLA-4 augmente la motilité des lymphocytes T CD4⁺ chez la souris et chez l'homme. Lorsque le TCR s'engage après contact, une signalisation indispensable permet notamment la stabilisation de la synapse. Ce « signal STOP » (**Figure 16**) induit par le TCR réduit de manière très importante, voire arrête, la motilité des lymphocytes T afin qu'ils puissent rester en contact pendant plusieurs heures avec la CPA et conduit à leur pleine activation (Negulescu *et al.*, 1996; Dustin *et al.*, 1997; Mempel *et al.*, 2004). Dans cette étude de Schneider et coll., l'augmentation de la motilité cellulaire après contact par CTLA-4 empêche par la suite la formation de SI stables. Les contacts cellulaires deviennent très courts et donc insuffisants pour engendrer l'activation des lymphocytes T, la prolifération et la production d'IL-2. L'explication moléculaire n'est pas encore complètement déterminée. En 2008, ce même groupe a de nouveau confirmé ce résultat et a montré que CTLA-4 perturbe et interrompt la formation de microclusters de ZAP70 au sein de la synapse (H. Schneider *et al.*, 2008), ce qui pourrait être à l'origine d'une diminution des flux calciques, du temps de contact et de l'augmentation de la motilité. Ce nouveau modèle est d'autant plus important que les nouvelles données de la littérature à partir d'analyse biphotonique *in vivo* montrent assez clairement que dans des modèles d'induction de réponses immunes spécifiques à un antigène ou dans des modèles de tolérance à un antigène, le comportement et notamment la motilité des lymphocytes T ne sont pas similaires (Bouso, 2008). En effet, lors d'une réponse immune à un antigène, les lymphocytes T dans les ganglions périphériques établissent de longs contacts (> 6 heures) avec les DC et leur motilité est très faible, permettant la stabilité

de ces SI. En revanche, dans le même modèle mais en condition tolérogène (sensibilisation au préalable à l'antigène), les lymphocytes T sont très mobiles et initient de courts contacts avec les CPA. Ils établissent ainsi de nombreux contacts très brefs avec de multiples DC (Hugues *et al.*, 2004). Enfin, une étude plus récente, utilisant des clones de cellules T chez la souris, confirme bien l'effet de CTLA-4 sur la motilité accrue des lymphocytes T (Hara *et al.*, 2009). Cette même étude attribue cet effet à une suppression de recrutement prolongé de la protéine du cytosquelette, Taline, au niveau de l'interaction lymphocyte T/CPA et à l'activation de Rap-1 qui initie des signaux négatifs et empêche la formation de la SI.

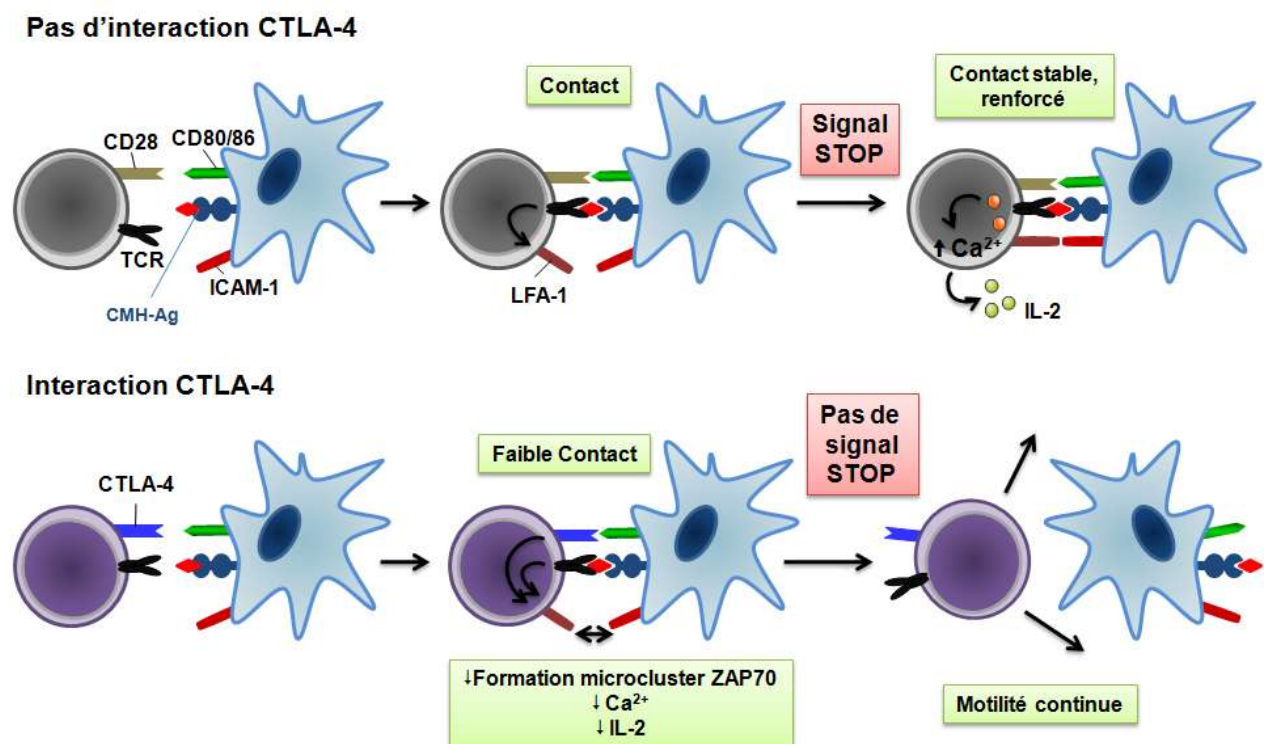


Figure 16 : Le modèle du « reverse STOP-signal » de CTLA-4. D'après (Rudd, 2008).

III-2.2 Le blocage de la costimulation

Depuis la découverte du signal 2 et de la voie CD28/CD80-86, de nombreuses stratégies thérapeutiques s'intéressant à bloquer spécifiquement la costimulation ont été développées pour spécialiser l'immunosuppression. Certaines sont arrivées jusqu'à un développement clinique. C'est notamment le cas des molécules bloquant les deux voies de costimulation les plus étudiées : la voie CD40/CD40L et la voie CD28/CD80-86/CTLA-4. Notre équipe

s'intéressant au blocage de la deuxième voie, seule celle-ci sera détaillée. Ainsi, deux stratégies furent adoptées pour le blocage de la voie de costimulation CD28/CD80-86/CTLA-4. La première stratégie est de bloquer l'ensemble de la voie par des anticorps monoclonaux anti-CD80 et anti-CD86, ainsi que par la protéine de fusion entre la partie extracellulaire de CTLA-4 et la fraction Fc d'une Ig : CTLA4-Ig. La deuxième stratégie, utilisée notamment par notre équipe, est le blocage sélectif de CD28, en ciblant directement cette molécule (**Figure 17**). Ainsi, lors de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes de régulation induits suite au blocage sélectif de la molécule CD28 dans un modèle de tolérance à l'allogreffe de rein chez le rat et j'ai étudié l'effet de ce blocage sur des cellules T effectrices et régulatrices humaines dans un modèle *in vitro* à l'aide de la vidéo microscopie (Time Lapse) (voir partie Résultats).

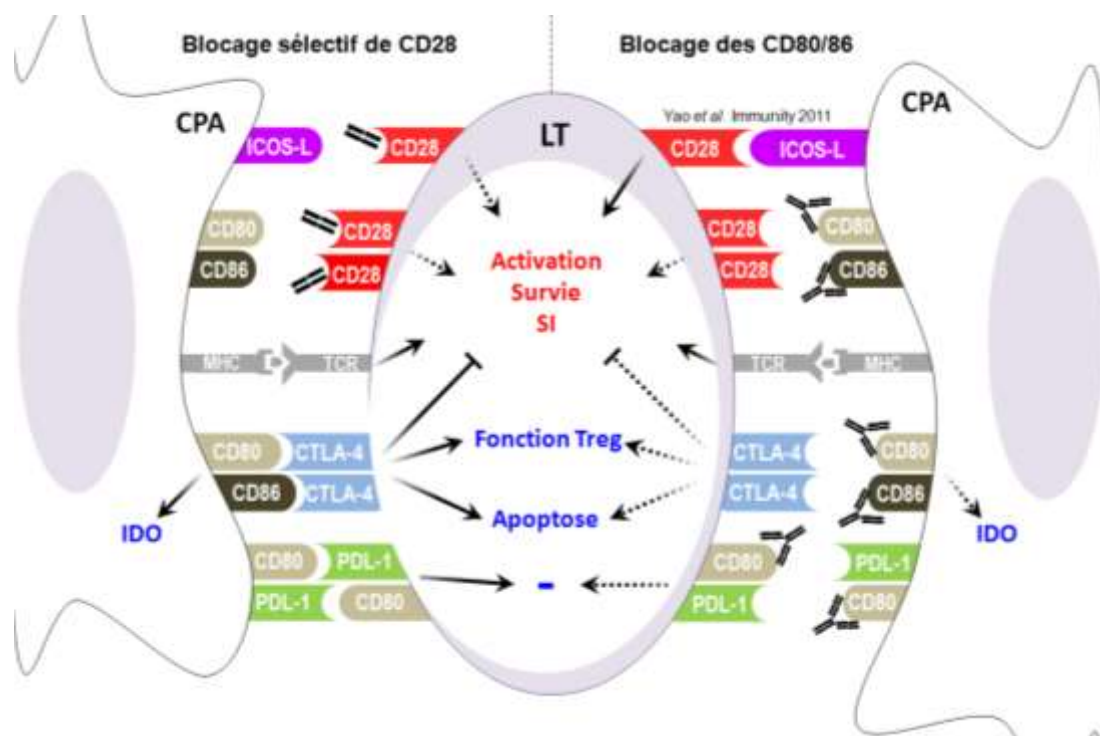


Figure 17 : Représentation schématique des mécanismes du blocage de CD28 vs CD80-86. D'après (Poirier *et al.*, 2011).

III-2.2.1 Blocage de CD80-86 en transplantation

La première stratégie pour bloquer cette voie de costimulation a été le blocage par des anticorps des récepteurs des molécules CD28 et CTLA-4 : CD80 et CD86. En effet, ces 2 anticorps combinés préviennent le rejet de fœtus dans des modèles murins (X.-Y. Zhu *et al.*, 2005; L.-P. Jin *et al.*, 2005) ou la GVHD T CD4⁺ ou CD8⁺ (Blazar *et al.*, 1996) et induisent

une survie de à long-terme de la greffe de peau ou de cœur (C. P. Larsen *et al.*, 1996; Woodward *et al.*, 1998). Cependant aucune induction directe de tolérance n'est obtenue *in vivo*, mais seulement dans des modèles *ex vivo* où les Treg jouent un rôle au premier plan (P. A. Taylor *et al.*, 2001). La molécule de CTLA4-Ig a été beaucoup plus étudiée ces dernières 20 années. CTLA4-Ig prévient de manière efficace et reproductible le rejet aigu et induit une survie à long-terme dans de nombreux modèles de transplantation (cœur, rein, îlots), mais l'induction de tolérance est cependant variable selon l'organe et les modèles utilisés, et non-reproductible (Turka *et al.*, 1992; H. Lin *et al.*, 1993; D. Yin & Fathman, 1995; Akalin *et al.*, 1996; X. X. Zheng *et al.*, 1997; X. X. Zheng *et al.*, 1999; K. Fan *et al.*, 2007). En revanche, que ce soit en transplantation cardiaque ou rénale, CTLA4-Ig réduit ou prévient l'apparition du rejet chronique (Russell *et al.*, 1996; H. Azuma *et al.*, 1996; Chandraker *et al.*, 1998; K. S. Kim *et al.*, 2001). Les deux stratégies anti-CD80/86 et CTLA4-Ig connurent un développement préclinique en transplantation rénale et d'îlots (pour CTLA4-Ig uniquement). Plusieurs études chez le PNH ont ainsi montré que l'anti-CD86 a une meilleure efficacité dans la prévention du rejet aigu et que la combinaison des deux anticorps induit une survie plus longue, mais les animaux finissent tous par rejeter et développer des alloanticorps (Kirk *et al.*, 2001). CTLA4-Ig est, quant à lui, inefficace en transplantation rénale chez le PNH en monothérapie (C. P. Larsen *et al.*, 2005) et montre uniquement un effet en association avec un court traitement anti-CD40L (Kirk *et al.*, 1997) sans induire de tolérance. Ce n'est qu'une version améliorée (LEA29Y ou belatacept), ayant une affinité plus forte, qui donne une efficacité en transplantation rénale en monothérapie et en association avec du MMF + stéroïdes (C. P. Larsen *et al.*, 2005). Cette nouvelle version a également été testée dans la greffe d'îlots en association avec de la rapamycine et un anti-IL2 récepteur (A. B. Adams *et al.*, 2002) et montre, comme dans la greffe rénale, que LEA29Y induit une survie à long-terme sans CNI et qu'il diminue le développement des alloanticorps. Une nouvelle fois, la tolérance n'est pas obtenue puisque les animaux montrent une réactivité cellulaire *in vitro* contre leur donneur et que l'arrêt du traitement se solde par des rejets. Le développement clinique des anti-CD80/86 ne semble pas en cours, en partie à cause du coût de développement et de l'administration de deux anticorps monoclonaux et d'une propriété intellectuelle complexe autour de CD80/CD86. Belatacept (Nulojix[®]), la forme améliorée de CTLA4-Ig, vient cette année d'avoir l'autorisation de mise sur le marché aux USA par la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*, note du 15 juin 2011). Son indication est la prévention du rejet aigu chez les transplantés rénaux. Belatacept a été approuvé pour une

utilisation avec d'autres immunosuppresseurs, en particulier le basiliximab, le MMF et des corticoïdes.

III-2.2.2 Blocage de CD28 en transplantation

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, le blocage de CD80-86 ou CTLA4-Ig ne semble pas être une stratégie optimisée, notamment à cause de l'interaction inhibitrice de CTLA-4 (nécessaire dans de nombreux modèles à l'induction de tolérance) qui est également bloquée. Dans ce cas, le blocage de cette voie en ciblant directement et sélectivement CD28 semble théoriquement une meilleure option (**Figure 17**). En ce qui concerne CD28, la plupart des anticorps anti-CD28 sont agonistes et sont basés sur leur activité stimulatrice pour les lymphocytes T : les anticorps conventionnels qui induisent un signal costimulateur en synergie avec un signal TCR et les anticorps anti-CD28 superagonistes capables d'induire une activation complète des lymphocytes T de manière indépendante du TCR. Néanmoins, des anticorps antagonistes ont été développés et leur effet en transplantation a été étudié dans divers modèles chez le rongeur dans lesquels ils induisent la tolérance (**Tableau 3**). Ainsi, chez le rat, un anticorps, JJ319 (M. Tacke *et al.*, 1995), s'est démarqué des autres et a été beaucoup plus étudiés. Bien que cet anticorps costimule les lymphocytes T *in vitro* en présence d'un signal TCR, il induit une internalisation de la molécule CD28 à la surface des lymphocytes T *in vivo* pour une période de 10 à 15 jours sans induire de déplétion de ces cellules (Dengler *et al.*, 1999; V. M. Dong, X. Yuan, *et al.*, 2002; Haspot *et al.*, 2002). Cette internalisation et sa conséquence directe, l'absence d'expression de CD28 à la surface des lymphocytes T, permettent à cet anticorps de se comporter comme un antagoniste. Cet anticorps est ainsi efficace dans les modèles de GVHD (Haspot *et al.*, 2002) où il induit en plus une apoptose des lymphocytes T alloréactifs après quelques cycles de division. En transplantation, chez le rongeur, il permet de prévenir le rejet d'allogreffe rénale (Haspot *et al.*, 2005; A.-S. Dugast *et al.*, 2008), cardiaque (Dengler *et al.*, 1999; V. M. Dong, X. Yuan, *et al.*, 2002; Guillonnet, Séveno, *et al.*, 2007) et de foie (Urakami *et al.*, 2006). Une association avec de la CsA ou une DST ou une molécule bloquant la voie CD40/CD40L est nécessaire en transplantation cardiaque et hépatique pour obtenir un état de tolérance et observer une inhibition du rejet chronique (Guillonnet, Séveno, *et al.*, 2007; V. M. Dong, X. Yuan, *et al.*, 2002; Urakami *et al.*, 2006). En transplantation rénale, JJ319 induit en monothérapie une tolérance donneur spécifique et une inhibition du rejet chronique (Haspot *et al.*, 2005; A.-S. Dugast *et al.*, 2008). C'est dans ce modèle que la population de cellules myéloïdes suppressives a été identifiée (A.-S. Dugast *et al.*, 2008) et étudiée (Article I).

Aux vues de ces résultats chez le rongeur, notre équipe a développé un anticorps monovalent antagoniste anti-CD28 chez l'homme, sc28AT (brevet PCT/FR1 04203 INSERM, 26/12/2001), provenant de la fusion d'un fragment ScFv (*Single chain Fv*) de l'anticorps humain bloquant de haute affinité, le CD28.3, et de l' $\alpha 1$ anti-trypsine humaine (Vanhove *et al.*, 2003). La fusion moléculaire avec l' $\alpha 1$ anti-trypsine humaine permet d'augmenter la taille de la protéine et ainsi sa demi-vie sérique (Ferkol *et al.*, 2000). Sc28AT, de part sa monovalence, empêche ainsi la transduction de signaux intracellulaires et se comporte en réel antagoniste (Vanhove *et al.*, 2003). Lors d'une étude préclinique, nous avons montré que sc28AT, en association avec un CNI (Tacrolimus ou CsA), prévient respectivement le rejet aigu dans un modèle d'allogreffe rénale et le rejet chronique dans l'allogreffe cardiaque chez le PNH (Poirier *et al.*, 2010). Par ailleurs, cet effet *in vivo* est associé à l'augmentation de T reg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans le sang et dans le greffon et à une non-réponse immunitaire spécifique du donneur. De plus, sc28AT empêche la formation de SI stable entre les lymphocytes T et les CPA de manière CTLA-4 dépendante (Poirier *et al.*, 2010). Cependant, le sc28AT, sous sa forme actuelle, n'étant pas utilisable chez l'homme, une forme modifiée, FR104 (brevet PCT/IB2011/050646), a été développée par notre laboratoire. FR104, humanisé, est sous forme d'un fragment Fab' pégylé qui permet ainsi d'avoir une meilleure demi-vie. Cet anticorps est actuellement en étude préclinique dans la greffe de rein chez le babouin en monothérapie ou en association avec d'autres immunosuppresseurs (Tacrolimus, rapamycine ou MMF). Les premiers essais cliniques sont prévus pour fin 2012. Seul un anticorps humanisé anti-CD28 superagoniste, TNG1412 (Tegenero), a fait à ce jour l'objet d'un essai clinique de phase I en Angleterre en 2006, en développement dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques. Les 6 volontaires sains ayant participé à cette étude ont rapidement développé une réponse inflammatoire violente due à un choc cytokinique majeur générant une déficience de multiples organes (Suntharalingam *et al.*, 2006). Cependant, contrairement à notre anticorps qui est bloquant, TNG1412 stimule directement les lymphocytes T indépendamment du signal antigénique. L'effet observé chez l'homme est ainsi une trop forte activation du compartiment T.

Introduction – Synapse immunologique et costimulation

| Modèle | Espèce | Traitement | Effets | Références |
|----------------------------------|---------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Allogreffe cardiaque | Rat | Anti-CD28 (JJ319) | Prolongation de survie | (Dengler <i>et al.</i> , 1999) |
| Allogreffe cardiaque | Rat | Anti-CD28 + CsA | Tolérance | (V. M. Dong, X. Yuan, <i>et al.</i> , 2002) |
| Allogreffe cardiaque | Rat | Anti-CD28 (JJ319) + CD40Ig | Tolérance | (Guillonneau, Séveno, <i>et al.</i> , 2007) |
| Allogreffe cardiaque | Macaque | Anti-CD28 (Sc28AT) + CsA + Stéroïdes | Inhibition du rejet aigu et de la vasculopathie | (Poirier <i>et al.</i> , 2010) |
| Allogreffe rénale | Babouin | Anti-CD28 (Sc28AT) + Tacrolimus | Inhibition du rejet aigu et tolérance | (Poirier <i>et al.</i> , 2010) |
| Allogreffe rénale | Rat | Anti-CD28 + CsA | Tolérance | (I. A. Laskowski <i>et al.</i> , 2002) |
| Allogreffe rénale | Rat | Anti-CD28 (JJ319) | Tolérance | (Haspot <i>et al.</i> , 2005; A.-S. Dugast <i>et al.</i> , 2008) |
| Allogreffe d'îlots pancréatiques | Souris | Anti-CD28 + Anti-LIGHT | Tolérance | (K. Fan <i>et al.</i> , 2007) |

Tableau 3 : Modèles d'induction de tolérance suite au blocage de la molécule CD28.

Résultats

Résultats

I- Projet I

I-1 Article 1

**CCL5 et les cellules myéloïdes suppressives contrôlent
l'infiltration de cellules T régulatrices dans le greffon et la
tolérance à la transplantation.**

**Nahzli DILEK, Nicolas POIRIER, Claire USAL, Bernard MARTINET, Gilles
BLANCHO et Bernard VANHOVE.**

Article en révision dans *Journal of Immunology*.

Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5

Nahzli DILEK^{*, †, ‡, §}, Nicolas POIRIER^{*, †, ‡, §}, Claire USAL^{*, †, ‡}, Bernard MARTINET^{*, †, ‡}, Gilles BLANCHO^{*, †, ‡} and Bernard VANHOVE^{*, †, ‡}.

* INSERM, UMR643, Nantes, F-44093 France ;

† CHU de Nantes, ITUN, Nantes, F-44093 France ;

‡ Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44093 France.

§ TcL Pharma S.A.S, Nantes, France.

Running title: Role of MDSC and CCL5 in transplant tolerance

Corresponding author: B. Vanhove. Tel. +33(0)240 08 74 17. Fax: +33(0)240 08 74 11. E-mail: bernard.vanhove@univ-nantes.fr

This work was supported in part by the Progreffe foundation and by a joint grant from TcL Pharma and the French ANRS, in the framework of a CIFRE convention.

Abstract word count: 242

Manuscript word count: 4461

Abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population of immature cells that are believed to inhibit immune responses in contexts of cancer and organ transplantation, in association with regulatory T cells (Tregs). The way in which MDSC cooperate with Tregs, however, remains elusive. Here, we used DNA microarrays to analyze gene expression in blood-derived MDSCs from rat recipients of kidney allografts. We found CCL5 (Rantes), a chemotactic C-C motif 5 chemokine, to be strongly down-regulated after treatment with a tolerizing regimen. The amount of CCL5 protein was also lower in the plasma of tolerant recipients, whereas intragraft CCL5 was unchanged. Since CCL5 is chemotactic for Tregs, we hypothesized that a gradient of CCL5 between the graft and peripheral blood might contribute to the intragraft localization of Tregs in tolerant animals. To test this hypothesis, we treated tolerant rat recipients of kidney allografts with recombinant rat CCL5 in order to restore normal plasma concentrations. This led to a strong reduction of intragraft Tregs monitored by immunohistofluorescence and by qRT-PCR measurement of Foxp3 mRNA. Ultimately, this treatment led to an increase in serum creatinine concentrations and to kidney graft rejection after about a month. The kidney function of syngeneic grafts was not affected by a similar administration of CCL5. These data highlight the contribution of MDSCs in the establishment of a graft-to-periphery CCL5 gradient in tolerant kidney allograft recipients, which controls recruitment of Tregs to the graft where they likely contribute to maintaining tolerance.

Introduction

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), a heterogeneous population of progenitor and immature myeloid cells (1), have been reported to contribute to immunosuppression in the tumor microenvironment (2, 3). These cells have also been associated with long-term survival and tolerance in transplantation (4, 5). Due to their heterogeneous nature, MDSCs have the ability to use several suppressive mechanisms that disrupt both innate and adaptive immunity. These include increased arginase activity (6, 7) and up-regulation of NO (8, 9), reactive oxygen species (ROS) and peroxynitrite production (10, 11). Furthermore, several recent studies have demonstrated that MDSCs can also block T cell activation by depriving the environment of cysteine (12) and by down-regulating L-selectin (CD62L) (13).

In spite of their suppressive capacity, MDSCs are probably not the major players in transplant tolerance. Indeed, transplant tolerance is mostly associated with the action of regulatory T cells (Tregs) (14) working in synergy with MDSCs (15, 16) but also with other suppressive cell types such as monocytes (17), NK (18), pDC (19-22) or iDC (23). However, the mechanisms involved in this cooperation are still poorly known.

Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), also called RANTES (Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted), plays an essential role in inflammation and immune responses. CCL5 is a chemotactic cytokine playing an active role in recruiting leukocytes into inflammatory sites. This chemokine is produced by tumor cells in the tumor microenvironment (24, 25) and participates in the recruitment of Tregs that preferentially express the CCL5-receptor, CCR5, thereby blocking immune responses. Disruption of CCR5/CCL5 by administration of a CCR5 inhibitor has been shown to induce a reduction in migration of Tregs into tumors as well as rejection by immune cells (25). In addition, after transplantation, systemic treatment with the RANTES antagonist Met-RANTES was shown to dramatically suppress the acute tissue damage underlying rejection and to limit endothelial cell-leukocyte interactions and infiltration in allografts (26-30).

In a previous study we reported on the role of MDSCs in sustaining tolerance in rat recipients of kidney allografts treated with a CD28-targeted tolerance-inducing regimen (9). Here, we compared gene expression in blood-derived MDSCs from tolerant recipients of allogeneic kidney grafts in the same model with syngeneic grafts. In addition to modifications in genes regulating cell activation (*Lax1* and *LAT*) and apoptosis (*Bcl2like12*, *Barhl1* and *Dapk2*), we observed the strong down-regulation of *CCL5* in blood MDSC, as well as a reduction of *CCL5* plasma levels in tolerant recipients. Knowing that *CCL5* is expressed by the kidney and

participates in the recruitment of leukocytes and particularly Tregs, we hypothesized that a gradient of CCL5 between the graft and the periphery could promote intragraft localization of Tregs and contribute to transplant tolerance. This hypothesis was confirmed by the observation that restoration of physiological plasma levels of CCL5 led to a reduction of intragraft localization of Tregs and to kidney allograft rejection. Our data depict a situation where peripheral MDSCs repress *CCL5* gene expression in tolerance and suggest a role of CCL5 in intragraft localization of Tregs.

Materials and methods

Antibodies and reagents. Anti-CD80 (3H5) and anti-CD86 (24F) mouse antibodies were prepared in our laboratory from a hybridoma provided by Dr. H. Yagita (Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan). Biotinylated anti-Foxp3 (FJK-16s) was from eBioscience (San-Diego, CA, USA). Purified anti-MHC class II (OX6), anti-CD3 (G4.18) and anti-TCR β (R7/3) were prepared in our laboratory from the corresponding hybridomas obtained from the European Cell Culture Collection (Salisbury, UK). FITC-conjugated anti-mouse and PE-conjugated Streptavidin were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Alexa568-conjugated Streptavidin was from Life Technologies (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Recombinant rat chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5, also known as Rantes) was purchased from Creative BioMart (New-York, NJ, USA).

Rats and Transplantations. Seven- to 9-week-old male Lewis.1W (RT1u) and Lewis.1A (RT1a) congenic rats were obtained from Janvier (Savigny/Orges, France) and maintained in our animal facility under SPF conditions according to institutional guidelines. Kidney allografts were performed as previously described (31). One native Lewis.1W kidney (right side) was replaced by the LEW.1A donor allograft, and a contralateral nephrectomy was performed 7 days later, after which time the recipient's survival depended on the proper functioning of the allograft.

Tolerance induction. The JJ319 (IgG1 anti-rat CD28) mouse hybridoma was a gift from Dr. Thomas Hunig (Wurzburg, Germany). The JJ319 mAb was purified from hybridoma supernatant and administered to LEW.1A allograft recipients by i.p. injection at 0.3 mg/day for 7 days starting on the day of transplantation. This Ab induces a transient down-regulation of CD28 expression *in vivo*, without depleting target cells (32). Without treatment, the grafts were rejected 11 days after transplantation. Syngeneic transplants (LEW.1A to LEW.1A) served as controls.

Administration of rCCL5. ALZET osmotic micro- and mini-pumps, model 1002 and 2001 (respectively), were purchased from Charles River (Wilmington, MA, USA). Filling osmotic pumps with recombinant rat CCL5 (Creative BioMart, New-York, NJ, USA) was done according to the instructions of the manufacturer. Pumps were surgically implanted

intraperitoneally under isoflurane anesthesia and sterile conditions. Transplanted rats received rCCL5 (14 µg/kg/day) intraperitoneally by mini-pump (model 2001); followed or not by a micro-pump (model 1002). The treatments were performed over a period of 14 or 21 days.

Cells and cell sorting. Peripheral blood leucocytes (PBL) were isolated from heparinized blood by removing erythrocytes with hypotonic lysis solution. Depletion of MHC class II + and CD3+ cells was performed with specific mAbs, followed by anti-mouse IgG-coated Dynabeads (Life Technologies). MDSCs were identified by staining for 30 min at 4°C with purified anti-rat CD80/86 (3H5/24F) mAbs and FITC-conjugated anti-mouse IgG secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) as previously described (9). MDSCs were isolated using automated magnetic cell sorting (AutoMACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) based on CD80/86 expression.

Microarray and data analysis. mRNA was extracted from sorted cells using TRIzol (Life Technologies). The quality and quantity of extracted total RNA were checked by a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), agarose gel analysis and microfluidic capillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Genomics, Santa Clara, CA, USA) evaluating the 28S/18S ratio. MDSC gene expression patterns were assessed using six (3 animals/group) Rat Genome Survey Microarrays (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). The Rat Genome Survey Microarray contains approximately 27,000 Rat genes from both public and Celera databases. Microarray target sample processing, target hybridization, washing, staining and scanning steps were completed according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Briefly, 5 µg of total RNA was converted to digoxigenin (DIG)-labeled cDNA for hybridization using the Applied Biosystems Chemiluminescent RT Labeling Kit. The hybridization to target probes was performed with the Applied Biosystems Chemiluminescence Detection Kit, which was also used for the preparation of the rat genome survey microarrays for chemiluminescence (CL) detection in the Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer. The *ABarrayGUI* package of Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>), running in the R environment (<http://www.r-project.org>), was used to compute a number of quality assessment metrics of post chip results, according to guidelines, like Average Background, Scale Factors, and Percent Present. Gene expression data are presented as Fold Change (Tolerant MDSCs/Syngeneic MDSCs). Full microarray

data are available on the Gene Expression Omnibus web-based data repository, under the GEO accession number GSE28545.

Quantitative real-time PCR. RNA was extracted from sorted cells or snap-frozen renal biopsies using TRIzol reagent (Life Technologies). A total of 2 µg RNA was reverse transcribed using the Omniscript RT-PCR kit (QIAGEN, Düsseldorf, Germany). The quality and quantity of RNA was controlled by infrared spectrometry (NanoDrop) and Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit (Genomics). Quantitative real-time PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7900 Sequence Detection System. TaqMan gene expression assays for rat transcripts (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) were used to quantify the mRNA expression of the respective genes: HPRT (Rn01527838_g1), CCL5 (Rn00579590_m1), Foxp3 (Rn01525085_m1), C-C chemokine receptor 5 (CCR5, Rn00588629_m1), BCL2L1 (Rn001480035_g1), LAT (Rn00578273_m1), LAX1 (Rn01490345_m1) and Dapk2 (Rn01417725_m1). HPRT was used as an endogenous control gene to normalize varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a control sample, used for all experiments, was calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Expression of genes of interest was compared between tolerant animals and syngeneic controls. The results obtained are presented as fold induction *versus* the baseline levels in control syngeneic transplanted rats.

ELISA. Plasma was collected from heparinized blood and frozen at -20°C before use. Kidneys were harvested on day 100 post transplantation and their volume was evaluated. Kidneys were homogenized at 4°C in RIPA lysis solution with an Ultra-turrax (IKA, Lille, France). After agitation, protein lysate was centrifuged and supernatant collected and frozen at -20°C before use. CCL5 was measured by using a commercially available ELISA kit (Leinco Technologies, Inc., Saint Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions.

Immunohistochemical staining. Frozen sections (10µm) were prepared from renal biopsies. Slides were air dried at room temperature for 1h before acetone fixation for 10 min at room temperature. Sections were saturated and permeabilized with 0.5% Saponin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the saturated solution (PBS containing 5% rat serum, 2% normal goat serum and 4% BSA). Sections were incubated overnight with primary Abs at 4°C, followed by fluorescent secondary Abs and nuclear staining (DAPI; Life Technologies). Tregs

infiltration was assessed by double staining with anti-rat TCR β antibodies (followed by FITC-conjugated anti-Mouse IgG) and anti-rat Foxp3 (followed by Alexa568-conjugated Streptavidin; Life Technologies). Slides were analyzed using standard fluorescence confocal-like microscopy (Apotome, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and the AxioVision imaging software (Carl Zeiss, Le Pecq, France). A grading system from one to three was used, representing moderate (+; <10% of the surface), medium (++; >10% and <30% of the surface) and severe (+++; >30% of the surface) infiltration of the observed region, evaluated on 10 microscope fields chosen randomly on the preparation.

Statistical analysis. Graft survival was calculated using the Kaplan-Meyer method. The log-rank test was used to compare survival times between different groups. Continuous variables were compared using the Mann-Whitney non parametric test or analyzed by ANOVA followed by Kurskal-Wallis correction. *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed on a personal computer with the statistical package GraphPad InStat (version 5.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Microarray analysis of MDSCs.

We previously reported that kidney transplant tolerance could be induced in the LEW.1W to LEW.1A rat model by administration of functionally antagonist anti-CD28 antibodies and that the tolerant state was characterized by the presence of Tregs as well as blood MDSCs (9). Since MDSCs can also be found in naive and in syngeneic transplant recipients, we aimed at identifying possible differences in MDSCs from tolerant animals. We therefore performed a transcriptome analysis of blood MDSCs from recipient rats tolerating an allograft for more than 3 months or from rat recipients of a syngeneic graft. A total of 10,735 transcripts were detected in MDSCs by microarray analysis and the expression level of 525 of them was significantly different between the two groups (full data are available on the Gene Expression Omnibus web-based data repository, under the GEO accession number GSE28545). *Bcl2l12*, a gene with an assigned anti-apoptotic function, was up-regulated more than 3-fold whereas *Dapk2*, an apoptosis inducing gene, was down-regulated 19-fold in MDSCs from tolerant recipients as compared to MDSCs from syngeneic recipients (Table 1). *Lax1*, a negative regulator of cell differentiation, was also strongly up-regulated whereas *Lat*, a gene known to positively regulate cell activation in T lymphocytes, was down-regulated more than 40-fold (Table 1). Additional analyses of these genes by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), using independent samples, confirmed these gene expression variations for *Bcl2l12*, *Dapk2* and *LAT* (Figure 1, A-C). The over-expression of *Lax1* was not confirmed in all tested samples (Supplementary Figure 1). *BarH11*, another anti-apoptotic gene was found to be up-regulated in the microarray data but this could not be confirmed by qRT-PCR (data not shown).

Lower expression of CCL5 in MDSCs and plasma of tolerant animals.

The most striking differential expression was for *CCL5*, which presented a 166-fold down-regulation in MDSCs from tolerant rats (Table 1). qRT-PCR analyses on RNA extracts from independent experiments confirmed that MDSCs from tolerant rats contained significantly less *CCL5* transcripts than MDSCs from rats grafted with syngeneic kidneys (Figure 1D). A reduction in *CCL5* was also evident in the plasma at the protein level. *CCL5* measurement by ELISA in the plasma of syngeneic and tolerant rats showed a 2-fold decrease (0.60 ± 0.17 vs. 1.17 ± 0.48 ng/ml; $p < 0.01$) in tolerant rats, whereas no differences were observed between naive and syngeneic animals (Figure 2A). In order to understand if the decrease in plasma *CCL5* protein could be attributed to a lower synthesis by blood MDSCs, we examined the

relative mRNA expression of CCL5 in total blood cells depleted of MDSCs by qRT-PCR. These “MDSC-depleted” blood cells expressed similar levels of CCL5 transcripts in tolerant recipients and in syngeneic recipients (Figure 2B). These data suggested at least a participation of MDSCs in the reduced CCL5 protein level in the plasma of tolerant rats.

In order to understand whether the reduced levels of CCL5 is a general feature associated with transplant tolerance in the rat, or is specific for the kidney transplant model used here, we assessed levels of CCL5 in plasma in a heart graft model in the same LEW.1W to LEW.1A rat strains combination, where tolerance was induced by pre-transplant administration of donor-specific blood transfusions (DST) (33). In these samples, however, no difference could be detected between plasma from tolerant heart graft recipients and age-matched recipients of syngeneic heart grafts (Figure 2A).

Graft to periphery CCL5 gradient and Treg localization.

In solid tumors, over-expression of CCL5 by tumor cells leads to the preferential recruitment of Tregs and the establishment of local immunosuppression (24, 25). To assess whether an analogous situation might exist in transplantation and participate in the localization of Treg cells in tolerated allografts, we performed qRT-PCR on RNA samples from kidney grafts. We found an increase in CCL5 mRNA expression in tolerated allografts relative to syngeneic grafts (Figure 3A). At the protein level, slightly more CCL5 protein could be extracted from tolerated allogeneic kidney grafts than from syngeneic kidney grafts (Figure 3B). Comparing CCL5 local concentration within the graft (measured by extracting total protein and measuring concentrations reported to volume) and concentration in the plasma (shown in Figure 2A) revealed that about 20-fold more CCL5 was present in normal kidneys than in plasma. For syngeneic kidney grafts, the ratio was about 30:1. For tolerated allografts, it was as high as 65:1 (Figure 3C).

Messenger RNA levels of CCR5 (CCL5 receptor expressed on T cells) and Foxp3 were also higher in tolerated kidney allografts (Figure 4A, B). Consistent with these data, using immunofluorescence we observed a strong infiltration of tolerated kidney allografts by TCR β^+ Foxp3 $^+$ Tregs that was greater than that seen at rejection (Figure 4). Thus, the increased differential between intragraft and plasma levels of CCL5 correlated with the localization of Tregs in tolerated allografts. To explore whether the enhanced graft-to-periphery gradient of CCL5 might influence intragraft localization of Tregs in our experimental model, we aimed at restoring the physiological plasma concentration of CCL5 in tolerant recipients of kidney allografts by intraperitoneal implantation of osmotic mini-pumps

filled with recombinant rat CCL5 (rCCL5) delivering 14 µg/kg/day over at least 14 days. Assessment of plasma CCL5 concentration showed that osmotic pump implantation indeed increased plasma levels from 670 pg/ml to approximately 1800 pg/ml within two weeks. In recipients of syngeneic kidney grafts, pump implantation also raised the titer from 1500 to 3000 ng/ml (Supplementary Figure 2). After one month, kidney graft function started to decline (see next paragraph). Animals were then euthanized for transplant analyses. No difference was observed in CCL5 mRNA expression between tolerant grafts treated or not with rCCL5 (Figure 3A). Interestingly, mRNA levels of CCR5 and Foxp3 were reduced in tolerated grafts after systemic rCCL5 administration (Figure 4A, B). By immunofluorescence, we also observed a decrease in intragraft TCRβ⁺Foxp3⁺ Treg infiltration after systemic rCCL5 administration (Figure 5 and Table 2). In another grafted animal, instead of using an osmotic pump, we gave CCL5 by i.p. administration of 1.5µg/Kg soluble protein twice daily for 21 days. This also induced similar findings in kidney biopsies at one month (Supplementary Figure 3).

CCL5 administration controls kidney transplant tolerance.

It has been demonstrated that Treg localization in the graft is required for induction and maintenance of transplant tolerance in the rat (34, 35). To further understand the impact of rCCL5 administration and reduction of intragraft infiltration by Tregs on transplant tolerance, we monitored graft function. First, we investigated the role of rCCL5 in the tolerance induction phase. Implantation of osmotic pumps delivering rCCL5 in addition to the anti-CD28 antibody based tolerance induction regimen prevented tolerance induction of kidney allografts, whereas monotherapy with anti-CD28 antibody induced long-term survival over at least 4 months (Figure 6A). Kidney graft function (assessed by measurement of creatinemia) also decreased in the bitherapy group (Figure 6B), indicating a rejection of the transplanted kidney in these animals. Measurement of plasma urea concentration confirmed these data (Supplementary Figure 4A). Administration of rCCL5 to rats transplanted with syngeneic kidneys had no incidence on survival, creatinine (Figure 6A, B) or urea (Supplementary Figure 4A). Second, we studied the effect of rCCL5 administration in established tolerance. Implantation of osmotic pumps delivering rCCL5 starting from 120 days after transplantation led to kidney graft rejection arising after about 50 days (Figure 6C). This rejection was confirmed by measurement of plasma creatinemia (Figure 6D) and urea (Supplementary Figure 4B). Thus, rCCL5 administration abrogated kidney transplant tolerance during the induction and maintenance phases. Together, these data suggest that

increasing peripheral levels of CCL5 impacted intra-graft localization of Tregs and inhibited transplant tolerance.

In contrast, in the heart allotransplant model in the same rat strain combination, where tolerance is induced by pre-transplant administration of donor-specific blood transfusions (DST) (33), implantation of CCL5-delivering osmotic pumps for over a month did not brake established tolerance (Supplementary Figure 5).

Discussion

We previously reported on the role of peripheral MDSCs in the maintenance of kidney transplant tolerance in the rat mainly acting through the inducible nitric oxide enzyme (9). Although we noticed a synergy between MDSC and Treg cells to suppress effector T cells, it was not clear how these two cell types cooperated *in vivo*. Also, since MDSCs from tolerant animals actually presented similar suppressive activities *ex-vivo* when compared with control MDSCs, the extent to which MDSCs from both origins differed from each other was unclear. Here, we showed that the expression of several genes is significantly different between MDSCs from tolerant kidney graft recipients when compared to recipients of syngeneic grafts. Microarray analyses revealed two interesting features that could shed light on our previous results. First, the expression of LAT (for linker of activated T cells), a gene coding for a transmembrane adaptor protein (36), was significantly down-regulated in MDSC from tolerant recipients. LAT is known to be expressed in thymocytes, mature T cells, NK cells, mast cells, megakaryocytes, and pre-B cells (37-39) and is an essential regulator of cell activation, terminal differentiation (40) and maturation (41). The expression of LAT by MDSCs had, to our knowledge, not been reported previously. Conversely, LAX1 (for lymphocyte transmembrane adaptor 1, also called LAX, linker of X cells), a gene expressed in B, T, NK cells and monocytes, which negatively regulates TCR signaling in T cells (42), appeared strongly up-regulated in the microarray data in MDSC from tolerant animals and a tendency for an over-expression could be confirmed by Q-PCR from independent samples. Since MDSCs are a heterogeneous population of immature cells that lose their suppressive function after maturation, the under-expression of a maturation factor such as LAT and the possible over-expression of a negative regulator are two expected observations. It is possible that these factors play a role in the repression of MDSC maturation in tolerant animals, but further experiments will be needed to confirm this hypothesis.

The second feature was the modification in the expression of genes involved in apoptosis. Messenger RNA for Bcl2l12 and BarH11 (an anti-apoptotic gene mainly described in neurons (43)) were up-regulated three-fold in MDSCs from tolerant animals, according to the microarray data. However, only the up-regulation of Bcl2l12 could be confirmed by qRT-PCR from independent samples. Bcl2l12 is an anti-apoptotic gene member of the Bcl2 (B-cell /lymphoma2) family of apoptosis-related genes (44). In addition, messenger RNA for Dapk2 (Death-associated protein kinase 2) was down-regulated in MDSCs from tolerant animals and this was confirmed by qRT-PCR. The Dapk2 gene belongs to the serine/threonine protein

kinase family that functions as a positive regulator of apoptosis (45). Again, the upregulation of an anti-apoptotic gene and down-regulation of a pro-apoptotic gene in MDSCs from tolerant animals is compatible with their previously reported accumulation in tolerant animals (9), but a link between these observations would need further investigation.

In parallel, we observed that CCL5 was strongly repressed in MDSCs from tolerant recipients, and this was confirmed by qRT-PCR. In addition, we found reduced levels of the CCL5 protein in the plasma of tolerant animals. CCL5 is a chemokine expressed commonly in inflammatory environments. It has a described immunomodulatory role in cancer, is also expressed and secreted in kidney glomeruli (46) and has been associated with renal transplant rejection or, alternatively, to long-term function (47, 48). Here, CCL5 mRNA was found to be up-regulated long-term post transplantation (our experiments were performed 3 to 4 months post-transplantation) in tolerant kidney allografts as compared to syngeneic kidney grafts (Figure 3A). This over-expression might reflect a sustained inflammatory environment in tolerated kidney allografts, in spite of normal kidney function and indefinite allograft acceptance. In these allografts, it is possible that expression of CCL5 resulted in the attraction of Tregs from peripheral blood, and this might be amplified by the 2-fold decrease in plasmatic CCL5 concentration. The decrease in plasma CCL5 might be caused by a reduced production by MDSCs, since CCL5 expression by other blood cell types than MDSC was not reduced (Figure 2B). However, we cannot exclude the possibility that endothelial cells (49) and platelets (50), which also produce CCL5 in inflammatory conditions, significantly contribute to the regulation of plasma concentrations of CCL5. Another question was whether the plasma decrease in CCL5 is a general feature of transplant tolerance in the rat model. Our observation was that tolerance induction to a heart allograft in the same rat strain combination, induced by donor-specific transfusions (33), did not result in modifications of the plasma levels CCL5. Interestingly, in this heart allograft model, no implication of MDSCs was reported. Therefore it is possible that the peripheral repression of CCL5 synthesis in the rat is a feature associated with kidney transplantation and with a role of MDSC in transplant tolerance.

Another question was how CCL5 potentially regulates transplant tolerance. Similar to the situation known in solid tumours (2, 3) we speculated that the chemokine CCL5 can recruit into the graft, Tregs that preferentially express the CCL5 receptor CCR5 (25). However, CCR5 is also expressed in macrophages, activated and memory T cells, monocytes and NK

cells, and it is not clear why Tregs should be preferentially recruited. The fact that CCR5-blockade by antagonist antibodies or CCR5-deficiency in mice prolonged graft survival (51, 52) indeed indicated the importance of this receptor for the acute action of effector cells. Here, kidney allograft biopsies showed a strong infiltration by TCR β ⁺ T cells with a high percentage of TCR β ⁺Foxp3⁺ Tregs in tolerized allografts and a lower percentage during rejection (Figure 5 and Table 2). In parallel, CCR5 and FoxP3 messenger RNA were found to be elevated in tolerant allografts (Figure 4A, B). Together, our analyses indicated that in tolerant kidney allografts, the majority of infiltrating T cells are Tregs, whereas in rejected kidney allograft Tregs represent a small percentage of the overall infiltrate. Other infiltrating cells in this model are composed of macrophages, activated and memory T cells, monocytes or NK cells that are involved in the rejection process (17). The hypothesis that Tregs migrate to the tolerated allograft as a consequence of a blood-to-graft CCL5 gradient is compatible with our observations that restoring normal CCL5 plasma levels led to a strong reduction in intragraft TCR β ⁺Foxp3⁺ Treg infiltration and of Foxp3 mRNA expression, to an increase in creatinine and urea concentrations, and ultimately to kidney graft rejection. It is unlikely that administration of rCCL5 directly altered kidney graft function itself since rats transplanted with syngeneic kidneys and receiving rCCL5 did not present kidney dysfunction. This control group indicated that a pro-inflammatory action of CCL5 was not directly involved in changes in creatinine and urea levels. In the literature, the impact of systemic CCL5 on graft outcomes is twofold: high CCL5 chemokine plasma levels were observed in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure (53). In addition, CCL5 antagonists were shown to significantly attenuated the inflammatory response and delayed heart (54) and kidney (26, 27) allograft rejection in mice. After liver transplantation, however, high early systemic CCL5 levels were reported to play a protective role in immunological recognition leading to immune tolerance (55). Therefore, it is possible that CCL5 presents inflammatory as well as tolerogenic properties, depending on many environmental factors.

We observed a reduction in long-term CCL5 plasma levels post transplantation after application of a tolerizing regimen based on the administration of a modulating anti-CD28 antibody. CD28 antagonist antibodies have been used in several other transplant models in rodents and in primates and are thought to induce tolerance by selectively preventing CD28-mediated signals while preserving CTLA-4-mediated regulatory signals and consequently by inducing Tregs (32, 56). In the heart allograft tolerance model induced by pre-transplant DST,

where intragraft Tregs were also reported (35), we detected no modification in blood CCL5, and administration of rCCL5 had no effect on heart graft survival. Establishment of a graft-to-periphery CCL5 gradient might therefore be dispensable for intragraft localization of Tregs after cardiac transplantation and might represent a special feature of our kidney transplant model. Indeed Treg trafficking can also be controlled by other chemokines with redundant activities, such as CCL2, 3, 4, 7, 13 and 22 (57). For example, analysis of multiple chemokine pathways in a murine cardiac allograft model showed that recruitment of Treg and tolerance were dependent on the intragraft up-regulation of CCR4 and one of its ligands, CCL22 (58).

In summary, our study shows that in the anti-CD28 antibody tolerance induction model, peripheral MDSCs repress *CCL5* gene expression in tolerant kidney graft recipients, which contributes to the establishment of a graft-to-periphery gradient. This phenomenon contributes to the recruitment of Tregs to the graft where they maintain tolerance. This novel role of MDSC in transplant tolerance might synergize with the suppressive action these cells directly exert on effector T cells, and contribute to long-term maintenance of tolerance. Our observations warrant further research to understand whether similar mechanisms can operate in other transplant models and in humans.

Acknowledgements

The authors thank Philippe Hulin from the IFR26 MicroPICell imaging platform (Nantes, France) for advice about confocal-like microscopy and Emmanuel Merieau (INSERM UMR643, Nantes, France) for animal care. We are grateful to Richard Danger for his contribution to DNA chip data management.

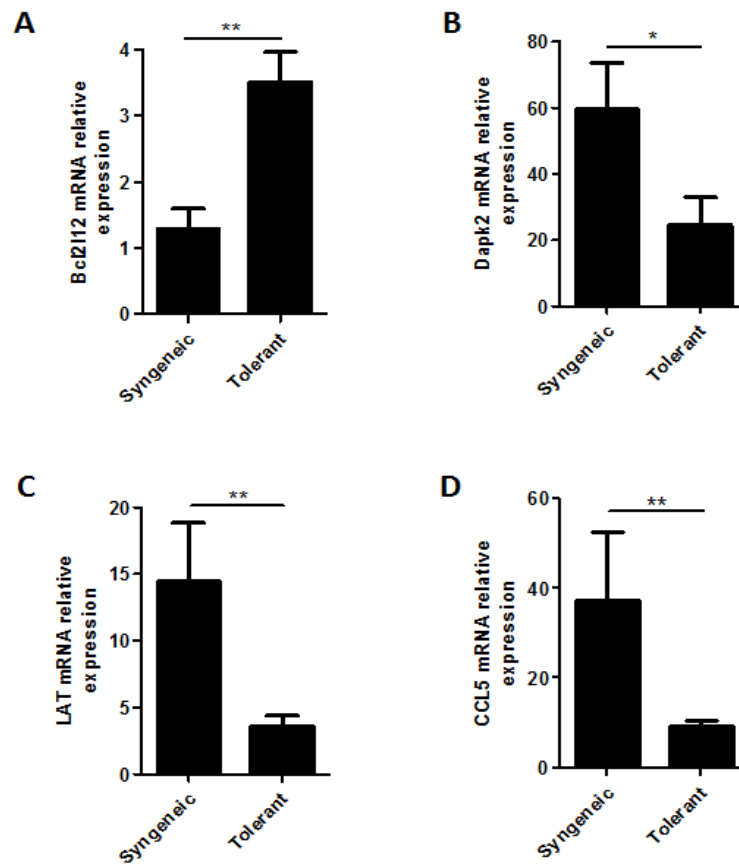
References

- Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162-174.
- Bronte, V., P. Serafini, E. Apolloni, and P. Zanovello. 2001. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *J Immunother (1997)* 24:431-446.
- Serafini, P., I. Borrello, and V. Bronte. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16:53-65.
- Dilek, N., N. van Rompaey, A. Le Moine, and B. Vanhove. 2010. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.*
- Boros, P., J. C. Ochando, S. H. Chen, and J. S. Bromberg. 2010. Myeloid-derived suppressor cells: natural regulators for transplant tolerance. *Hum Immunol* 71:1061-1066.
- Bronte, V., P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, V. Tosello, A. Mazzoni, D. M. Segal, C. Staib, M. Lowel, G. Sutter, M. P. Colombo, and P. Zanovello. 2003. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 170:270-278.
- Bronte, V., and P. Zanovello. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5:641-654.
- Mazzoni, A., V. Bronte, A. Visintin, J. H. Spitzer, E. Apolloni, P. Serafini, P. Zanovello, and D. M. Segal. 2002. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* 168:689-695.
- Dugast, A. S., T. Haudebourg, F. Coulon, M. Heslan, F. Haspot, N. Poirier, R. Vuillefroy de Silly, C. Usal, H. Smit, B. Martinet, P. Thebault, K. Renaudin, and B. Vanhove. 2008. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 180:7898-7906.
- Nagaraj, S., K. Gupta, V. Pisarev, L. Kinarsky, S. Sherman, L. Kang, D. L. Herber, J. Schneck, and D. I. Gabrilovich. 2007. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 13:828-835.
- Corzo, C. A., M. J. Cotter, P. Cheng, F. Cheng, S. Kusmartsev, E. Sotomayor, T. Padhya, T. V. McCaffrey, J. C. McCaffrey, and D. I. Gabrilovich. 2009. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 182:5693-5701.
- Srivastava, M. K., P. Sinha, V. K. Clements, P. Rodriguez, and S. Ostrand-Rosenberg. 2010. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res* 70:68-77.
- Hanson, E. M., V. K. Clements, P. Sinha, D. Ilkovitch, and S. Ostrand-Rosenberg. 2009. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 183:937-944.
- Wood, K. J., and S. Sakaguchi. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3:199-210.
- Adeegbe, D., P. Serafini, V. Bronte, A. Zoso, C. Ricordi, and L. Inverardi. 2010. In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4+Foxp3+ T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. *Cell Transplant.*
- Zhou, Z., D. L. French, G. Ma, S. Eisenstein, Y. Chen, C. M. Divino, G. Keller, S. H. Chen, and P. Y. Pan. 2010. Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 28:620-632.
- Haspot, F., C. Seveno, A. S. Dugast, F. Coulon, K. Renaudin, C. Usal, M. Hill, I. Anegon, M. Heslan, R. Josien, S. Brouard, J. P. Soulillou, and B. Vanhove. 2005. Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR Class II B7 Regulatory Cells. *Am J Transplant* 5:2339-2348.
- Yu, J., X. Ren, F. Yan, H. Li, S. Cao, Y. Chen, H. Sun, X. An, N. Zhang, and X. Hao. 2011. Alloreactive natural killer cells promote haploidentical hematopoietic stem cell transplantation by expansion of recipient-derived CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *Transpl Int* 24:201-212.
- Hadeiba, H., T. Sato, A. Habtezion, C. Oderup, J. Pan, and E. C. Butcher. 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 9:1253-1260.
- Ochando, J. C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S. A. Lira, G. J. Randolph, and J. S. Bromberg. 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid

- dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7:652-662.
21. Ouabed, A., F. X. Hubert, D. Chabannes, L. Gautreau, M. Heslan, and R. Josien. 2008. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J Immunol* 180:5862-5870.
 22. Sharma, M. D., B. Baban, P. Chandler, D. Y. Hou, N. Singh, H. Yagita, M. Azuma, B. R. Blazar, A. L. Mellor, and D. H. Munn. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:2570-2582.
 23. Mahnke, K., T. S. Johnson, S. Ring, and A. H. Enk. 2007. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *J Dermatol Sci* 46:159-167.
 24. Adler, E. P., C. A. Lemken, N. S. Katchen, and R. A. Kurt. 2003. A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5). *Immunol Lett* 90:187-194.
 25. Tan, M. C., P. S. Goedegebuure, B. A. Belt, B. Flaherty, N. Sankpal, W. E. Gillanders, T. J. Eberlein, C. S. Hsieh, and D. C. Linehan. 2009. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 182:1746-1755.
 26. Grone, H. J., C. Weber, K. S. Weber, E. F. Grone, T. Rabelink, C. M. Klier, T. N. Wells, A. E. Proudfoot, D. Schlondorff, and P. J. Nelson. 1999. Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J* 13:1371-1383.
 27. Grone, H. J., C. Weber, K. S. Weber, E. F. Grone, C. M. Klier, T. N. Wells, A. E. Proudfoot, D. Schlondorff, and P. J. Nelson. 1999. [Reduction of acute kidney transplantation rejection by the chemokine receptor antagonist Met-RANTES]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 83:205-211.
 28. Stojanovic, T., J. Bedke, H. J. Grone, A. E. Proudfoot, H. Becker, P. Markus, and M. Hecker. 2002. Met-RANTES inhibition of mucosal perfusion failure in acute intestinal transplant rejection - role of endothelial cell-leukocyte interaction. *J Vasc Res* 39:51-58.
 29. Song, E., H. Zou, Y. Yao, A. Proudfoot, B. Antus, S. Liu, L. Jens, and U. Heemann. 2002. Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 61:676-685.
 30. Yun, J. J., D. Whiting, M. P. Fischbein, A. Banerji, Y. Irie, D. Stein, M. C. Fishbein, A. E. Proudfoot, H. Laks, J. A. Berliner, and A. Ardehali. 2004. Combined blockade of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 attenuates chronic rejection. *Circulation* 109:932-937.
 31. Soullillou, J. P., C. B. Carpenter, A. J. d'Apice, and T. B. Strom. 1976. The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J Exp Med* 143:405-421.
 32. Dengler, T. J., G. Szabo, B. Sido, W. Nottmeyer, R. Zimmerman, C. F. Vahl, T. Hunig, and S. C. Meuer. 1999. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 67:392-398.
 33. Josien, R., P. Douillard, C. Guillot, M. Müschen, I. Anegon, J. Chetritt, S. Menoret, C. Vignes, J. P. Soullillou, and M. C. Cuturi. 1998. A critical role for transforming growth factor- β in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J. Clin. Invest.* 102:1920.
 34. Abe, Y., H. Urakami, D. Ostanin, G. Zibari, T. Hayashida, Y. Kitagawa, and M. B. Grisham. 2009. Induction of Foxp3-expressing regulatory T-cells by donor blood transfusion is required for tolerance to rat liver allografts. *PLoS One* 4:e7840.
 35. Haudebourg, T., A. S. Dugast, F. Coulon, C. Usal, F. Triebel, and B. Vanhove. 2007. Depletion of LAG-3 positive cells in cardiac allograft reveals their role in rejection and tolerance. *Transplantation* 84:1500-1506.
 36. Fuller, D. M., and W. Zhang. 2009. Regulation of lymphocyte development and activation by the LAT family of adaptor proteins. *Immunol Rev* 232:72-83.
 37. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92:83-92.
 38. Su, Y. W., and H. Jumaa. 2003. LAT links the pre-BCR to calcium signaling. *Immunity* 19:295-305.
 39. Facchetti, F., J. K. Chan, W. Zhang, A. Tironi, M. Chilosi, S. Parolini, L. D. Notarangelo, and L. E. Samelson. 1999. Linker for activation of T cells (LAT), a novel immunohistochemical marker for T cells, NK cells, mast cells, and megakaryocytes: evaluation in normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 154:1037-1046.
 40. Nunez-Cruz, S., E. Aguado, S. Richelme, B. Chetaille, A. M. Mura, M. Richelme, L. Pouyet, E. Jouvin-Marche, L. Xerri, B. Malissen, and M. Malissen. 2003. LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol* 4:999-1008.
 41. Zhang, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. DeJarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, H. C. Tsay, H. M. Jacobs, C. M. Kessler, E. O. Long, P. E. Love, and L. E. Samelson. 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10:323-332.
 42. Zhu, M., E. Janssen, K. Leung, and W. Zhang. 2002. Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. *J Biol Chem* 277:46151-46158.
 43. Li, S., and M. Xiang. 2006. Barhl1 is required for maintenance of a large population of neurons in the zonal layer

- of the superior colliculus. *Dev Dyn* 235:2260-2265.
44. Thomadaki, H., and A. Scorilas. 2006. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43:1-67.
 45. Bovellan, M., M. Fritzsche, C. Stevens, and G. Charras. 2010. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: blebbing in programmed cell death. *FEBS J* 277:58-65.
 46. Pocock, J., C. Gomez-Guerrero, S. Harendza, M. Ayoub, P. Hernandez-Vargas, G. Zahner, R. A. Stahl, and F. Thaiss. 2003. Differential activation of NF-kappa B, AP-1, and C/EBP in endotoxin-tolerant rats: mechanisms for in vivo regulation of glomerular RANTES/CCL5 expression. *J Immunol* 170:6280-6291.
 47. Pattison, J., P. J. Nelson, P. Huie, I. von Leutichau, G. Farshid, R. K. Sibley, and A. M. Krensky. 1994. RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet* 343:209-211.
 48. Dikow, R., L. E. Becker, M. Schaier, R. Waldherr, M. L. Gross, and M. Zeier. 2010. In renal transplants with delayed graft function chemokines and chemokine receptor expression predict long-term allograft function. *Transplantation* 90:771-776.
 49. deMartin, R., B. Vanhove, Q. Cheng, E. Hofer, V. Czismadia, H. Winkler, and F. H. Bach. 1993. Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an IkbA-like gene is regulated by NFkB. *EMBO J* 7:2773-2779.
 50. Kameyoshi, Y., A. Dorschner, A. I. Mallet, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1992. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176:587-592.
 51. Nelson, P. J., and A. M. Krensky. 2001. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity* 14:377-386.
 52. Zhao, Q. 2010. Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 88:41-55.
 53. Corsi, M. M., G. Leone, A. Fulgenzi, K. Wasserman, F. Leone, and M. E. Ferrero. 1999. RANTES and MCP-1 chemokine plasma levels in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure. *Clin Biochem* 32:455-460.
 54. Vassalli, G., E. Simeoni, J. P. Li, and S. Fleury. 2006. Lentiviral gene transfer of the chemokine antagonist RANTES 9-68 prolongs heart graft survival. *Transplantation* 81:240-246.
 55. Schenk, M., A. Zipfel, C. Schulz, H. D. Becker, and R. Viebahn. 2000. RANTES in the postoperative course after liver transplantation. *Transpl Int* 13 Suppl 1:S147-149.
 56. Poirier, N., A. M. Azimzadeh, T. Zhang, N. Dilek, C. Mary, B. Nguyen, X. Tillou, G. Wu, K. Reneaudin, J. Hervouet, B. Martinet, F. Coulon, E. Allain-Launay, G. Karam, J. P. Soullillou, R. N. Pierson, 3rd, G. Blanco, and B. Vanhove. 2010. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med* 2:17ra10.
 57. Wei, S., I. Kryczek, and W. Zou. 2006. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108:426-431.
 58. Lee, I., L. Wang, A. D. Wells, M. E. Dorf, E. Ozkaynak, and W. W. Hancock. 2005. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med* 201:1037-1044.

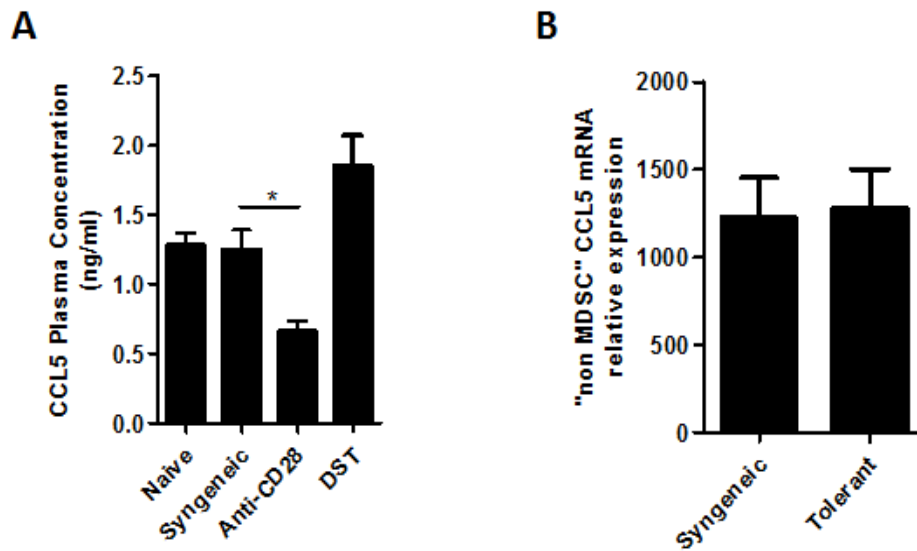
Figure 1



MDSC gene expression assessment by qRT-PCR.

MDSCs from rat recipients of kidney grafts were purified from blood for RNA extraction. **A-D:** qRT-PCR was performed to assess expression of Bcl2l12 (Syngeneic, n=9; tolerant, n=12), Dapk2 (Syngeneic, n=7; tolerant, n=7), LAT (Syngeneic, n=9; tolerant, n=9) and CCL5 (Syngeneic, n=6; tolerant, n=10). *, p<0.05; **, p<0.01.

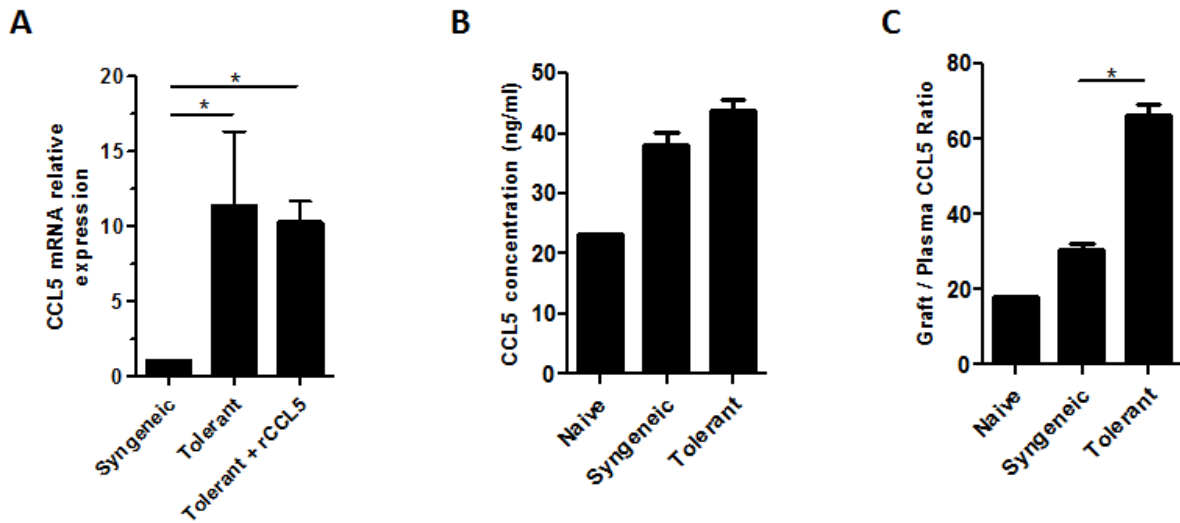
Figure 2



Lower plasma CCL5 in tolerance and role of MDSC.

(A) Quantification of CCL5 protein levels by ELISA in plasma of non-grafted rats (n=7), recipients of syngeneic kidney grafts (n=9), recipients of kidney allografts tolerized by injection of anti-CD28 antibodies (n=11) or recipients of heart allografts tolerized by pre-transplant donor-specific transfusions (n=4). Measurements were performed 3 months post-transplantation. (B) Quantification by qRT-PCR of CCL5 mRNA in white blood cells from which MDSCs were removed ("non-MDSC" cells), prepared from syngeneic (n=3) and tolerant (n=4) recipients of kidney allografts. *, p<0.05.

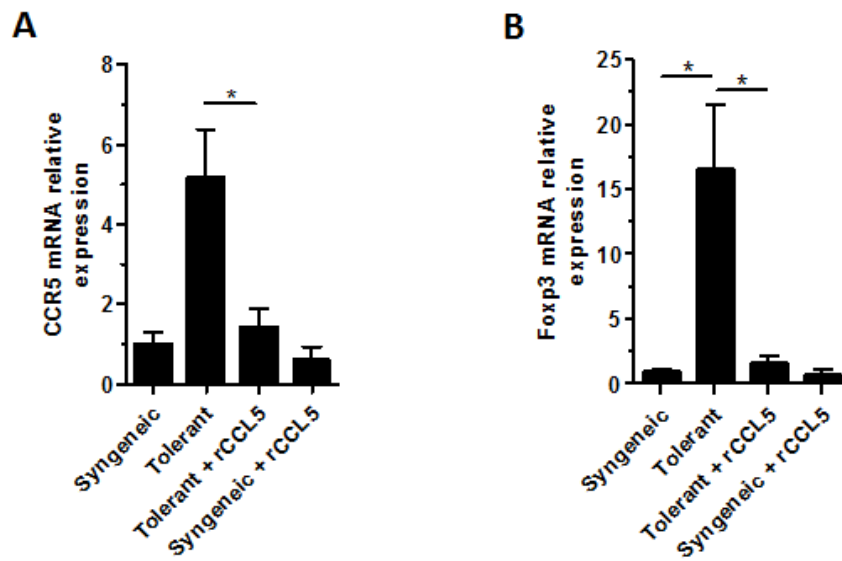
Figure 3



Intragraft CCL5 expression.

(A) qRT-PCR measurement of CCL5 mRNA in kidney grafts 3 months post-transplantation, from either syngeneic recipients (Syngeneic, n=3), allogeneic recipients with the tolerizing protocol (Tolerant, n=11) or allogeneic recipients with the tolerizing protocol plus implantation of osmotic pumps delivering rCCL5 (analyses 30 days post-implantation; Tolerant + rCCL5, n=3). (B) Kidneys from naive LEW.1A rats or kidney grafts from either syngeneic recipients (Syngeneic, n=3) or allogeneic recipients with the tolerizing protocol (Tolerant, n=3) were collected 3 months post-transplantation and homogenized for the evaluation of local CCL5 protein concentration. Concentration is expressed in ng/volume of kidney. (C) Ratios were calculated between the expression level of CCL5 protein in the kidney (Naïve) or kidney grafts from syngeneic recipients (Syngeneic) or allogeneic recipients with the tolerizing protocol (Tolerant) and levels in the corresponding plasma. Ratios were calculated from data shown in Figures 2A and 3B. *, p<0.05.

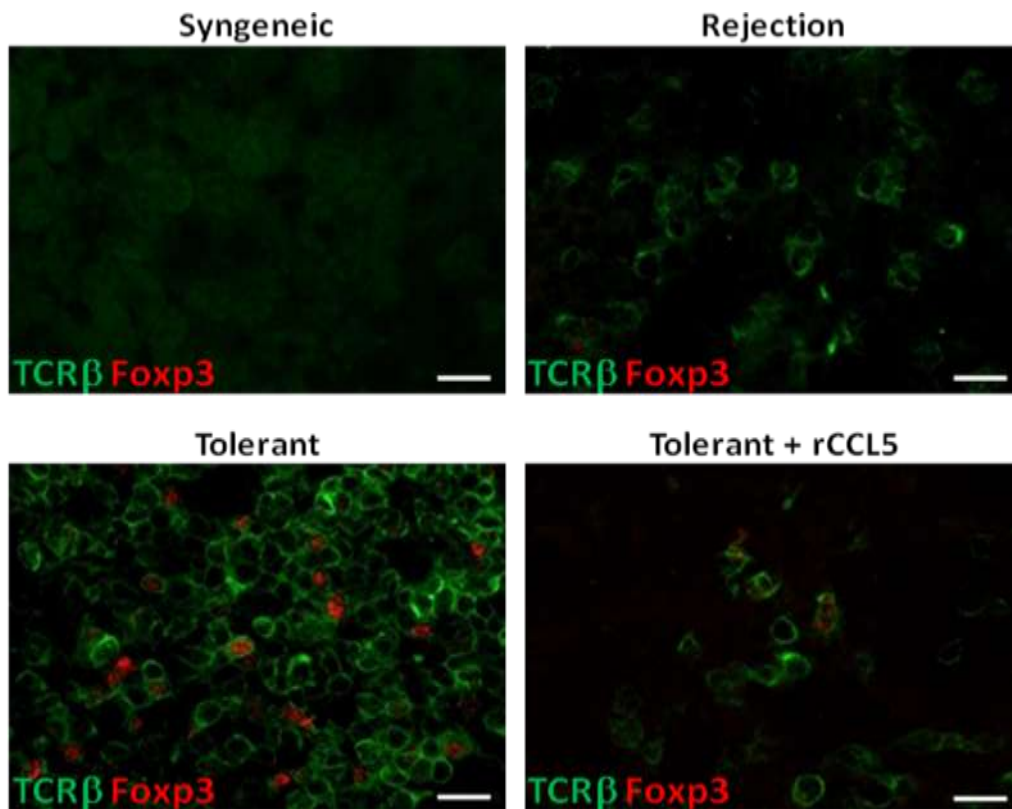
Figure 4



Intragraft CCR5 and Foxp3 mRNA expression

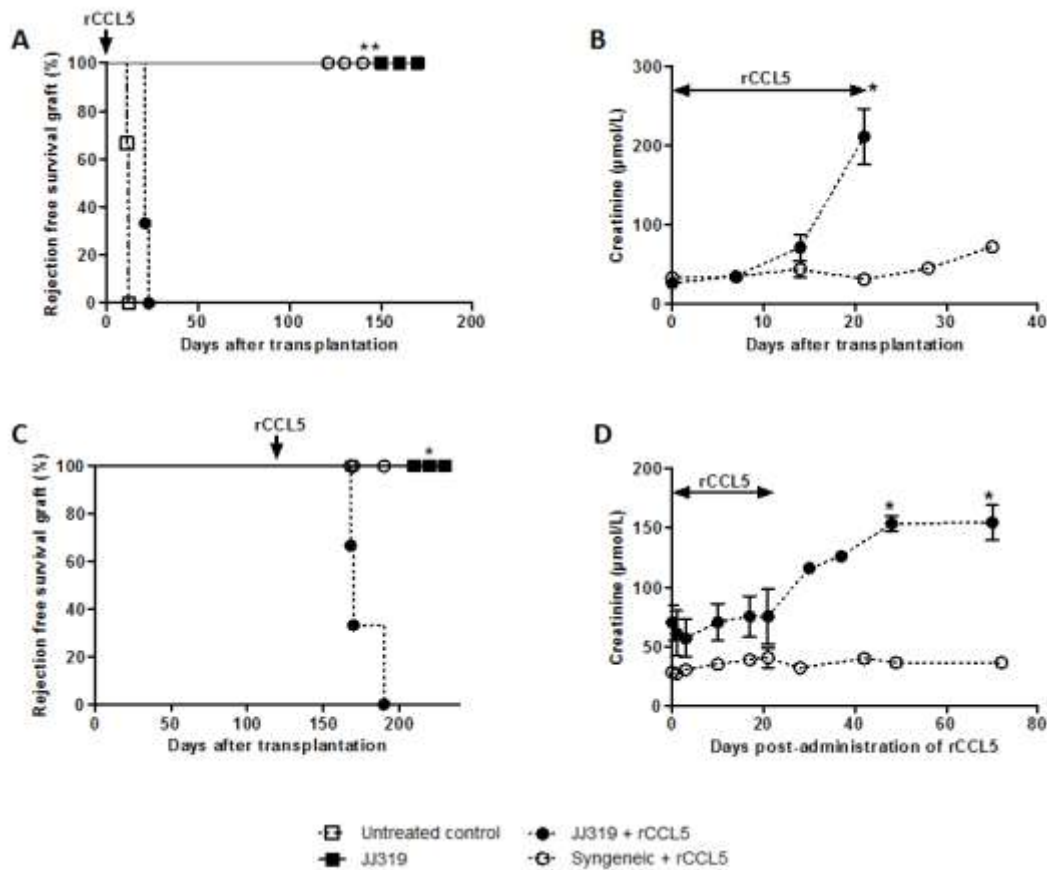
qRT-PCR measurement of CCR5 (A) and Foxp3 (B) mRNA transcripts in kidney grafts collected 3 to 4 months post-transplantation from recipients of syngeneic grafts (n=3) or tolerant recipients of allografts (n=11). Quantification was also performed 1 month after treatment with rCCL5 in recipients of syngeneic grafts (n=2) or tolerant recipients of allografts (n=3). *, p<0.05.

Figure 5

**Increased Treg infiltration in tolerated kidney allografts.**

Confocal-like immunofluorescence microscopy analysis of kidney grafts from recipients of syngeneic grafts, recipients of tolerated allografts (anti-CD28 antibody treatment) or from recipients of tolerated allografts after treatment with rCCL5-delivering osmotic pumps. Analyses were performed 3 to 4 months post-transplantation. A rejected kidney allograft implanted in an untreated recipient is also shown. In that case, analyses were performed on day 7 post-transplantation. Pictures are representative of 3 to 5 experiments. Green color, TCR β staining; red color, Foxp3 staining. Scale bar: 15 μ m.

Figure 6



Recombinant rat CCL5 *in vivo* prevents induction of tolerance and brakes established tolerance.

(A) Kidney allograft survival in untreated rats (Untreated controls; $n = 3$) or in rats treated with the modulating anti-CD28 JJ319 antibody (JJ319; $n = 5$) or with the same regimen plus the implantation of an osmotic pump delivering $14 \mu\text{g/kg/day}$ rCCL5 for 14 days (JJ319 + rCCL5; $n=3$) or in rats grafted with a syngeneic kidney graft plus rCCL5 infusion (Syngeneic + rCCL5; $n=3$). (B) Kidney function assessed once a week for 28 days by creatinemia measurement in JJ319 + rCCL5 ($n=3$) and syngeneic + rCCL5 ($n=3$) recipients. (C) Kidney allograft survival in recipient rats with established tolerance to a kidney allograft ($n=5$) or in similar animals receiving an osmotic pump delivering rCCL5 ($14 \mu\text{g/kg/day}$) at 120 days post-transplantation ($n=3$). Rat recipients of syngeneic grafts receiving the same rCCL5 administration at 120 days post-transplantation are also shown (Syngeneic + rCCL5; $n=3$). (D) Kidney function assessed once a week for 28 days by creatinemia measurement in JJ319 + rCCL5 ($n=3$) and syngeneic + rCCL5 ($n=3$) recipients after implantation of osmotic pumps filled with rCCL5, 120 days post transplantation. *, $p<0.05$. **, $p<0.01$.

Table 1

| Probe_ID | Gene Symbol | Genbank Function | Fold change (MDSC tolerant/MDSC syngeneic) | p |
|----------|-------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|
| 21677917 | Lax1 | Negative regulation of T and B cell activation | 20.261 | 0.032 |
| 22327267 | Bcl2l12 | Inhibition of apoptosis | 3.507 | 0.001 |
| 21322364 | Banhl1 | Inhibition of apoptosis | 3.214 | 0.041 |
| 21998913 | Dapk2 | Induction of apoptosis | 0.053 | 0.01 |
| 20872514 | Lat | Positive regulation of T cell activation/differentiation | 0.022 | 0.006 |
| 20896278 | Ccl5 | Signaling molecule / Chemotactic chemokine | 0.006 | 0.001 |

Microarray data analysis of MDSCs from tolerant recipients of kidney allografts compared with MDSC from recipients of syngeneic grafts.

The top six up-regulated and down-regulated genes (MDSC Tolerant/MDSC syngeneic) are shown. Full microarray data are available on the Gene Expression Omnibus web-based data repository, under the GEO accession number GSE28545.

Table 2

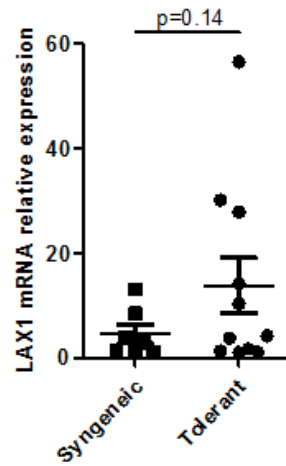
| Group | Time post-transplant | TCRβ | Foxp3 |
|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|
| Rejection | 12 days | +++ | + |
| Syngeneic | 3 months | - | - |
| Tolerant | 3 months | +++ | +++ |
| Tolerant + rCCL5 | 3 months | +++ | + |

Quantification of kidney biopsy infiltration by TCR β ⁺, Foxp3⁺ cells (from Figure 5).

A grading system representing no infiltration (-) to a mild (+), medium (++) or heavy (+++) infiltration was used.

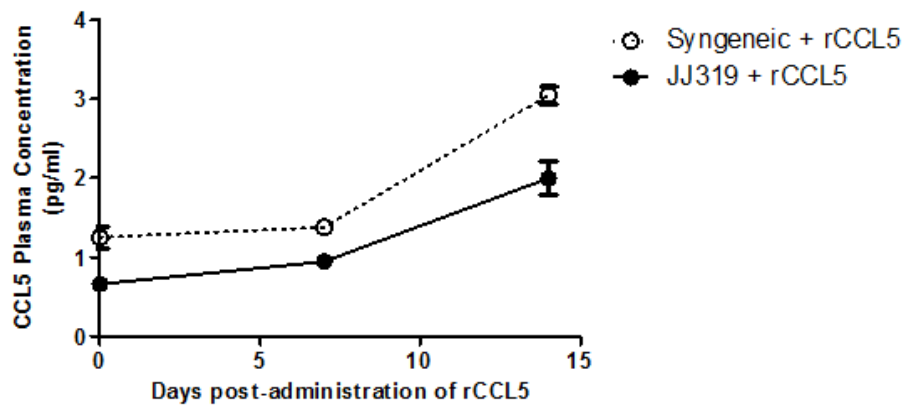
Supplementary Figures

Figure S1

**MDSC gene expression assessment by qRT-PCR.**

MDSCs from rat recipients of kidney grafts were purified from blood for RNA extraction. A qRT-PCR was performed to assess expression of LAX1 (Syngeneic, n=7; tolerant, n=11).

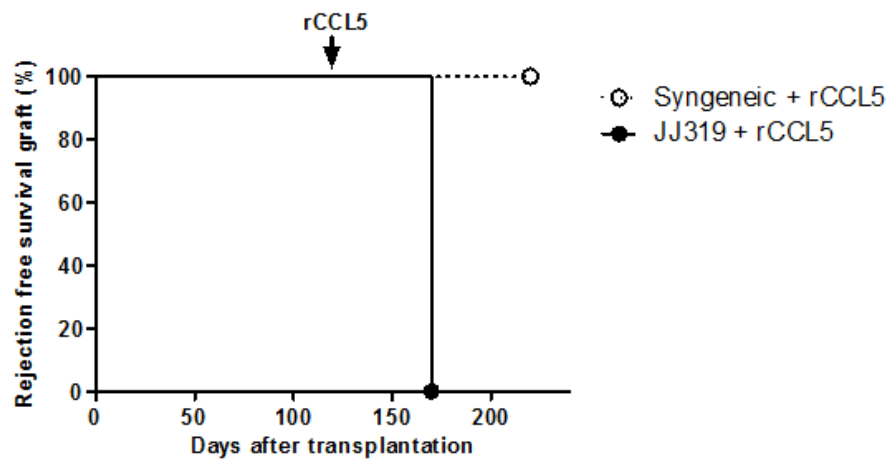
Figure S2



Recombinant rat CCL5 infusion restores *in vivo* CCL5 plasma level in tolerant recipient

Quantification of CCL5 protein levels by ELISA in plasma of recipients of syngeneic kidney grafts (n=2), recipients of kidney allografts tolerized by injection of anti-CD28 antibodies (n=3). Measurements were performed once a week post-implantation of rCCL5 filled osmotic pump.

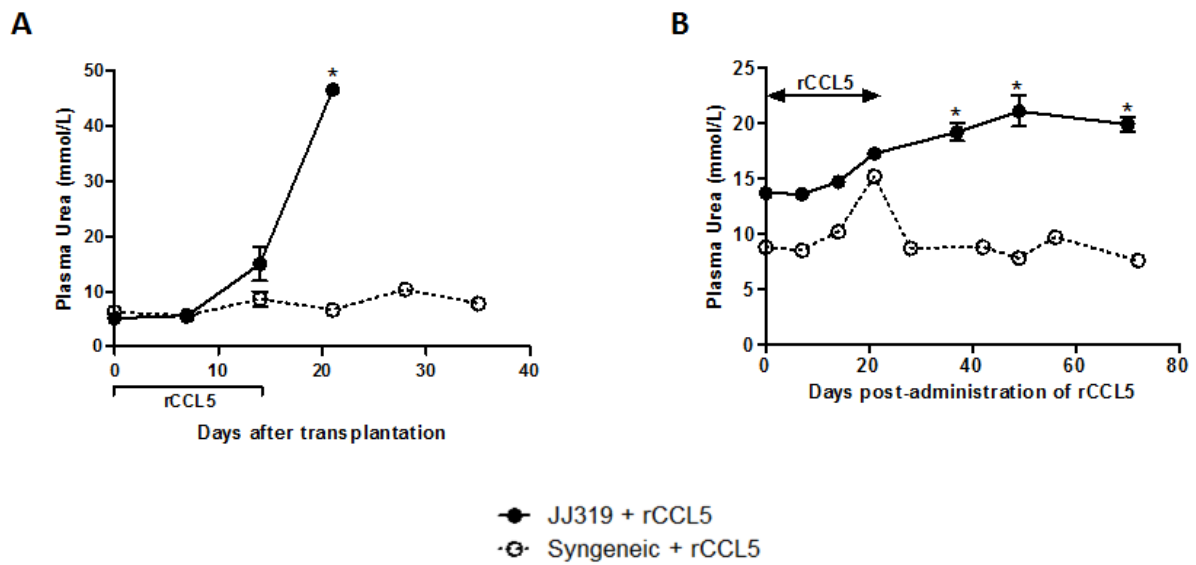
Figure S3



Recombinant rat CCL5 *in vivo* brakes established tolerance.

Kidney allograft survival in recipient rats with established tolerance receiving an i.p. administration of 1.5µg/Kg rCCL5 twice daily for 21 days (JJ319 + rCCL5) at 120 days post-transplantation (n=1). Rat recipients of syngeneic grafts receiving the same rCCL5 administration at 120 days post-transplantation are also shown (Syngeneic + rCCL5; n=1).

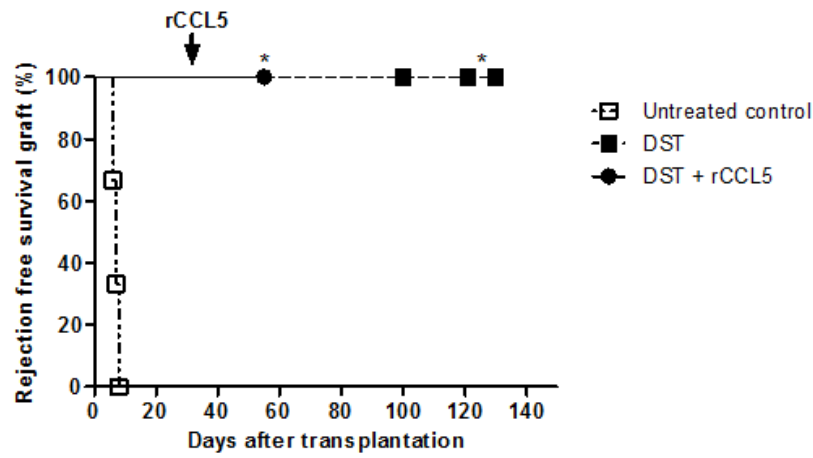
Figure S4



Recombinant rat CCL5 *in vivo* prevents induction of tolerance and brakes established tolerance.

(A) Kidney function assessed once a week for 28 days by plasma urea measurement in JJ319 + rCCL5 (n=3) and syngeneic + rCCL5 (n=3) recipients. (B) Kidney function assessed once a week for 28 days by plasma urea measurement in JJ319 + rCCL5 (n=3) and syngeneic + rCCL5 (n=3) recipients after implantation of osmotic pumps filled with rCCL5, 120 days post transplantation. *, $p \leq 0.05$.

Figure S5



Recombinant rat CCL5 *in vivo* does not break established tolerance in heart allotransplanted recipients.

Heart allograft survival in untreated rats (Untreated controls; $n = 3$) or in rats treated with DST (DST; $n = 3$) or with the same regimen plus the implantation of an osmotic pump delivering 14 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ rCCL5 for 14 days (DST + rCCL5; $n=3$).

I-2 Discussion et perspectives

Dans ce travail, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme de régulation auquel participent les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) chez des rats tolérants à une allogreffe rénale suite au blocage spécifique de la molécule CD28. En effet, nos données démontrent que les MDSC périphériques répriment l'expression génique de CCL5 chez ces animaux tolérants, contribuant ainsi à l'établissement d'un gradient de CCL5 du greffon vers la périphérie et au recrutement de cellules Treg dans le greffon, où elles participent au maintien de la tolérance.

Le blocage spécifique de CD28 permet l'inhibition de la costimulation tout en maintenant l'interaction CTLA-4/CD80-86, favorisant ainsi le développement de cellules T régulatrices (Tsai *et al.*, 2004). Son étude semble donc être une stratégie intéressante en transplantation d'organe. En effet, notre équipe s'est intéressée à cette stratégie en utilisant un anticorps anti-CD28 de rat, le clone JJ319, que nous avons décrit dans un modèle d'allogreffe rénale d'un rat LEW.1W à un rat LEW.1A. Cet anticorps anti-CD28 antagoniste, permet l'internalisation de CD28 à la surface de la membrane cellulaire *in vivo* (Haspot, Villemain et al. 2002). Malgré l'activation transitoire des lymphocytes T lors du processus de modulation du CD28 par le JJ319, cet anticorps bloque efficacement le CD28 puisqu'il inhibe la réponse alloréactive des cellules T stimulées par des CPA allogéniques. Ainsi, un traitement de 8 jours par l'anticorps anti-CD28 administré en I.P. (intrapéritonéal) permet au receveur de développer une tolérance sans signes histologiques de rejet chronique. En effet, nous avons précédemment montré que ce modèle d'induction entraîne la survie de 60 % des greffons rénaux allogéniques et l'analyse des mécanismes régulateurs du compartiment sanguin de ces animaux révèle la présence d'une population de cellules régulatrices non-T exprimant les molécules B7 et NKRP-1 responsables de l'inhibition de cellules T alloréactives (Haspot, Seveno et al. 2005). Par ailleurs, nous avons également montré que la tolérance induite à l'allogreffe rénale par l'anticorps anti-CD28 chez le rat est aussi en corrélation avec une accumulation de MDSC de phénotype $CD6^{-}CD11b^{+}Nkrp1^{+}CD80/86^{+}$ dans le sang des animaux tolérants, inhibant la prolifération des lymphocytes T par un mécanisme dépendant du monoxyde d'azote *in vivo* (A.-S. Dugast *et al.*, 2008).

En cancérologie, l'accumulation des MDSC dans les tumeurs constitue un mécanisme néfaste majeur chez les rongeurs et chez l'homme, dans la mesure où elle permet aux tumeurs d'échapper à la destruction par les lymphocytes T (Ostrand-Rosenberg, 2010). A l'inverse,

l'accumulation des MDSC est bénéfique en transplantation et empêche le développement du rejet de greffe dans différents modèles chez le rongeur (Dilek *et al.*, 2010). Ainsi, nous avons approfondi l'étude de ces cellules afin de mieux comprendre leur accumulation et leur mécanisme d'action dans notre modèle de tolérance chez le rat. L'analyse de puce à ADN de MDSC issues du sang de rats tolérants et de rats ayant subi une greffe rénale syngénique, nous a permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression diffère significativement entre ces 2 groupes (**Tableau 1**) et pouvant expliquer nos résultats publiés précédemment. Quatre gènes peuvent notamment expliquer l'accumulation des MDSC dans notre modèle de tolérance : *bcl2l12* et *dapk2* appartenant à la voie de l'apoptose, et, *lat* et *lax1* appartenant à la voie de différenciation/maturation. En effet, Bcl2l12 (*Bcl2-like 12*) appartient à la famille de Bcl2 (*B-cell/lymphoma 2*) regroupant les gènes liés à l'apoptose. Bcl2l12 est un anti-apoptotique qui a notamment été décrit dans différents modèles de cancer chez l'homme (Talieri *et al.*, 2003; Mathioudaki *et al.*, 2004; Stegh & DePinho, 2011; S. G. Papageorgiou *et al.*, 2011). Il est exprimé principalement dans le sein, le thymus, la prostate, le foie, le côlon, le placenta, le pancréas, l'intestin grêle, la moelle épinière, les reins et la moelle osseuse et dans une moindre mesure dans de nombreux autres tissus (Scorilas *et al.*, 2001). Bcl2L12 se trouve à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules. Dans le cytoplasme, il inhibe les caspases 3 et 7 qui participent à l'apoptose cellulaire (Stegh & DePinho, 2011). Dans le noyau, il forme un complexe avec p53, réduit ainsi la stabilité de cette protéine p53 et empêche sa liaison au promoteur des gènes cibles (*i.e.* p21, DR5, Noxa et PUMA), inhibant ainsi les modifications et dommages causés à l'ADN conduisant à l'apoptose (Stegh & DePinho, 2011). Dapk2, quant à lui, appartient à la famille des sérine/thréonine protéine-kinases DapK (*Death-Associated Protein Kinase*) pro-apoptotiques (Patel *et al.*, 2011). Des études récentes indiquent que l'expression de Dapk2 peut également être détectée dans certains cancers, mais sa fonction reste réprimée (Michie *et al.*, 2010). Dapk2 est exprimé abondamment dans le cœur, le poumon et le muscle squelettique (Kawai *et al.*, 1999). Il est activé par la calmoduline (CaM) en réponse au calcium (Kawai *et al.*, 1999) et induit l'apoptose grâce à son activité catalytique. Nous montrons dans cet article que les MDSC issues d'animaux tolérants surexpriment d'une part l'ARN messager (ARNm) de Bcl2l12 (**Figure 1A**), un anti-apoptotique, et sous-expriment d'autre part l'ARNm de Dapk2 (**Figure 1B**), un pro-apoptotique. Ainsi, l'accumulation des MDSC chez les animaux tolérants pourrait s'expliquer par une inhibition de leur mort cellulaire par apoptose. Par ailleurs, les MDSC ont un phénotype de cellules immatures. Leur accumulation peut être donc également due à une inhibition de leur maturation. Cette hypothèse semble être confirmée par l'inhibition de

l'expression de LAT (*Linker of Activated T cells*) (**Figure 1C**) par les MDSC d'animaux tolérants, dont l'expression est pour la première fois mise en évidence dans ces cellules. En effet, LAT est connu pour être exprimé à ce jour dans les thymocytes, les cellules T matures, les cellules NK, les mastocytes, les mégacaryocytes et les cellules pré-B (W. Zhang *et al.*, 1998; Su & Jumaa, 2003; Facchetti *et al.*, 1999). LAT est une protéine transmembranaire de 36 kD qui est rapidement phosphorylée au niveau de sa tyrosine après l'engagement du TCR (W. Zhang *et al.*, 1998; Wange, 2000). Il initie une cascade de signalisation essentielle pour le développement et la fonction des lymphocytes T, via notamment les protéines Grb2, PLC- γ ou PI3K. LAT est un régulateur essentiel de l'activation cellulaire, la différenciation terminale (Nuñez-Cruz *et al.*, 2003) et la maturation (W. Zhang *et al.*, 1999) (Fuller & W. Zhang, 2009). Ainsi, il est possible que l'inhibition de son expression chez les MDSC de rats tolérants leur permette de garder un phénotype immature et expliquer leur augmentation dans leur compartiment sanguin. Enfin, l'augmentation de l'expression du gène *lax1* (*lymphocyte transmembrane adaptor 1* ou *linker for activation of X cells*) identifié dans les puces à ADN (**Tableau 1**) pourrait également contribuer à cette accumulation. En effet, *lax1* est un gène exprimé notamment dans les cellules B, les cellules T, les cellules NK et les monocytes, qui régule négativement la signalisation du TCR dans les lymphocytes T (M. Zhu *et al.*, 2002). Cependant, l'augmentation de son expression dans les MDSC de rats tolérants n'est pas significative en PCR quantitative (**Figure S1**).

Ainsi, grâce à ces résultats, plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à l'augmentation de MDSC chez les rats tolérants à l'allogreffe rénale suite au blocage spécifique de CD28 : la première étant l'inhibition d'un facteur pro-apoptotique (Dapk2) et l'augmentation d'un facteur anti-apoptotique (Bcl2l12) conduisant ainsi à une longue survie; et la deuxième étant l'inhibition ou l'augmentation de facteurs de différenciation/maturation (LAT ou LAX1, respectivement) permettant de maintenir un phénotype immature. Cependant, l'investigation concernant ces gènes s'est arrêtée à ce stade.

En effet, nous nous sommes focalisés sur le gène *ccl5* (*Chemokine (C-C motif) ligand 5*) qui apparaissait le plus significativement différentiel entre le groupe d'animaux tolérants et le groupe d'animaux ayant subi une allogreffe syngénique. Son expression est très fortement réprimée dans les MDSC d'animaux tolérants (**Tableau 1**). Cette sous-expression est aussi confirmée par la quantification de l'ARNm de CCL5 dans les MDSC (**Figure 1D**). Par ailleurs, cette inhibition de l'ARNm de CCL5 dans les MDSC se traduit notamment par une inhibition de la concentration protéique de CCL5 dans le sang des animaux tolérants et est spécifique à notre modèle de tolérance à l'allogreffe rénale (**Figure 2A**). En effet, la

concentration plasmatique de CCL5 dans un modèle de tolérance à une allogreffe cardiaque suite à une DST ne varie pas par rapport à celle d'animaux naïfs (**Figure 2A**). De même, dans un modèle de tolérance à une allogreffe rénale suite à un traitement anti-class II (Degauque *et al.*, 2006), le taux de CCL5 ne varie pas (**Figure C1**).

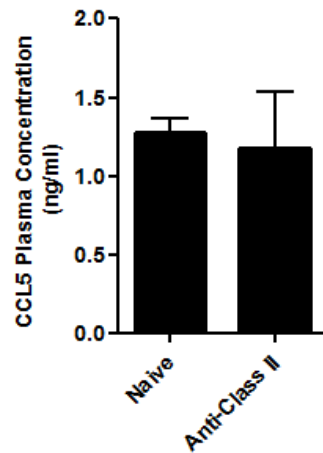


Figure Complémentaire 1 (C1) : Quantification de la concentration plasmatique de la protéine CCL5 par ELISA chez des animaux naïfs (n=7) et chez des animaux tolérants à une allogreffe rénale suite à un traitement par un anticorps anti-classe II (n=5). La quantification a été réalisée 3 mois après transplantation.

De manière intéressante, les MDSC ne sont pas impliquées dans ces 2 modèles (Louvet *et al.*, 2004; Degauque *et al.*, 2007; Degauque *et al.*, 2006). De même, seules les MDSC semblent jouer un rôle dans la diminution de CCL5 dans le sang car l'ARNm de cellules « non-MDSC » montre un niveau similaire entre le groupe tolérant et le groupe syngénique (**Figure 2B**). Cependant, d'autres cellules comme les cellules endothéliales (R. de Martin *et al.*, 1993; Läubli *et al.*, 2009) ou les plaquettes (Kameyoshi *et al.*, 1992) sont également capables de sécréter CCL5.

CCL5, également appelée RANTES (*Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*), est une chimiokine (ou cytokine chimio-attractante) pro-inflammatoire qui joue un rôle important dans la réponse immune, en induisant le recrutement de leucocytes au niveau des sites inflammatoires. CCL5 est exprimée par les cellules NK, les DC, les macrophages, les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales bronchiques (Nelson *et al.*, 1993; Devergne *et al.*, 1994; J. H. Wang *et al.*, 1996). CCL5 est reconnue par plusieurs récepteurs aux chimiokines comme CCR5, CCR1 et CCR3. Elle a un rôle immunomodulateur décrit dans le cancer (Lapteva & X. F. Huang, 2010) et a également été associée au rejet de

greffe rénale (Pattison *et al.*, 1994; Dikow *et al.*, 2010). Le blocage de CCL5 par un inhibiteur compétitif, Met-Rantes qui a une plus forte affinité pour son récepteur, permet notamment de prévenir le rejet aigu d'allogreffe (H. J. Gröne *et al.*, 1999; Yun *et al.*, 2004) et de réduire le rejet chronique (Song *et al.*, 2002). CCL5 a également été décrite dans l'adénocarcinome chez l'homme et la souris (M. C. B. Tan *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs ont montré que les cellules tumorales sécrètent la chimiokine CCL5 afin de recruter les Treg, exprimant le récepteur CCR5 (*chemokine (C-C motif) receptor 5*), dans le but d'inhiber la réponse immune locale et permettre à la tumeur de se développer. Par ailleurs, CCL5 a été mis en évidence dans les glomérules de rein (Pocock *et al.*, 2003). De même, nous montrons que l'ARNm de CCL5, ainsi que la protéine CCL5, sont augmentés à long terme après transplantation (3 à 4 mois post-transplantation) dans les allogreffes rénales tolérantes par rapport aux allogreffes rénales syngéniques (**Figure 3A et 3B**). Ainsi, dans notre modèle de tolérance à l'allogreffe rénale, d'une part une diminution de CCL5 est observée en périphérie, alors que d'autre part une augmentation de cette chimiokine est retrouvée dans le greffon. Le ratio des concentrations de ces 2 compartiments (greffon:plasma) est effectivement significativement élevé chez les animaux tolérants par rapport aux animaux naïfs ou syngéniques (**Figure 3C**), suggérant la formation d'un gradient de CCL5 en faveur du greffon permettant le recrutement de Treg comme dans le modèle d'adénocarcinome (M. C. B. Tan *et al.*, 2009) et conduisant ainsi à l'établissement et au maintien de la tolérance. L'augmentation de l'ARNm de CCR5 et de Foxp3, caractérisant les Treg, dans le greffon des animaux tolérants confirme cette hypothèse (**Figure 4A et 4B**), ainsi que les images obtenues en IHC (immunohistofluorescence) qui montrent également un infiltrat plus important de Treg TCR β^+ Foxp3 $^+$ au sein des greffons d'animaux tolérants comparés à ceux d'animaux en rejet (**Figure 5 et Tableau 2**). Les animaux syngéniques, quant à eux, ne présentent pas d'infiltrat cellulaire au sein de leur greffon.

Dans le but d'analyser l'effet des MDSC, via CCL5 et les Treg, sur le maintien et l'induction de la tolérance à une allogreffe rénale chez le rat, nous avons poursuivi nos travaux, *in vivo*, par l'étude de CCL5 qui semble faire le lien entre les MDSC et les Treg. En effet, CCL5 étant réprimée chez les animaux tolérants, le fait de rétablir des taux de CCL5 normaux dans le sang permettrait de rompre le gradient de CCL5 et ainsi empêcherait à la tolérance de s'installer ou induirait la perte de tolérance. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps implanté dans la cavité intrapéritonéale des animaux des pompes osmotiques délivrant de manière continue la protéine recombinante CCL5 (rCCL5 à 14 μ g/kg/jour pendant 14 jours) dès le jour de l'allogreffe rénale tout en maintenant le traitement d'induction avec l'anti-

CD28. Le rejet de greffe apparaît alors environ à 20 jours (**Figures 6A, 6B et S4A**), suggérant que l'apport exogène en CCL5 empêche l'établissement de la tolérance. Ces mêmes pompes chez les animaux syngéniques n'induisent aucun rejet ou aucune réaction inflammatoire. En effet, ces animaux présentent une fonction rénale normale. Par ailleurs, ayant montré le rôle de CCL5 dans la phase d'induction de tolérance, nous nous sommes intéressés à son action dans la phase de maintien de la tolérance. Pour répondre à cette question, les pompes osmotiques rCCL5 ont été implantées chez des animaux tolérants à 120 jours après transplantation. Le rejet de greffe apparaît à environ 45 jours après l'administration de rCCL5 (**Figures 6C, 6D et S4B**) se traduisant par une perte de la fonction rénale. Ces résultats combinés suggèrent donc que l'établissement et le maintien de la tolérance dans ce modèle d'allogreffe rénale chez le rat nécessitent la répression de CCL5 en périphérie. Par ailleurs, l'administration de rCCL5 chez des tolérants à une allogreffe cardiaque suite à une DST n'induit aucun rejet de greffe (**Figure S5**) et confirme que l'administration de CCL5 en elle-même n'induit pas de rejet d'allogreffe de manière directe.

Enfin, toujours dans le but de conforter davantage notre hypothèse de gradient de CCL5 et du recrutement des Treg au niveau des greffons, nous avons quantifié l'ARNm de CCR5 et Foxp3 après le traitement par rCCL5. Ainsi, suite au rétablissement de la concentration de CCL5 dans le sang (**Figure S2**) et par conséquent à l'induction du rejet de l'allogreffe rénale, les greffons présentent moins d'ARNm de CCR5 et Foxp3 (**Figure 4**) et de cellules TCRβ⁺Foxp3⁺ (**Figure 5 et Tableau 2**), suggérant que les Treg ont quitté les greffons où ils participaient au maintien de la tolérance.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence un nouveau mécanisme d'action indirect des MDSC dans la tolérance en transplantation. De plus, nous décrivons pour la première fois dans ce modèle de tolérance à une allogreffe rénale suite blocage spécifique de CD28, une coopération entre les MDSC et les Treg qui n'avait pas pu être mise en évidence auparavant. En effet, en plus de leur action suppressive dépendant du monoxyde d'azote (A.-S. Dugast *et al.*, 2008), les MDSC vont participer à la diminution de CCL5 dans le compartiment sanguin, via la sous-expression de CCL5. Le greffon, quant à lui, sécrétant CCL5 va ainsi recruter les cellules exprimant le récepteur CCR5 telles que les cellules T régulatrices, qui à leur tour vont avoir un rôle dans l'établissement de la tolérance. Cependant, davantage d'expérimentations seraient nécessaires pour approfondir le mécanisme d'action de ces cellules. En effet, il serait intéressant d'identifier par quelle voie les MDSC régulent leur expression de CCL5 et de voir si ce mécanisme s'applique à d'autres modèles faisant intervenir les MDSC et les Treg,

notamment chez l'homme. Enfin, concernant l'accumulation des MDSC, il serait intéressant d'étudier la voie d'apoptose (via Bcl2l12 et Dapk2) et la voie de maturation de ces cellules immatures par l'étude plus approfondie de LAT.

II- Projet II :

II-1 Projet d'article 2

Le blocage spécifique de CD28 stabilise la synapse immunologique entre les lymphocytes T régulateurs et les cellules présentatrices d'antigène par des mécanismes dépendant de CTLA-4.

Nahzli DILEK, Nicolas POIRIER, Philippe Hulin, Gilles BLANCHO et Bernard VANHOVE.

Résultats encore non publiés.

Introduction

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) jouent un rôle central dans le maintien de l'équilibre entre la tolérance immunitaire aux antigènes du soi et les réponses anti-tumorales [1]. Les Treg suppriment notamment la fonction des lymphocytes T effecteurs (Teff) CD4⁺ et CD8⁺ par un engagement du TCR et un mécanisme contact dépendant [1-3]. Cependant, certaines cytokines inflammatoires comme le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*) sont susceptibles de diminuer l'activité des Treg [4,5]. De même dans la polyarthrite rhumatoïde, les Treg présentent une activité suppressive réduite *ex vivo*, alors qu'aucune variation de leur nombre n'est observée *in vivo* [5,6]. Outre les signaux négatifs initiés par le TNF- α , les Treg peuvent également recevoir des signaux d'inhibition via le TCR. En effet, l'activation de la protéine kinase AKT par le TCR peut inhiber la fonction des Treg [7], suggérant ainsi que la signalisation par le TCR peut rétroagir négativement en inhibant la suppression médiée par les Treg. Par ailleurs, la signalisation du TCR conduit à la formation de la synapse immunologique (SI) dans les premières secondes qui suivent l'activation des cellules T. Ainsi, les différences de signalisations initiées par le TCR dans les Treg peuvent émerger au niveau de la SI [8]. Les Treg peuvent former des contacts stables avec les CPA induisant des conséquences fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* [9-11]. Cependant, les mécanismes ayant lieu au niveau de la SI entre les Treg et les CPA n'ont été que très peu étudiés en comparaison à la SI entre les Teff et les CPA. Des données récentes ont notamment montré que pendant la formation de la SI chez les Treg, la PKC- θ est séquestrée loin de la SI au niveau de leur pôle distal contrairement aux Teff [12]. Ainsi, la PKC- θ est différenciellement localisée dans les Teff et les Treg au cours de la formation de la SI. Grâce à l'utilisation d'un modèle *in vitro* de bicouches mobilisant les anticorps anti-CD3 et ICAM-1, le groupe de Dustin a mis en évidence que les Treg forment des SI plus stables que les Teff [12], pouvant ainsi expliquer la réduction de la signalisation de PKC- θ décrite auparavant au niveau de la SI chez les cellules Treg [13]. En effet, PKC- θ reverse la stabilité de la SI [13]. Par ailleurs, les marqueurs de signalisation en aval du TCR, comme les kinases de la famille Src, la PKC- θ et Carma-1, sont également réduits au niveau de la SI des Treg [12].

L'obtention d'une activation lymphocytaire T complète suite à l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide nécessite le recrutement de la PKC- θ au niveau de la SI par un mécanisme dépendant de la molécule de costimulation CD28 [14-17]. La molécule CD28 et PKC- θ sont co-localisées et jouent un rôle central dans la coordination des voies de transduction du signal en aval du TCR [17,18]. En effet, CD28 et PKC- θ non seulement se

déplacent ensemble, mais elles sont aussi associées physiquement. Le blocage de l'interaction CD28/CD80-86 par CTLA-4-Ig abroge l'accumulation de CD28, mais aussi celle de PKC- θ au niveau de la SI. CD28 recrute PKC- θ dans une région particulière de la SI, la cSMAC (*central (c-) Supra Molecular Activation Complex*). De même, Carma-1, qui forme le complexe Carma1-Bcl10-MALT1 (CBM) pour induire l'activation du NF- κ B, s'accumule aussi dans la même région que CD28 et PKC- θ [17] contrairement aux observations faites au niveau des Treg [12]. Ainsi, la molécule CD28, appartenant à la voie de costimulation CD28/CTLA-4/CD80-86 et étant exprimée par les Teff et les Treg, semble ne pas induire la même signalisation dans ces deux types cellulaires. En effet, les molécules de costimulation de la famille de CD28 jouent un rôle majeur dans la balance entre les mécanismes régulateurs et les mécanismes effecteurs suite à une stimulation par un antigène. L'engagement de CD28 aux récepteurs CD80 et CD86 est indispensable pour la prolifération et l'activation des cellules T, et, les réponses pro-inflammatoires [19]. Bien que la molécule CD28 soit nécessaire à l'homéostasie des Treg [20], l'interaction CD28/CD80-86 peut aussi inhiber leur fonction [21]. Cette différence de fonction entre Teff et Treg est vraie également pour la troisième molécule clé de cette voie de costimulation, CTLA-4, qui se lie aux mêmes récepteurs que CD28, les CD80 et CD86.

Contrairement à CD28, la molécule CTLA-4 n'est pas exprimée de manière constitutive sur les Teff, mais se retrouve à la surface membranaire après activation lymphocytaire, tandis qu'elle est exprimée constitutivement sur les Treg. CTLA-4 régule négativement l'activation des cellules T effectrices en délivrant des signaux antiprolifératifs [22], alors qu'elle est indispensable pour la fonction suppressive des Treg [11,23]. En effet, l'analyse de la régulation spatio-temporelle de l'expression de CTLA-4 a révélé que la molécule CTLA-4 forme également des « microclusters », qui s'accumulent exactement dans la même région que CD28 et PKC θ . Ainsi, CTLA-4 va inhiber le signal d'activation des cellules T effectrices passant par CD28 et PKC- θ [17]. Les Treg peuvent, quant à eux, induire l'expression d'IDO de façon CTLA-4 dépendante dans les cellules dendritiques (DC) [24]. Les DC interagissent avec les Treg *in vivo* [9]. En effet, après avoir formé des agrégats autour de la DC, *via* un mécanisme dépendant de LFA-1 [25], les Treg entraînent de façon spécifique la diminution d'expression des molécules CD80 et CD86 par un phénomène dépendant de CTLA-4 et LFA-1 [25]. L'interaction des Treg avec les DC altère leur capacité à maintenir une interaction de longue durée avec les cellules T effectrices [26] : la molécule CTLA-4 semble jouer un rôle dans ce processus [27]. Il a été notamment rapporté que la molécule CTLA-4 induit l'expression de LFA-1 [28]. La molécule LFA-1 (CD11a/CD18) appartient à la famille des

intégrines dans laquelle la sous-unité $\beta 2$ (CD18) est associée à différentes sous-unités α (CD11a, b, c, d) (Springer, 1990). LFA-1 est exprimée par les Teff et les Treg, et, peut se lier à ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) et ICAM-3 (CD50) présent sur les CPA. Elle existe sous 3 formes différentes qui lui confèrent plus ou moins une haute affinité. LFA-1 joue un rôle très important dans le rassemblement des TCR au SMAC ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette lymphocytaire [29]. Cette intégrine favorise l'interaction entre les Treg et les CPA [25,28]. Rap1, une Ras GTPase, semble être au centre de la fonction de LFA-1. Rap1 est, elle, régulée par la signalisation de molécules membranaires (*i.e.* TCR, CD28, CTLA-4) et par des protéines adaptatrices (*i.e.* ADAP et SKAP-55). Rap1 régule l'adhésion et la polarisation cellulaire. En effet, la molécule adaptatrice Rap1-GTP agit en conjonction avec le cytosquelette sur le domaine cytosolique de LFA-1 pour augmenter l'adhésion [30].

Dans cette étude, nous avons ainsi émis l'hypothèse que le blocage spécifique de CD28, sans affecté CTLA-4, pouvait être une stratégie efficace pour moduler les réponses immunes : elle peut ainsi bloquer la réponse des cellules T effectrices tout en préservant la fonction régulatrice des Treg. En effet, seules des stratégies bloquant toute la voie CD28/CTLA-4/CD80-86 (*i.e.* CTLA-4-Ig) ont été développées jusqu'à aujourd'hui. Nous avons ainsi précédemment montré que le blocage spécifique de CD28, par un anticorps monovalent sc28AT, inhibe la réponse immune lymphocytaire, alors qu'elle favorise l'action suppressive des Treg [31]. La nature monovalente des anticorps anti-CD28 est essentielle à leur action antagoniste, car elle permet une inhibition stérique de l'interaction CD28/CD80-86 sans entraîner de multimérisation du récepteur CD28 lui-même et donc sans entraîner de signal activateur. Par ailleurs, ce blocage prévient la formation de synapses immunologiques entre les Teff et les CPA de manière dépendante de l'interaction CTLA-4/CD80-86. C'est pourquoi, afin de mieux caractériser l'action de CD28 et CTLA-4 et de mieux comprendre les mécanismes régissant la SI chez les Teff et les Treg, nous avons étudié dans ce travail l'effet du blocage spécifique de CD28, par un nouvel anticorps monovalent humanisé anti-CD28 antagoniste (FR104), sur la SI entre Teff/CPA et Treg/CPA. Pour cela, nous avons généré des clones de Treg humains, et analysé le comportement des clones Teff et Treg en présence de CPA par une technique de vidéo microscopie (Time-Lapse). Nous avons ainsi montré que le blocage de CD28 par FR104 prévient la formation de SI stable chez les Teff, alors qu'il augmente les temps de contact entre les Treg et les CPA par un mécanisme dépendant de CTLA-4. Ces contacts sont par ailleurs aussi dépendants de l'interaction LFA-1/ICAM-1.

Matériels et méthodes

Réactifs. L'anticorps monovalent anti-CD28 antagoniste, FR104, est développé par Effimune (Nantes, France). L'anticorps anti-CTLA-4 (clone 147.1) a été fourni par Medarex (Princeton, New-Jersey). Les anticorps anti-CD80 (M24) et anti-CD86 (1G10) ont été fournis par Innogenetics (Gent, Belgium). CTLA-4-Ig (LEA29Y) a été préparé dans notre laboratoire à partir de cellules COS transfectées. Les anticorps anti-humain couplés à des molécules fluorescentes et utilisés pour la cytométrie de flux sont les suivants : (i) anti-CD3 (SP34-2), anti-CD4 (L200), anti-CD25 (M-A251), anti-CD127 (hIL-7R-M21) et CTLA-4 (BNI3) provenant de BD Biosciences (San-Diego, Californie) ; (ii) anti-Foxp3 (236A/E7) provenant de eBioscience (San-Diego, Californie) ; (iii) anti-Helios (22F6) provenant de Biolegend (San-Diego, Californie) ; et (iiii) anti-CD28 (CD28.6) préparé dans notre laboratoire à partir de l'hybridome correspondant, donné par D. Olive (INSERM, Marseille). Les anticorps purifiés anti-CD3 (OKT3) et anti-CD28 (CD28.2) ont été également préparés dans notre laboratoire.

Le milieu de culture utilisé pour la génération et l'expansion des cellules est du milieu complet RPMI 1640 (Gibco) complété par de la L-Glutamine (Gibco), de la pénicilline-streptomycine (Gibco) et 8% de sérum normal humain (PAA).

Génération de clones de Treg. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été enrichis à partir de cellules de sang de donneurs sains (PBMC) par sélection négative en utilisant un kit d'isolement II des cellules T CD4⁺ (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Allemagne) puis un séparateur autoMACS (Miltenyi). Ces cellules CD4⁺ enrichies ont ensuite été marquées à 4 °C pendant 30 minutes avec des anticorps monoclonaux anti-humain CD4, CD25 et CD127. Les cellules Treg CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} ont été triées par cytométrie (pureté supérieure à 97%) en utilisant un trieur de cellules à haut débit (FACSaria; BD Biosciences), mises en plaque à 0,3; 1 et 3 cellules/puits dans des plaques 96 puits et stimulées avec 10⁵ PBMC/puits (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) allogéniques irradiées (35 Gy) et un pool de 3 lignées de cellules B irradiées (10⁴ cellules/puits) présentant le peptide de l'EBV (*Epstein Barr Virus*) [32] en présence d'un anticorps anti-CD3 (OKT3) et de 300 UI/ml d'IL-2 pendant 7 jours à 37 °C, 5% de CO₂. A partir du jour 8, les clones de Treg ont été stimulés par une immobilisation de l'anticorps anti-CD3 (OKT3) et un anti-CD28 soluble (CD28.2) en présence de 1000 UI/ml d'IL-2 pendant 14 jours. Après 21 jours, les clones ont été restimulés une nouvelle fois avec des PBMC allogéniques et le pool de cellules B-EBV irradiés, en présence d'IL-2 et OKT3,

comme décrit ci-dessus. Les clones ont été sélectionnés selon leur phénotype et leur fonction après 6 semaines d'expansion clonale.

Expansion de cellules T effectrices et régulatrices. Les clones de cellules T effectrices (Teff) $CD4^+CD28^+CTLA-4^+$ [33] et régulatrices (Treg #1) $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD28^+CTLA-4^+$ ont été stimulées avec des PBMC allogéniques et le pool de 3 lignées de cellules B-EBV irradiés ($10 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^6$ cellules respectivement) dans une plaque 96 puits à fond rond, en présence de PHA-L (*Phytohaemagglutinin ou leucoagglutinin*) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) et de 400 UI/ml d'IL-2 en milieu complet à 37 °C, 5% de CO₂. Au bout de 7 jours, les cellules ont été transvasées dans un flasque en présence de 300 UI/ml d'IL-2. Les cellules ont été utilisées en moyenne à 21 jours après expansion.

Test de suppression des cellules T régulatrices. Toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules du sang extrait de donneurs sains. Les lymphocytes T $CD4^+$ ont été enrichis à partir des PBMC par sélection négative en utilisant un kit d'isolement II des cellules T $CD4^+$ (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Allemagne) en utilisant un séparateur autoMACS (Miltenyi). Ces cellules $CD4^+$ enrichies ont ensuite été marquées à 4 °C pendant 30 minutes avec des anticorps monoclonaux anti- humain $CD4$, $CD25$ et $CD127$. Les cellules T régulatrices $CD4^+CD25^{High}CD127^{Low}$ et les cellules T naïves $CD4^+CD25^-$ ont été triées (pureté systématiquement supérieure à 95%) en utilisant un trieur de cellules à haut débit (FACSAria; BD Biosciences) et le logiciel FACSDiva (BD Biosciences). $1 \cdot 10^5$ cellules $CD4^+CD25^-$ ont été cultivées avec $1 \cdot 10^5$ PBMC allogéniques irradiées et des cellules Treg $CD4^+CD25^{High}CD127^{Low}$ autologues ou clonales (Treg #1) avec un ratio de 1:1, pendant 5 jours à 37 °C, 5% de CO₂ dans un milieu complet humain (RPMI 1640, Pénicilline, Streptomycine, Sodium Pyruvate, Hepès, Acides aminés non-essentiels, et 5% de sérum normal humain). La mesure de la prolifération a été évaluée par l'incorporation de thymidine tritiée (³H).

Vidéo microscopie (Time Lapse). Toutes les expériences ont été réalisées en tampon HBSS (1X, Gibco) complété par de l'Hepès (5 mM, gibco) et dont le pH a été ajusté entre 7,2-7,4. Les cellules humaines Teff $CD4^+CD28^+$ et Treg #1 $CD4^+CD25^+CD28^+Foxp3^+$ spécifiques de l'EBV ($2 \cdot 10^5$ cellules) ont été marquées avec une sonde Fura2-AM (0,5 μM pendant 30 min; Interchim, Montluçon, France), lavées et ajoutées à $4 \cdot 10^5$ cellules B-EBV (pool de cellules de 3 donneurs) sur une lamelle recouvertes de poly-L-Lysine (0,001%; Sigma, Saint-Louis, Minnesota). A l'aide d'un logiciel d'analyse d'imagerie MetaFluor® (Molecular Devices,

Sunnyvale, CA), des images en lumière blanche et fluorescentes ont été acquises à des intervalles de 15 secondes sur un microscope Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne). Les interactions individuelles entre cellules T et CPA, et, les pics de calcium par cellule T individuelle au cours de ces interactions ont été examinées manuellement sur une période de 20 minutes avec les logiciels Metafluor et Metamorph (version 7.5.6; Roper Scientific, Göttingen, Allemagne). Un pic de calcium a été comptabilisé lorsque le niveau de fluorescence de base des cellules est augmenté d'au moins de 2 fois. La mobilité des cellules T ont été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.410). Les données présentées sont des moyennes \pm SD pour chaque condition.

Résultats (encore non publiés)

Analyse du phénotype et la fonction suppressive du clone Treg #1

Afin de vérifier que les lymphocytes T régulateurs naturels ne perdaient pas leur phénotype et leur fonction après expansion, nous avons vérifié par FACS le phénotype de différents clones Treg et avons sélectionné un clone, nommé Treg #1, pour la suite de notre étude. Ce clone Treg #1 présente le phénotype de Treg induits, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD28⁺CTLA-4⁺Foxp3⁺Helios⁻ (**Figure 1**). Après expansion, les cellules T effectrices (clone Teff), quant à elles, sont CD4⁺CD25⁺CD127^{high}CD28⁺CTLA-4⁺Foxp3⁻Helios⁻ (**Figure 1**). Alors que les lymphocytes T régulateurs naturels autologues inhibent à 81 % la prolifération de cellules T naïves CD4⁺CD25⁻ stimulées pendant 5 jours par des PBMC allogéniques irradiés, les cellules Treg #1 inhibent la prolifération à 98% confirmant ainsi une activité suppressive préservée et très importante (**Figure 2**). Ainsi, par cette première étape, nous validons notre clone Treg #1 spécifique de l'EBV pour la suite de notre étude.

Etude de l'effet du blocage sélectif de CD28, par FR104, sur un clone de lymphocytes T effecteurs (Teff) par vidéo microscopie Time Lapse

Nous avons dans une étude précédente montré que le blocage spécifique de CD28 par un anticorps monovalent anti-CD28 antagoniste (sc28AT, provenant de la fusion d'un fragment ScFv de l'anticorps humain bloquant de haute affinité, le CD28.3, et de l' α 1 anti-trypsine humaine) prévenait la formation de contacts stables entre les Teff et les lymphocytes B-EBV (utilisés comme CPA) par des mécanismes dépendant de la molécule CTLA-4 [31]. Ainsi, l'effet de FR104, un anticorps monovalent anti-CD28 humanisé et pégylé issu du sc28AT, a été testé sur les Teff. Les temps de contact entre Teff et CPA sont significativement diminués en présence de FR104 ($11,93 \pm 1,17$ min. vs $4,16 \pm 1,19$ min. sur une période de 20 min, $p < 0,001$) (**Figures 3A et 4A**). L'effet de FR104 est réversé lorsque les Teff sont traités simultanément avec FR104 et un anti-CTLA-4 ($10,45 \pm 1,53$ min.), confirmant la prévention de la formation de contacts stables entre Teff et CPA par des mécanismes dépendant de CTLA-4. CTLA4-Ig ou les anticorps anti-CD80/86 vont au contraire augmenter les temps de contact entre Teff et CPA ($18,33 \pm 1,07$ min. et $18,42 \pm 1,54$ min.) (**Figure 4A**). L'effet sur les temps de contact corrèle avec la motilité des cellules Teff. En effet, en comparaison à la condition contrôle, la motilité des Teff est accrue lors du blocage spécifique de CD28 ($100,5 \pm 6,03$ μ m vs $204,8 \pm 17,54$ μ m, $p < 0,001$) et l'ajout simultané de l'anti-CTLA-4 et FR104 prévient l'intense motilité observée ($92,42 \pm 7,68$ μ m) (**Figure 4B**). Les mêmes résultats de

motilité moyenne sont observés avec CTLA4-Ig et les anti-CD80/86 ($79,12 \pm 10,32 \mu\text{m}$ et $75,68 \pm 19,19 \mu\text{m}$). L'analyse des flux calciques par cellule Teff individuelle (**Figure 6A**) rapportés en nombre de pics calciques par minutes (**Figure 6B**) montre une diminution des pics calciques ($0,36 \pm 0,03$ pics/min vs $0,15 \pm 0,02$ pics/min, en condition contrôle et avec l'anti-CD28, respectivement, $p < 0,001$) traduisant ainsi une inhibition de la fonction des Teff par le blocage spécifique de CD28. Ainsi, le blocage de CD28 par FR104 prévient la formation de contact stable entre Teff et CPA et augmente la motilité des Teff par un mécanisme dépendant de CTLA-4, ce qui est traduit par une baisse de l'activation cellulaire. Nous confirmons donc bien nos précédents résultats obtenus avec le sc28AT [31].

Etude de l'effet du blocage sélectif de CD28, par FR104, sur un clone de lymphocytes T régulateurs #1 (Treg #1) par vidéo microscopie Time Lapse

Nous avons montré que l'effet du blocage spécifique de CD28 favorise l'activité suppressive des Treg [31]. C'est pourquoi, l'effet du blocage spécifique de CD28 sur les interactions entre les Treg et les CPA en vidéo microscopie a été l'étape suivante de notre étude (**Figure 3B**). De manière intéressante, en condition contrôle les Treg #1 n'établissent que de courts contacts avec les CPA ($5,06 \pm 0,87$ min sur une période de 20 min), alors qu'en condition avec l'anti-CD28 (FR104) ces contacts sont renforcés et durent plus longtemps ($13,81 \pm 1,10$ min, $p < 0,001$) (**Figure 5A**). Lorsque les Treg #1 sont traités avec l'anti-CD28 et simultanément avec l'anti-CTLA-4, les courts contacts sont restaurés ($3,02 \pm 0,82$ min), suggérant que CTLA-4 a également un rôle dans les interactions Treg/CPA. Concernant la motilité, aucune différence n'est obtenue entre les conditions contrôle, FR104 et FR104 + anti-CTLA-4 ($120,2 \pm 6,98 \mu\text{m}$ et $121,3 \pm 6,65 \mu\text{m}$, respectivement) (**Figure 5B**). CTLA4-Ig et les anti-CD80/86, quant à eux, n'influent pas sur les temps de contact des Treg avec les CPA ($3,24 \pm 1,55$ min et $4,64 \pm 2,59$ min, respectivement), mais induisent une augmentation significative de la motilité des Treg ($190,1 \pm 12,83 \mu\text{m}$ et $163,0 \pm 21,87 \mu\text{m}$, respectivement) (**Figures 5A et 5B**). L'analyse des profils calciques (**Figure 6C**) des Treg en conditions contrôle ou en présence de l'anti-CD28 montre une augmentation du nombre de pics calciques par minutes lorsque CD28 est bloqué ($0,49 \pm 0,05$ pics/min en condition contrôle vs $0,68 \pm 0,06$ pics/min avec l'anti-CD28, $p < 0,05$) (**Figure 6D**), se traduisant par une augmentation de l'activation des cellules Treg. Ainsi, le blocage spécifique de CD28 entraîne une augmentation des contacts Treg/CPA et une activation importante des Treg, contrairement aux cellules Teff. Ces mécanismes sont tous CTLA-4 dépendants.

Les vidéos représentant les Teff ou les Treg en présence des CPA dans les conditions contrôle, anti-CD28 (FR104), et anti-CD28 + anti-CTLA-4 (**Figure 3**) sont accessibles à l'aide du lien et des identifiants suivants :

<http://www.ezubi.com/p5/site/login.php?e=&id=20767&u=ndilek>

Compte : ndilek

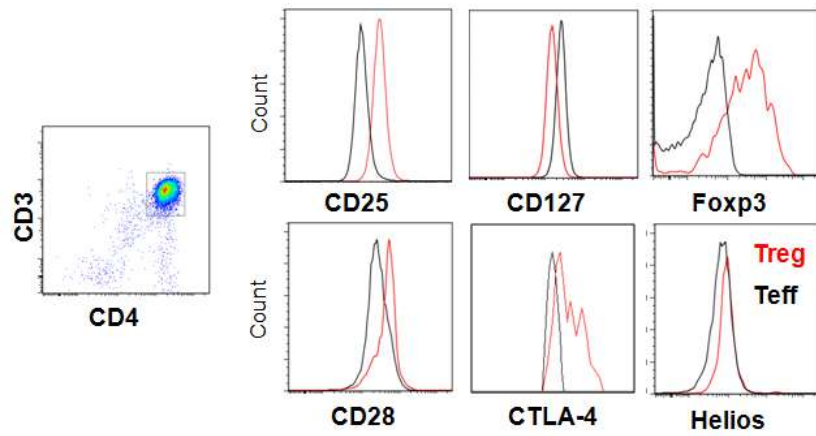
Mot de passe : antiCD28.

Références

1. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, *et al.* Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008 ; 133 : 775-787.
2. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, *et al.* The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol. Rev* 2006 ; 212 : 60-73.
3. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol* 2007 ; 8 : 457-462.
4. Flores-Borja F, Mauri C, Ehrenstein MR. Restoring the balance: harnessing regulatory T cells for therapy in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol* 2008 ; 38 : 934-937.
5. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, *et al.* TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood* 2006 ; 108 : 253-261.
6. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, *et al.* Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med* 2004 ; 200 : 277-285.
7. Crellin NK, Garcia RV, Levings MK. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Blood* 2007 ; 109 : 2014-2022.
8. Dustin ML, Tseng S-Y, Varma R, *et al.* T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr. Opin. Immunol* 2006 ; 18 : 512-516.
9. Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, *et al.* Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol* 2006 ; 7 : 83-92.
10. Tran DQ, Glass DD, Uzel G, *et al.* Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3⁺ regulatory T cell suppressor function. *J. Immunol* 2009 ; 182 : 2929-2938.
11. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, *et al.* CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 2008 ; 322 : 271-275.
12. Zanin-Zhorov A, Dustin ML, Blazar BR. PKC-θ function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting. *Trends Immunol* 2011 ;
13. Sims TN, Soos TJ, Xenias HS, *et al.* Opposing effects of PKCtheta and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* 2007 ; 129 : 773-785.
14. Monks CR, Kupfer H, Tamir I, *et al.* Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 1997 ; 385 : 83-86.
15. Huang J, Lo P-F, Zal T, *et al.* CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2002 ; 99 : 9369-9373.
16. Sanchez-Lockhart M, Miller J. Engagement of CD28 outside of the immunological synapse results in up-regulation of IL-2 mRNA stability but not IL-2 transcription. *J. Immunol* 2006 ; 176 : 4778-4784.
17. Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, *et al.* Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* 2008 ; 29 : 589-601.
18. Tseng S-Y, Waite JC, Liu M, *et al.* T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C theta. *J. Immunol* 2008 ; 181 : 4852-4863.
19. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol* 1998 ; 10 : 1969-1980.
20. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000 ; 12 : 431-440.
21. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, *et al.* CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J. Immunol* 2004 ; 172 : 2778-2784.
22. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science* 1995 ; 270 : 985-988.
23. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, *et al.* Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2008 ; 105 : 19396-19401.
24. Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat. Rev. Immunol* 2007 ; 7 : 817-823.
25. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, *et al.* Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2008 ; 105 : 10113-10118.
26. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, *et al.* Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med* 2006 ; 203 : 505-511.
27. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006 ; 118 : 240-249.

28. Schneider H, Valk E, Rocha Dias S da, *et al.* CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2005 ; 102 : 12861-12866.
29. Graf B, Bushnell T, Miller J. LFA-1-mediated T cell costimulation through increased localization of TCR/class II complexes to the central supramolecular activation cluster and exclusion of CD45 from the immunological synapse. *J. Immunol* 2007 ; 179 : 1616-1624.
30. Mor A, Dustin ML, Philips MR. Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. *Immunol. Rev* 2007 ; 218 : 114-125.
31. Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, *et al.* Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med* 2010 ; 2 : 17ra10.
32. Gallot G, Vollant S, Vivien R, *et al.* Selection of Epstein-Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes can be performed with B lymphoblastoid cell lines created in serum-free media. *Clin. Exp. Immunol* 2006 ; 144 : 158-168.
33. Ibisch C, Saulquin X, Gallot G, *et al.* The T cell repertoire selected in vitro against EBV: diversity, specificity, and improved purification through early IL-2 receptor alpha-chain (CD25)-positive selection. *J. Immunol* 2000 ; 164 : 4924-4932.

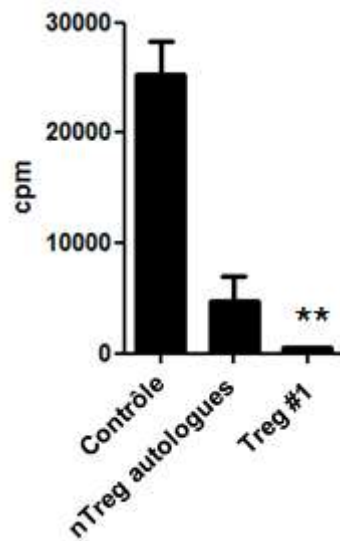
Figure 1



Analyse phénotypique par FACS des cellules T régulatrices (Treg #1) après expansion.

Le phénotype des cellules Treg #1 est comparé à celui du clone de cellules T effectrices (Teff) après expansion également.

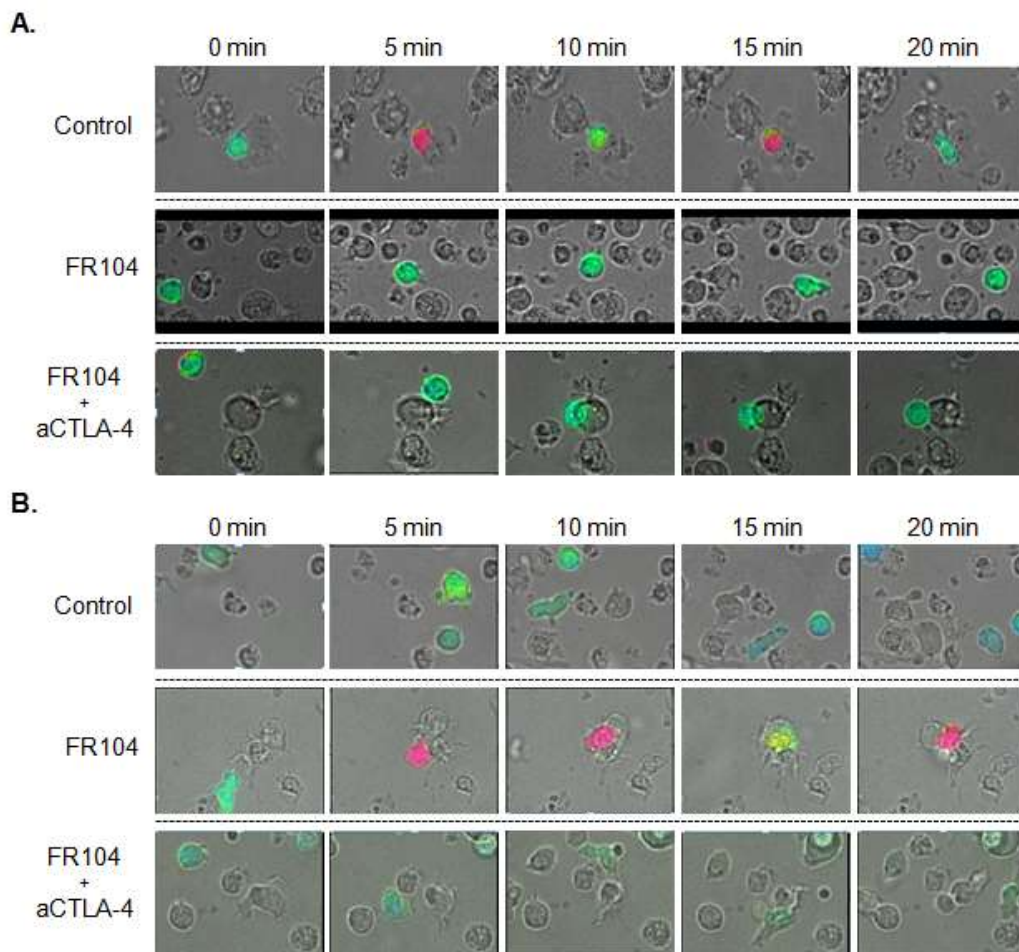
Figure 2



Analyse de la fonction suppressive des cellules T régulatrices (Treg #1) après expansion.

Prolifération de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ stimulés avec des PBMC allogéniques irradiés à J5 en présence ou non de lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) autologues ou des cellules Treg #1 à un ratio 1:1. **: p<0,01

Figure 3



Représentation des conditions de vidéo microscopie (Time-Lapse).

(A) Captures d'écran représentant les lymphocytes T effecteurs (clone Teff) marquées en vert ou rouge (cellules activées) par la sonde calcique Fura2-AM en présence de lymphocytes B-EBV non marqués. Les Teff sont pré-incubés avec un anti-CD28 (FR104) ou un anti-CD28 + un anti-CTLA-4 ou rien (contrôle). Les images ont été analysées sur une durée de 20 min. (B) Même conditions avec les lymphocytes T régulateurs (Treg #1) marqués au Fura2-AM et mis en présence de lymphocytes B-EBV.

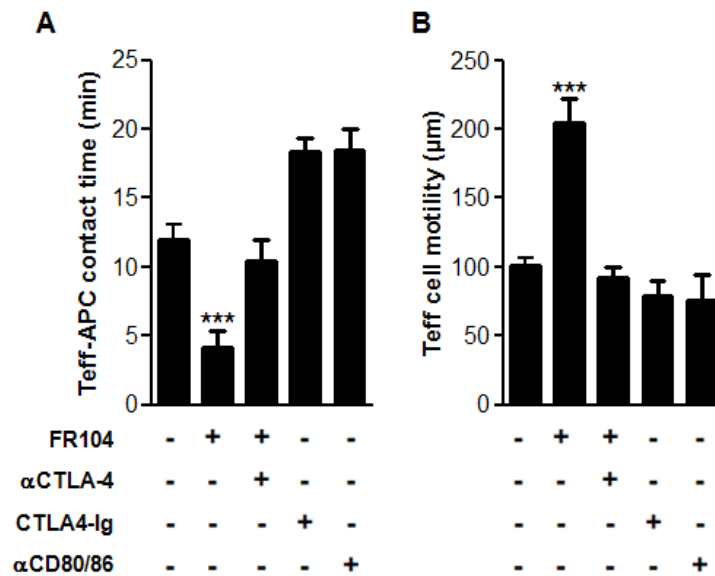
Les vidéos représentées par cette figure sont accessibles en ligne par le lien ci-dessous : <http://www.ezubi.com/p5/site/login.php?e=&id=20767&u=ndilek>

Compte : ndilek

Mot de passe : antiCD28

(Bien respecter les minuscules et les majuscules.)

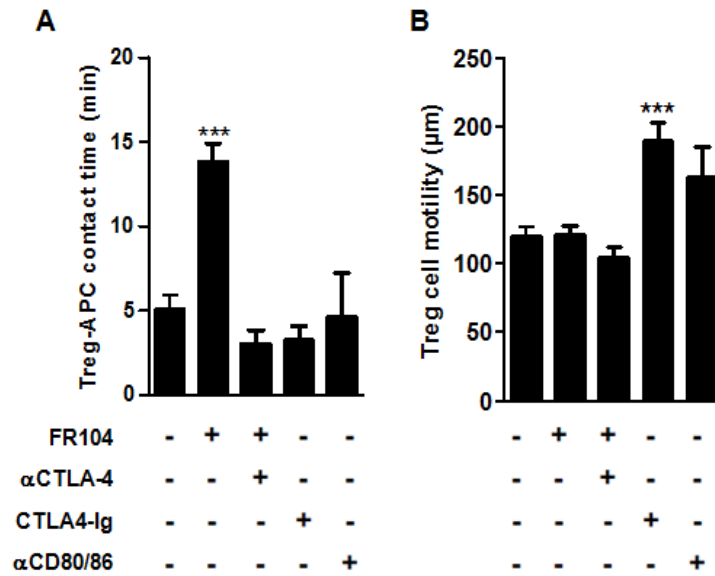
Figure 4



Analyse du Time-Lapse des cellules T effectrices (clone Teff) sur un période de 20 minutes.

(A) Mesure des temps de contact entre les lymphocytes T effecteurs et les lymphocytes B-EBV utilisés comme cellules présentatrices d'antigène (APC) en présence ou non des différents anticorps indiqués. (B) Mesure de la distance parcourue par les Teff sur 20 minutes dans les mêmes conditions que précédemment. *** : $p < 0,001$

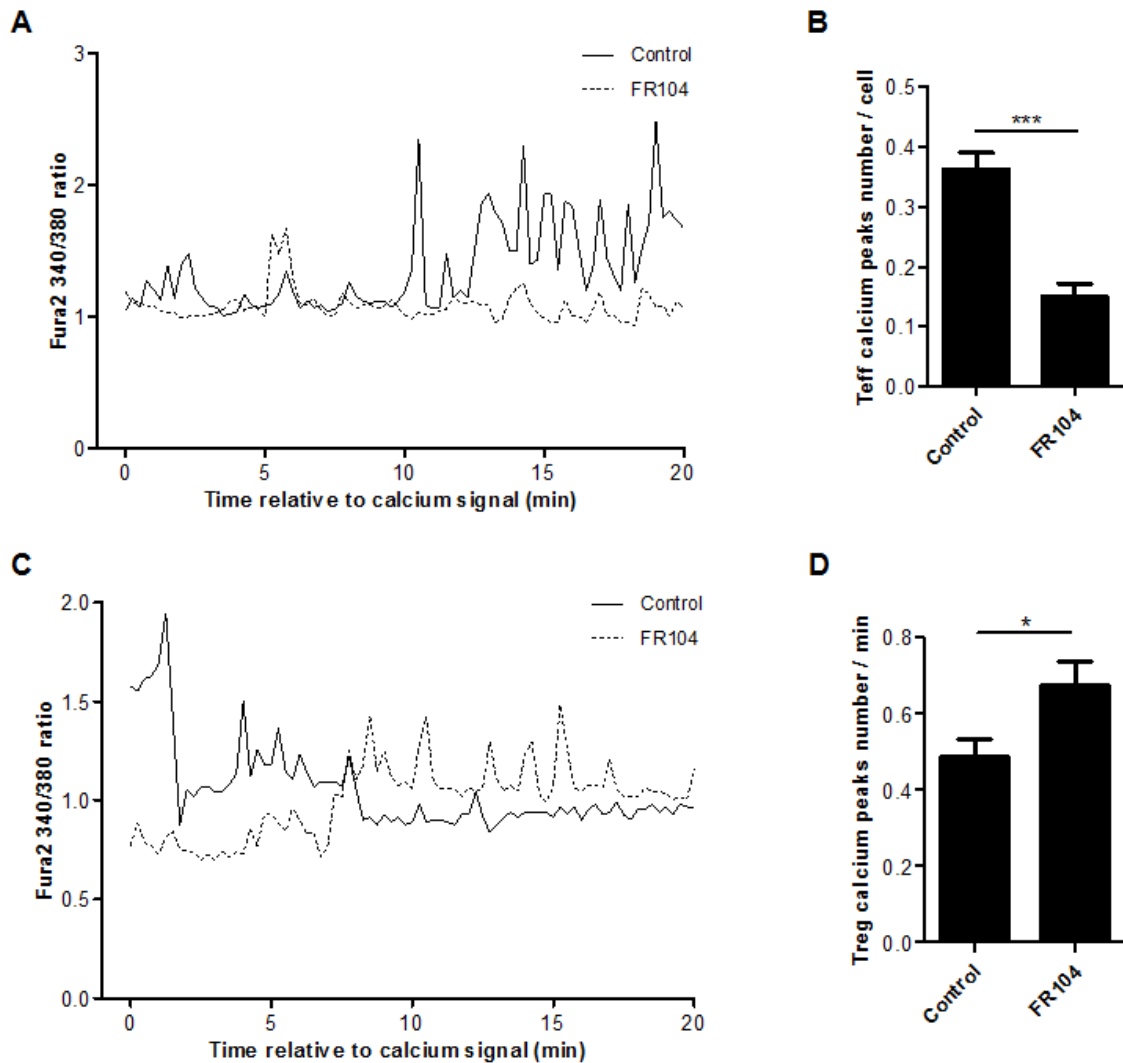
Figure 5



Analyse du Time-Lapse des cellules T régulatrices (Treg #1) sur un période de 20 minutes.

(A) Mesure des temps de contact entre les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes B-EBV utilisés comme cellules présentatrices d'antigène (APC) en présence ou non des différents anticorps indiqués. (B) Mesure de la distance parcourue par les Treg #1 sur 20 minutes dans les mêmes conditions que précédemment. *** : p<0,001

Figure 6



Profils et quantification des flux calciques.

Les flux calciques des Teff (A) et des Treg #1 (C), qui ont été établit un contact avec un lymphocyte B-EBV, ont été analysés grâce à la fluorescence de la sonde calcique Fura2 sur une période de 20 minutes. Le profil d'une cellule, qui représente chaque condition, est montré. Les Teff et les Treg #1 sont traités ou non avec 10 µg/ml d'anti-CD28 (FR104). La quantification de l'activation cellulaire Teff (B) et Treg #1 (D) est établit par le nombre de pic de flux calciques / min. * : p<0,05 et *** : p<0,001

II-2 Discussion et perspectives

Nous montrons dans ces travaux l'effet opposé d'un anticorps monovalent antagoniste anti-CD28 sur les contacts cellulaires entre les lymphocytes Teff et les CPA d'une part et les lymphocytes Treg et les CPA d'autre part. En effet, le blocage spécifique de CD28 abroge les contacts entre Teff/CPA alors qu'il renforce les contacts entre Treg/CPA. Ces effets de l'anti-CD28 sur le temps de contact se traduisent par une diminution ou une augmentation des flux calciques chez les Teff ou les Treg, respectivement, démontrant ainsi une diminution de l'activité cellulaire chez les Teff et une augmentation de celle-ci chez les Treg.

Le blocage de la voie CD28/CD80-86/CTLA-4, en ciblant CD80-86, inhibe l'alloréactivité des lymphocytes T et prévient le rejet aigu chez le primate ou chez l'homme (Kirk *et al.*, 2001; Boulday *et al.*, 2004; C. P. Larsen *et al.*, 2005; Vincenti *et al.*, 2005). Néanmoins, cibler la voie de costimulation CD28/CD80-86 sans perturber l'interaction inhibitrice CTLA-4/CD80-86 pourrait favoriser l'induction de tolérance. Chez le rongeur, il a été montré qu'un anticorps induisant une internalisation de CD28 inhibe les rejets aigu et chronique en transplantation (Dengler *et al.*, 1999; V. M. Dong, X. Yuan, *et al.*, 2002; A.-S. Dugast *et al.*, 2008). En revanche, aucun antagoniste « vrai » et sélectif de CD28 n'était disponible chez l'homme. C'est pourquoi, notre équipe s'est particulièrement intéressée à développer un tel antagoniste sélectif de CD28. La première molécule développée a été le sc28AT (anticorps antagoniste constitué d'un fragment monovalent *single-chain Fv*) (Vanhove *et al.*, 2003) et a fait l'objet d'une première étude pilote *in vivo* chez le primate et *in vitro* chez l'homme (Poirier *et al.*, 2010). Ainsi, le blocage spécifique de CD28 par le sc28AT prévient, en synergie avec les CNI, le rejet aigu dans la greffe de rein chez le primate non-humain. De même, cette stratégie bloque l'activation des cellules effectrices T, alors qu'elle promeut l'activité suppressive des Treg *in vitro* (Poirier *et al.*, 2010). Par ailleurs, nous avons montré que le blocage sélectif de CD28 prévient la formation de synapses immunologiques stables entre les Teff et les CPA par un mécanisme CTLA-4 dépendant (Poirier *et al.*, 2010). Cependant, les propriétés pharmacocinétiques de sc28AT n'étant pas compatibles avec une application clinique, une nouvelle molécule issue du même anticorps parental a été développée, FR104 (brevet PCT/IB2011/050646) qui est sous forme d'un fragment Fab' humanisé et pégylé.

Ainsi, nous avons à nouveau étudié l'effet du blocage spécifique de CD28 en utilisant la molécule FR104. Tout comme sc28AT, FR104 prévient la formation de contacts stables entre

les Teff CD4⁺CD28⁺ (**Figure 1**) et les CPA (**Figure 4A**), induit une mobilité accrue de ces Teff (**Figure 4B**) et une diminution de leur activité cellulaire mesurée par le calcium (**Figures 6A et 6B**). Dans cette étude, nous montrons ainsi *in vitro* que le blocage sélectif de CD28 (par FR104) est différent du blocage de la voie ciblant CD80/86 puisque seul le blocage sélectif de CD28 permet d'empêcher la formation de synapse immunologique stable par un mécanisme CTLA-4 dépendant : le « reverse of the TCR-induced STOP signal » (H. Schneider *et al.*, 2006). La motilité accrue des lymphocytes T après engagement de CTLA-4, avec les molécules de CD80/86 des CPA, empêche ainsi la formation de ces synapses nécessaire à l'activation. Bien que cette augmentation de motilité lymphocytaire inhibe la formation de synapses immunologiques stables, les conséquences *in vivo* d'une motilité accrue des lymphocytes T demeurent mal connues. L'activation d'un lymphocyte T naïf requière-t-elle une interaction prolongée avec une seule CPA ou de multiples contacts brefs avec différentes CPA ? Une réponse à cette problématique a été apportée par la microscopie biphotonique *in vivo* : lors d'une réponse immune primaire, les lymphocytes T forment de longues interactions avec une ou plusieurs cellule(s) dendritique(s) et ont une très faible motilité. En revanche, dans des conditions de tolérance spécifique à un antigène, aucun « STOP » des lymphocytes T n'est observé, les lymphocytes T sont mobiles et forment des contacts très brefs avec de nombreuses CPA (Hugues *et al.*, 2004; Bouso, 2008). Il semble donc que des contacts stables soient nécessaires à l'initiation de la réponse lymphocytaire T, alors que des interactions brèves, multiples et continues semblent être une caractéristique des lymphocytes T dans des conditions tolérogènes.

Un point important a donc été d'analyser le comportement *in vitro* des cellules Treg dans ces expériences de Time-Lapse en présence de FR104. Ainsi, le blocage sélectif de CD28 empêcherait-il également les interactions prolongées entre les Treg et les CPA ? Pour cela nous avons généré des clones humains de cellules régulatrices de phénotype CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD28⁺CTLA-4⁺Foxp3⁺Helios⁻ (**Figure 1**) ayant préservé leur fonction suppressive (**Figure 2**). Nous montrons que contrairement aux Teff, le blocage sélectif de CD28 renforce les contacts entre les Treg et les CPA (**Figure 5A**) et induit une augmentation des flux calciques, se traduisant par une augmentation de l'activation des Treg (**Figures 6C et 6B**). Le blocage simultané de CD28 et CTLA-4 par leur anticorps antagonistes respectifs annule ces effets, suggérant un rôle important de CTLA-4 pour les Treg. Cependant, aucune différence n'a été observée sur la motilité des Treg en présence ou non de FR104 ou en condition FR104 + anti-CTLA-4 (**Figure 5B**). Ainsi, les mécanismes mis en jeu par les molécules CD28 et CTLA-4 ne seraient pas les mêmes entre les Teff et les Treg. Ces

résultats mettent donc en évidence un nouveau mécanisme pouvant expliquer nos résultats publiés en 2010. En effet, nous avons montré que la fonction suppressive des Treg n'est pas dépendante de CD28, mais de CTLA-4, et que le blocage de CD28 non seulement n'empêche pas la suppression par les Treg mais au contraire la renforce quand les Treg sont activés par des cellules dendritiques matures (Poirier *et al.*, 2010). Or, un des mécanismes connus pour la fonction suppressive des Treg est l'agrégation de ces cellules sur les CPA par un mécanisme CTLA-4 et LFA-1 dépendant (Tang & Krummel, 2006; Onishi *et al.*, 2008) ou Nr-1 dépendant (Sarris *et al.*, 2008), empêchant ainsi l'accès des lymphocytes T effecteurs aux CPA. Onishi et coll. ont proposé un mécanisme *in vitro* de suppression contact-dépendant des cellules Treg en 2 étapes : l'étape initiale dépendante de LFA-1 permettrait la formation des agrégats entre les Treg et les cellules dendritiques immatures ; la deuxième étape dépendante de LFA-1 (en partie) et de CTLA-4 réprimerait l'expression des molécules CD80/86 par les cellules dendritiques (Onishi *et al.*, 2008). De même, il a été montré que CTLA-4 induit une augmentation de l'expression de LFA-1 chez les Treg médiée par une protéine GTPase, Rap1 (H. Schneider *et al.*, 2005). Rap1, qui régule négativement l'activation cellulaire T, est activée par CTLA-4 alors qu'elle est inhibée par CD28 (Dillon *et al.*, 2005). Ainsi, en bloquant sélectivement CD28 et par conséquent préservant l'interaction CTLA-4/CD80-86, Rap1 serait alors activée et induirait, quant à elle, l'activation de LFA-1, augmentant ainsi l'adhésion des Treg.

Cependant, bien que les Teff expriment, comme les Treg, les molécules CD28, CTLA-4, LFA-1 et Rap1, le blocage spécifique de CD28 induit des effets opposés sur ces cellules. Un effet paradoxal est donc observé entre les Teff et les Treg, suggérant une utilisation ou une fonction différente de ces molécules dans les Teff et les Treg. La première différence concerne notamment l'expression de CTLA-4. CTLA-4 est constitutivement exprimée par les cellules Treg, alors que son expression à la surface des Teff n'apparaît qu'après activation. Pour approfondir le rôle de LFA-1 dans le blocage spécifique de CD28/CTLA-4, une étude de blocage de LFA-1 dans les différentes conditions de Time-Lapse est en cours, ainsi que l'analyse de l'expression et l'activation de Rap1 dans les Teff et les Treg. Par ailleurs, LFA-1 a la capacité de moduler son affinité par des modifications de conformation. LFA-1 existe ainsi sous trois formes : celle de faible, d'intermédiaire et de haute affinité (M. Shimaoka *et al.*, 2003). Bien que les configurations intermédiaires et de haute affinité de LFA-1 interagissent fortement avec ICAM-1, seule la haute affinité procure une interaction stable. Il serait intéressant d'analyser quelles formes sont exprimées par les Teff et les Treg. Par ailleurs, il a été montré que le recrutement de PKC- θ par CD28 au niveau de la synapse

immunologique des cellules Teff ne s'établissait pas chez les Treg (Zanin-Zhorov *et al.*, 2011), relatant ainsi une différence dans le rôle de CD28 chez ces 2 types cellulaires. L'étude des autres molécules recrutées à la surface par CTLA-4 et CD28, comme CARMA-1, ZAP70, SHP2, apporterait de plus amples renseignements dans la compréhension de la synapse immunologique aussi bien chez les Teff que les Treg. De plus, des expériences de microscopie confocale permettant de visualiser les molécules (comme CD28, CTLA-4, PKC- θ , CD80/86, LFA-1) au niveau de la synapse immunologique sont actuellement en cours et permettront ainsi de mettre en évidence tout changement éventuel de conformation au niveau de la synapse immune pouvant contribuer à la compréhension de nos résultats observés en Time-Lapse.

Enfin, nous montrons également dans cette étude que le blocage de la voie CD28/CD80-86/CTLA-4 par le CTLA4-Ig ou les anti-CD80/86, induit une importante augmentation du temps de contact entre Teff/CPA (**Figure 4A**) et une augmentation de la motilité des Treg (**Figure 5B**) par rapport aux conditions contrôle et FR104+anti-CTLA-4. Ces résultats suggèrent la participation d'autres molécules de costimulation, comme la molécule PD-L1. En effet, PD-L1, qui est exprimée constitutivement sur les lymphocytes T effecteurs et régulateurs, peut également se lier à la molécule CD80. Chez les Teff, l'interaction PD-L1/CD80 inhibe l'activation et la prolifération ainsi que la production de cytokines (Butte *et al.*, 2007). En ce qui concerne les Treg, le rôle de l'interaction PD-L1/CD80 au niveau des Treg n'est pas connu. Cependant, il est décrit que l'interaction de PD-L1 à son récepteur PD-1 est nécessaire au développement, à la survie et à la fonction des Treg induits (Francisco *et al.*, 2009). L'étude du blocage de PD-L1 en plus de celui de CD28 et CTLA-4 permettrait de d'établir pour la première fois un éventuel rôle de l'interaction PD-L1/CD80 au niveau des Treg.

Les expériences de Time-Lapse ont donc permis de montrer *in vitro* que les cellules humaines Teff et Treg ont un comportement opposé en présence de CPA. De la même façon, le blocage spécifique de CD28 par FR104 induit donc deux effets opposés sur leurs contacts avec les CPA et leur activation. Cette stratégie permet ainsi la mise en place de mécanismes immunomodulateurs passant par CTLA-4, contrairement aux stratégies bloquant CD80/86. Afin de compléter ces travaux, l'effet du blocage spécifique de CD28 *in vivo* sur les Teff et les Treg, notamment par microscopie biphotonique dans des modèles de souris transgéniques, semble être une étape importante. De plus, nous avons prévu d'étudier le comportement par Time-Lapse des Teff et Treg lorsque ces deux populations sont en même temps en contact

avec les CPA. Ces dernières expériences, nous permettront d'analyser les interactions Teff et Treg, et leur activation.

La stratégie d'inhibition sélective de CD28 permet ainsi d'inhiber l'activation des lymphocytes T tout en préservant la fonction suppressives des Treg, vraisemblablement en conservant la régulation dépendant de CTLA-4 et en empêchant l'extinction de la fonction suppressive des Treg en prévenant l'engagement de CD28 avec CD86. Il faut néanmoins rappeler que CD28 est nécessaire à la génération thymique et à la survie et prolifération en périphérie des Treg (Salomon *et al.*, 2000; Bour-Jordan & Blueston, 2002; Bluestone & Abbas, 2003). Une administration chronique pourrait donc s'avérer délétère sur le long-cours, d'autant plus que les Treg sont également dépendants de la sécrétion paracrine d'IL-2 par les lymphocytes T effecteurs en périphérie (Tai *et al.*, 2005; S. Sakaguchi *et al.*, 2008), en partie sous le contrôle de la signalisation de CD28 (C. B. Thompson *et al.*, 1989).

Une étude préclinique de la molécule FR104 dans la transplantation rénale chez le primate non-humain est actuellement en cours dans notre laboratoire. Des associations de cette molécule avec différents immunosuppresseurs (Tacrolimus, MMF, Rapamycine) seront également testées. Un premier essai clinique pourrait avoir lieu courant 2012 en fonction de nos résultats.

Conclusion

Conclusion

L'induction d'une régulation immunologique spécifique via une immunointervention innovante dans le but de protéger le greffon peut être une avancée considérable dans le domaine de la transplantation, mais qui reste pour l'essentiel au stade expérimental. En transplantation, des souris dépourvues de lymphocytes T sont capables de tolérer leur greffon, suggérant qu'ils sont les effecteurs majeurs du rejet de greffe (Bolton, Gracie et al. 1989). Afin d'activer un lymphocyte T de façon efficace, deux signaux sont nécessaires: un signal antigénique et un signal de costimulation. CD28 fait partie des molécules majeures nécessaires à l'induction du signal de costimulation. Nous avons abordé ce concept au cours de ce travail de thèse en étudiant une nouvelle stratégie thérapeutique, autour de deux problématiques différentes, dans un modèle *in vivo* chez le rat et un modèle *in vitro* chez l'homme. Dans notre équipe, notre stratégie a donc été de tester le blocage spécifique des interactions activatrices CD28/CD80-86, permettant ainsi la conservation des interactions inhibitrices CTLA-4/CD80-86 et des signaux régulateurs nécessaires à l'induction de la tolérance.

Dans une première partie, nous avons abordé cette stratégie dans un modèle d'allogreffe rénale, en utilisant un anticorps modulant anti-CD28, le clone JJ319. Bien que le CD28 semble être important pour le développement de cellules T régulatrices, le blocage de l'interaction CD28/CD80-86 par un anticorps anti-CD28 permet le développement de Treg et de MDSC dont le mécanisme de suppression a été étudié dans l'**Article 1**.

Outre leur action suppressive sur les lymphocytes T activés, ces MDSC du sang participent de manière indirecte à l'établissement de la tolérance par une collaboration avec les Treg. Elles participent à la réduction du taux de CCL-5 dans le sang par leur répression de l'expression de l'ARNm de CCL-5. Elles favorisent l'établissement d'un gradient de CCL-5 en faveur du greffon exprimant également cette chemokine. Les Treg exprimant le récepteur de CCL-5, CCR5, migreraient ainsi au niveau du greffon permettant l'établissement et le maintien de la tolérance.

Il reste cependant d'autres points intéressants à étudier et d'autres expérimentations à réaliser dans le but de comprendre plus précisément les mécanismes intervenant dans la sous-expression de CCL-5 et les mécanismes régulateurs de ces cellules, notamment par l'analyse des différentes interactions possibles entre lymphocytes T activés et MDSC. Par ailleurs,

l'analyse du transcriptome de ces cellules a permis d'identifier différents gènes pouvant être à l'origine de l'accumulation et de l'inhibition de maturation des MDSC dans le sang des animaux tolérants et appartenant à deux voies de signalisation : l'apoptose (pour Bcl2l12 et Dapk2) et la différenciation/maturation (pour LAT et LAX1). Ainsi, une étude approfondie de ces gènes est à prévoir.

Les résultats obtenus dans cette partie ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme régulateur induit par l'inhibition spécifique du CD28 dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat.

La deuxième partie de ce travail a consisté en l'étude d'un antagoniste sélectif de la molécule de costimulation CD28 (**Article 2**), FR104, développé par notre équipe, dans un modèle *in vitro* sur les lymphocytes T effecteurs et régulateurs humains.

Nous avons montré que seul le blocage sélectif de CD28 permet d'empêcher la formation de synapse immunologique stable par à un mécanisme CTLA-4-dépendant conduisant à l'augmentation de la motilité des lymphocytes T effecteurs. Contrairement aux observations faites avec les lymphocytes T effecteurs, ce blocage de CD28 renforce les interactions entre les lymphocytes T régulateurs et les cellules présentatrices de l'antigène, toujours de manière CTLA-4 dépendante. Cette stratégie, bloquant l'activation des lymphocytes T effecteurs, augmente l'activation des cellules T régulatrices. Bien que la molécule CD28 semble être importante dans le développement et l'homéostasie de ces cellules T régulatrices, nous montrons que le blocage sélectif de CD28 est compatible avec leur régulation, contrairement aux stratégies bloquant l'entièreté de la voie CD28/CD80-86/CTLA-4.

Ainsi, par ce travail de thèse des éléments nouveaux sont apportés quant aux rôles et mécanismes d'une nouvelle stratégie thérapeutique immunorégulatrice en transplantation qui permettent l'induction de tolérance dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rongeur. Enfin, avec la molécule FR104, nous abordons la modulation de la réponse immune via des régulations du système immunitaire lui-même et y apportons quelques réponses. Ces données s'insèrent dans un contexte scientifique où de nouvelles thérapies plus spécifiques devraient venir suppléer ou remplacer l'immunosuppression chimique chronique actuelle et ainsi réduire les nombreux effets toxiques pour les patients. Nous espérons donc que FR104 offrira grâce à ses propriétés immunomodulatrices un traitement de choix et de qualité pour les patients en transplantation.

Bibliographie

Bibliographie

- Aaltonen, J. *et al.*, 1994. *Nat. Genet*, 8(1), 83-87.
- Acuto, O. & Michel, F., 2003. *Nat. Rev. Immunol*, 3(12), 939-951.
- Adams, A.B. *et al.*, 2002. *Diabetes*, 51(2), 265-270.
- Adams, D.H. *et al.*, 1993. *Immunol. Rev*, 134, 5-19.
- Adeegbe, D. *et al.*, 2010. *Cell Transplant*.
- Aggarwal, S. & Pittenger, M.F., 2005. *Blood*, 105(4), 1815-1822.
- Agostinelli, E. & Seiler, N., 2006. *Amino Acids*, 31(3), 341-355.
- Akalin, E. *et al.*, 1996. *Transplantation*, 62(12), 1942-1945.
- Akl, A. *et al.*, 2008. *Transpl. Int*, 21(1), 65-73.
- Akl, A., Luo, S. & Wood, K.J., 2005. *Transpl. Immunol*, 14(3-4), 225-230.
- Alarcón, B., Mestre, D. & Martínez-Martín, N., 2011. *Immunology*, 133(4), 420-425.
- Albert, M.L. *et al.*, 1998. *J. Exp. Med*, 188(7), 1359-1368.
- Alegre, M.L. *et al.*, 1996. *J. Immunol*, 157(11), 4762-4770.
- Alexander-Miller, M.A. *et al.*, 1996. *J. Exp. Med*, 184(2), 485-492.
- Almand, B. *et al.*, 2001. *J. Immunol*, 166(1), 678-689.
- Anderson, G., Partington, K.M. & Jenkinson, E.J., 1998. *J. Immunol*, 161(12), 6599-6603.
- Anderson, M.S. *et al.*, 2002. *Science*, 298(5597), 1395-1401.
- Angulo, I. *et al.*, 2000. *Eur. J. Immunol*, 30(5), 1263-1271.
- Ansari, M.J.I. & Sayegh, M.H., 2004. *Kidney Int*, 65(5), 1560-1563.
- Arpinati, M. *et al.*, 2003. *Transpl. Immunol*, 11(3-4), 345-356.
- Asano, M. *et al.*, 1996. *J. Exp. Med*, 184(2), 387-396.
- Aschenbrenner, K. *et al.*, 2007. *Nat. Immunol*, 8(4), 351-358.
- Ashour, H.M. & Niederkorn, J.Y., 2006. *J. Immunol*, 177(12), 8331-8337.
- Ashton-Chess, J. *et al.*, 2007. *Transplantation*, 84(10), 1215-1219.
- Asselin-Paturel, C. *et al.*, 2001. *Nat. Immunol*, 2(12), 1144-1150.
- Auchincloss, H., Jr *et al.*, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90(8), 3373-3377.
- Augello, A. *et al.*, 2005. *Eur. J. Immunol*, 35(5), 1482-1490.
- Augello, A. *et al.*, 2007. *Arthritis Rheum*, 56(4), 1175-1186.
- Austyn, J.M. & Larsen, C.P., 1990. *Transplantation*, 49(1), 1-7.
- Azuma, H. *et al.*, 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 93(22), 12439-12444.
- Baan, C.C. *et al.*, 2005. *Transplantation*, 80(1), 110-117.
- Bacchetta, R. *et al.*, 2006. *J. Clin. Invest*, 116(6), 1713-1722.
- Baeten, D. *et al.*, 2006. *J. Am. Soc. Nephrol*, 17(1), 294-304.
- Baker, R.J. *et al.*, 2001. *Transplantation*, 72(3), 480-485.
- Ballet, C. *et al.*, 2006. *Am. J. Transplant*, 6(11), 2796-2801.
- Bartholomew, A. *et al.*, 2002. *Exp. Hematol*, 30(1), 42-48.
- Bashuda, H. *et al.*, 2005. *J. Clin. Invest*, 115(7), 1896-1902.
- Battaglia, M., Stabilini, A., Draghici, E., *et al.*, 2006. *Diabetes*, 55(1), 40-49.
- Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(12), 8338-8347.
- Bayry, J. *et al.*, 2005. *The Journal of Immunology*, 175(1), 15 -20.
- Benson, M.J. *et al.*, 2007. *J. Exp. Med*, 204(8), 1765-1774.
- Bentz, B.G., Haines, G.K., 3rd & Radosevich, J.A., 2000. *Head Neck*, 22(1), 64-70.
- Bestard, O. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 179(7), 4901-4909.
- Bevan, M.J., 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 74(5), 2094-2098.
- Beverly, B. *et al.*, 1992. *Int. Immunol*, 4(6), 661-671.
- Bingisser, R.M. *et al.*, 1998. *J. Immunol*, 160(12), 5729-5734.
- Blair, P.A. *et al.*, 2010. *Immunity*, 32(1), 129-140.
- Blair, P.J. *et al.*, 1998. *J. Immunol*, 160(1), 12-15.
- Le Blanc, K. *et al.*, 2004. *Scand. J. Immunol*, 60(3), 307-315.
- Blasius, A.L. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(5), 3260-3265.
- Blazar, B.R. *et al.*, 1996. *J. Immunol*, 157(8), 3250-3259.
- Blonska, M. & Lin, X., 2009. *Immunol. Rev*, 228(1), 199-211.
- Bloom, D.D. *et al.*, 2008. *Am. J. Transplant*, 8(4), 793-802.
- Bluestone, J.A. & Abbas, A.K., 2003. *Nat. Rev. Immunol*, 3(3), 253-257.
- Bluestone, J.A. *et al.*, 2008. *Am. J. Transplant*, 8(10), 2086-2096.
- Bobé, P. *et al.*, 1999. *Blood*, 94(3), 1028-1037.

- Bocelli-Tyndall, C. *et al.*, 2009. *Ann. Rheum. Dis*, 68(8), 1352-1359.
- van der Bogt, K.E.A. *et al.*, 2009. *Transplantation*, 87(5), 642-652.
- Boise, L.H. *et al.*, 1995. *Immunity*, 3(1), 87-98.
- Boissonnas, A. *et al.*, 2010. *Immunity*, 32(2), 266-278.
- Bojakowski, K. *et al.*, 2000. *Transplantation*, 70(1), 65-72.
- Boonen, G.J. *et al.*, 1999. *Eur. J. Immunol*, 29(3), 789-798.
- Boonstra, A. *et al.*, 2003. *J. Exp. Med*, 197(1), 101-109.
- Borsellino, G. *et al.*, 2007. *Blood*, 110(4), 1225-1232.
- Boulday, G. *et al.*, 2004. *Nephrol. Dial. Transplant*, 19(7), 1752-1760.
- Bouneaud, C., Kourilsky, P. & Bousso, P., 2000. *Immunity*, 13(6), 829-840.
- Bour-Jordan, H. & Blueston, J.A., 2002. *J. Clin. Immunol*, 22(1), 1-7.
- Bousso, P., 2008. *Nat. Rev. Immunol*, 8(9), 675-684.
- Bradley, L.M. *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 162(5), 2511-2520.
- Braudeau, C. *et al.*, 2007. *Transpl. Int*, 20(10), 845-855.
- Braun, D., Longman, R.S. & Albert, M.L., 2005. *Blood*, 106(7), 2375-2381.
- Brennan, D.C. *et al.*, 2006. *N. Engl. J. Med*, 355(19), 1967-1977.
- Brenner, M.B. *et al.*, 1986. *Nature*, 322(6075), 145-149.
- Brière, F. *et al.*, 2002. *Hum. Immunol*, 63(12), 1081-1093.
- Briskin, M. *et al.*, 1988. *Science*, 242(4881), 1036-1037.
- Brito, C. *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 162(6), 3356-3366.
- Bromley, S.K. *et al.*, 2001. *Nat. Immunol*, 2(12), 1159-1166.
- Bronte, V. & Zanovello, P., 2005. *Nat. Rev. Immunol*, 5(8), 641-654.
- Bronte, V. *et al.*, 2000. *Blood*, 96(12), 3838-3846.
- Bronte, V. *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 162(10), 5728-5737.
- Bronte, V. *et al.*, 2005. *J. Exp. Med*, 201(8), 1257-1268.
- Bronte, V. *et al.*, 2003. *Trends Immunol*, 24(6), 302-306.
- Bronte, V. *et al.*, 1998. *J. Immunol*, 161(10), 5313-5320.
- Brooks, J.C. & Hoskin, D.W., 1994. *Transplantation*, 58(10), 1096-1103.
- Brouard, S. *et al.*, 2011. *Transpl. Int*, 24(6), 536-547.
- Brouard, S. *et al.*, 2005. *Am. J. Transplant*, 5(2), 330-340.
- Brouard, S. *et al.*, 2007. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 104(39), 15448-15453.
- Bruder, D. *et al.*, 2004. *Eur. J. Immunol*, 34(3), 623-630.
- Brunkow, M.E. *et al.*, 2001. *Nat. Genet*, 27(1), 68-73.
- Buckland, M. *et al.*, 2006. *Am. J. Transplant*, 6(9), 2046-2059.
- Bühler, L.H. *et al.*, 2002. *Transplantation*, 74(10), 1405-1409.
- Bunt, S.K. *et al.*, 2007. *Cancer Res*, 67(20), 10019-10026.
- Burchill, M.A. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 178(1), 280-290.
- Butte, M.J. *et al.*, 2007. *Immunity*, 27(1), 111-122.
- Calne, R.Y. *et al.*, 1978. *The Lancet*, 312(8104), 1323-1327.
- Cao, W. & Bover, L., 2010. *Immunol. Rev*, 234(1), 163-176.
- Capone, M. *et al.*, 2001. *Blood*, 97(5), 1336-1342.
- Carreno, B.M. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 165(3), 1352-1356.
- Carrier, Y. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 178(1), 172-178.
- Carroll, R.G. *et al.*, 1997. *Science*, 276(5310), 273-276.
- Cauley, L.S. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 165(11), 6056-6066.
- La Cava, A., Van Kaer, L. & Fu-Dong-Shi, 2006. *Trends Immunol*, 27(7), 322-327.
- Cella, M. *et al.*, 2000. *Nat. Immunol*, 1(4), 305-310.
- Cemerski, S. & Shaw, A., 2006. *Curr. Opin. Immunol*, 18(3), 298-304.
- Chalmin, F. *et al.*, 2010. *J. Clin. Invest*, 120(2), 457-471.
- Chan, S.Y. *et al.*, 1995. *Transplantation*, 59(8), 1155-1161.
- Chandraker, A. *et al.*, 1998. *J. Clin. Invest*, 101(11), 2309-2318.
- Chang, C.C. *et al.*, 2002. *Nat. Immunol*, 3(3), 237-243.
- Chang, M.D. *et al.*, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90(2), 462-466.
- Chauveau, C. *et al.*, 2005. *Blood*, 106(5), 1694-1702.
- Chavez, H. *et al.*, 2007. *Transpl. Immunol*, 17(4), 243-248.
- Chen, L.C. *et al.*, 2009. *J. Immunol*, 183(6), 4094-4102.
- Chen, M.-L., Pittet, M.J., *et al.*, 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 102(2), 419-424.
- Chen, W., 2006. *Front. Biosci*, 11, 1360-1370.
- Chen, W. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 179(3), 1542-1548.
- Chen, W., Ford, M.S., Young, K.J. & Zhang, L., 2003. *Transplant. Proc*, 35(7), 2479-2480.

- Chen, W. *et al.*, 2004. *Cell. Mol. Immunol*, 1(5), 328-335.
- Chen, W., Ford, M.S., Young, K.J., Cybulsky, M.I., *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 170(4), 1846-1853.
- Chen, W., Jin, W. & Wahl, S.M., 1998. *J. Exp. Med.*, 188(10), 1849-1857.
- Chen, W., Jin, W., *et al.*, 2003. *J. Exp. Med.*, 198(12), 1875-1886.
- Chen, W., Zhou, D., *et al.*, 2005. *J. Immunol*, 175(5), 3409-3416.
- Chen, Y., Inobe, J. & Weiner, H.L., 1995. *J. Immunol*, 155(2), 910-916.
- Chen, Y. *et al.*, 1994. *Science*, 265(5176), 1237-1240.
- Chess, L. & Jiang, H., 2004. *Nat. Immunol*, 5(5), 469-471.
- Chuang, E. *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 162(3), 1270-1277.
- Cilio, C.M. *et al.*, 1998. *J. Exp. Med.*, 188(7), 1239-1246.
- Ciubotariu, R. *et al.*, 1998. *J. Immunol*, 161(10), 5193-5202.
- Cobbs, C.S. *et al.*, 2003. *Cancer Res*, 63(24), 8670-8673.
- Codarra, L. *et al.*, 2007. *J. Exp. Med.*, 204(7), 1533-1541.
- Collins, T. *et al.*, 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81(15), 4917-4921.
- Collison, L.W. *et al.*, 2007. *Nature*, 450(7169), 566-569.
- Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.-J., 2004. *Nat Immunol*, 5(12), 1219-1226.
- Colovai, A.I. *et al.*, 2003. *Hum. Immunol*, 64(1), 31-37.
- Colvin, R.B., 2007. *J. Am. Soc. Nephrol*, 18(4), 1046-1056.
- Coombes, J.L. *et al.*, 2007. *J. Exp. Med.*, 204(8), 1757-1764.
- Corcione, A. *et al.*, 2006. *Blood*, 107(1), 367-372.
- Coudronniere, N. *et al.*, 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(7), 3394-3399.
- Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J., 2002. *Curr. Opin. Immunol*, 14(6), 771-778.
- Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J., 2009. *Immunity*, 30(5), 626-635.
- Curotto de Lafaille, M.A. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 173(12), 7259-7268.
- Curotto de Lafaille, M.A. *et al.*, 2001. *J. Exp. Med.*, 194(9), 1349-1359.
- Dai, H. *et al.*, 2010. *J. Immunol*, 185(2), 803-807.
- Dairou, J., Dupret, J.-M. & Rodrigues-Lima, F., 2005. *FEBS Lett*, 579(21), 4719-4723.
- Daniel, C., Horvath, S. & Allen, P.M., 1998. *Immunity*, 8(5), 543-552.
- DAUSSET, J., 1958. *Acta Haematol*, 20(1-4), 156-166.
- DAUSSET, J. & NENNA, A., 1952. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 146(19-20), 1539-1541.
- Deans, R.J. & Moseley, A.B., 2000. *Exp. Hematol*, 28(8), 875-884.
- Degauque, N. *et al.*, 2007. *Eur. J. Immunol*, 37(1), 147-156.
- Degauque, N. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 176(7), 3915-3922.
- Degermann, S. *et al.*, 1994. *J. Immunol*, 152(7), 3254-3263.
- Dengler, T.J. *et al.*, 1999. *Transplantation*, 67(3), 392-398.
- Derbinski, J. *et al.*, 2005. *J. Exp. Med.*, 202(1), 33-45.
- Devergne, O. *et al.*, 1994. *J. Exp. Med.*, 179(5), 1689-1694.
- Dhein, J. *et al.*, 1995. *Nature*, 373(6513), 438-441.
- Diehn, M. *et al.*, 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(18), 11796-11801.
- Dikow, R. *et al.*, 2010. *Transplantation*, 90(7), 771-776.
- Dilek, N. *et al.*, 2010. *Curr Opin Organ Transplant*.
- Dillon, T.J. *et al.*, 2005. *Mol. Cell. Biol*, 25(10), 4117-4128.
- Dominici, M. *et al.*, 2006. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Dong, C., Davis, R.J. & Flavell, R.A., 2002. *Annu. Rev. Immunol*, 20, 55-72.
- Dong, V.M., Yuan, X., *et al.*, 2002. *Transplantation*, 73(8), 1310-1317.
- Douagi, I. *et al.*, 2009. *J. Immunol*, 182(4), 1991-2001.
- Dubois, B., Massacrier, C. & Caux, C., 2001. *J. Leukoc. Biol*, 70(4), 633-641.
- Dufrane, D., Goebbels, R.-M. & Gianello, P., 2010. *Transplantation*, 90(10), 1054-1062.
- Dugast, A.-S. & Vanhove, B., 2009. *Clin. Exp. Immunol*, 156(1), 25-34.
- Dugast, A.-S. *et al.*, 2008. *J. Immunol*, 180(12), 7898-7906.
- Dustin, M.L. *et al.*, 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(8), 3909-3913.
- Dzionic, A. *et al.*, 2002. *Hum. Immunol*, 63(12), 1133-1148.
- Dzionic, A. *et al.*, 2001. *J. Exp. Med.*, 194(12), 1823-1834.
- Egen, J.G. & Allison, J.P., 2002. *Immunity*, 16(1), 23-35.
- Egerton, M., Scollay, R. & Shortman, K., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87(7), 2579-2582.
- Ekmekcioglu, S. *et al.*, 2000. *Clin. Cancer Res*, 6(12), 4768-4775.
- Endharti, A.T. *et al.*, 2011. *J. Immunol*, 186(1), 41-52.
- Evans, J.G. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 178(12), 7868-7878.
- Ezernitchi, A.V. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(7), 4763-4772.
- Facchetti, F. *et al.*, 1999. *Am. J. Pathol*, 154(4), 1037-1046.

- Fallarino, F. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 173(6), 3748-3754.
- Fallarino, F. *et al.*, 2007. *Curr. Drug Metab*, 8(3), 209-216.
- Fallarino, F. *et al.*, 2003. *Nat. Immunol*, 4(12), 1206-1212.
- Fan, K. *et al.*, 2007. *Transplantation*, 84(6), 746-754.
- Fangmann, J., Dalchau, R. & Fabre, J.W., 1992. *J. Exp. Med*, 175(6), 1521-1529.
- Feng, X. *et al.*, 2008. *Blood*, 111(7), 3675-3683.
- Ferkol, T. *et al.*, 2000. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 161(3 Pt 1), 944-951.
- Feske, S., 2007. *Nat. Rev. Immunol*, 7(9), 690-702.
- Fibbe, W.E., Nauta, A.J. & Roelofs, H., 2007. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1106, 272-278.
- Filaci, G. & Suciú-Foca, N., 2002. *Autoimmun Rev*, 1(5), 279-283.
- Fillatreau, S., Gray, D. & Anderton, S.M., 2008. *Nat. Rev. Immunol*, 8(5), 391-397.
- Fillatreau, S. *et al.*, 2002. *Nat. Immunol*, 3(10), 944-950.
- Fischer, K. *et al.*, 2005. *Blood*, 105(7), 2828-2835.
- Fisher, G.H. *et al.*, 1995. *Cell*, 81(6), 935-946.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y., 2003. *Nat. Immunol*, 4(4), 330-336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., *et al.*, 2005. *Nat. Immunol*, 6(11), 1142-1151.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., *et al.*, 2005. *Immunity*, 22(3), 329-341.
- Ford, M.S. *et al.*, 2007. *Eur. J. Immunol*, 37(8), 2234-2241.
- Francisco, L.M. *et al.*, 2009. *J. Exp. Med*, 206(13), 3015-3029.
- Friedenstein, A.J. *et al.*, 1968. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
- Fu, F. *et al.*, 1996. *Transplantation*, 62(5), 659-665.
- Fukaura, H., Kent, S.C., Pietruszewicz, M.J., Khoury, S.J., Weiner, H.L. & Hafler, D.A., 1996a. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 778, 251-257.
- Fukaura, H., Kent, S.C., Pietruszewicz, M.J., Khoury, S.J., Weiner, H.L. & Hafler, D.A., 1996b. *J. Clin. Invest*, 98(1), 70-77.
- Fuller, D.M. & Zhang, W., 2009. *Immunol. Rev*, 232(1), 72-83.
- Furtado, G.C. *et al.*, 2002. *J. Exp. Med*, 196(6), 851-857.
- Furtado, G.C. *et al.*, 2001. *Immunol. Rev*, 182, 122-134.
- Gabrilovich, D., 2004. *Nat. Rev. Immunol*, 4(12), 941-952.
- Gabrilovich, D.I., 2007. *Curr. Cancer Drug Targets*, 7(1), 1.
- Gabrilovich, D.I. *et al.*, 2001. *J. Immunol*, 166(9), 5398-5406.
- Gallegos, A.M. & Bevan, M.J., 2004. *J. Exp. Med*, 200(8), 1039-1049.
- Gallina, G. *et al.*, 2006. *J. Clin. Invest*, 116(10), 2777-2790.
- Gao, J.F. *et al.*, *European Journal of Immunology*.
- Gao, W. *et al.*, 2007. *Am. J. Transplant*, 7(7), 1722-1732.
- García, M.R. *et al.*, 2010. *J. Clin. Invest*, 120(7), 2486-2496.
- Garín, M.I. *et al.*, 2007. *Blood*, 109(5), 2058-2065.
- Gavin, M.A. *et al.*, 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(17), 6659-6664.
- Gershon, R.K. & Kondo, K., 1970. *Immunology*, 18(5), 723-737.
- Gershon, R.K. & Kondo, K., 1971. *Immunology*, 21(6), 903-914.
- Ghansah, T. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 173(12), 7324-7330.
- Ghiringhelli, F. *et al.*, 2005. *J. Exp. Med*, 202(8), 1075-1085.
- Giordani, L. *et al.*, 2009. *J. Leukoc. Biol*, 86(2), 261-271.
- Glennie, S. *et al.*, 2005. *Blood*, 105(7), 2821-2827.
- Goerdts, S. & Orfanos, C.E., 1999. *Immunity*, 10(2), 137-142.
- Goldrath, A.W. & Bevan, M.J., 1999. *Nature*, 402(6759), 255-262.
- Goldrath, A.W. *et al.*, 2002. *J. Exp. Med*, 195(12), 1515-1522.
- Gomes, N.A. *et al.*, 2000. *The Journal of Immunology*, 164(4), 2001-2008.
- Goñi, O., Alcaide, P. & Fresno, M., 2002. *Int. Immunol*, 14(10), 1125-1134.
- Goodnow, C.C., 2007. *Cell*, 130(1), 25-35.
- Gordon, S., 2003. *Nat. Rev. Immunol*, 3(1), 23-35.
- Graca, L. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 168(11), 5558-5565.
- Graf, B., Bushnell, T. & Miller, J., 2007. *J. Immunol*, 179(3), 1616-1624.
- Grakoui, A. *et al.*, 1999. *Science*, 285(5425), 221-227.
- Gray, D.H.D. *et al.*, 2006. *Blood*, 108(12), 3777-3785.
- Greenwald, R.J. *et al.*, 2001. *Immunity*, 14(2), 145-155.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H., 2005. *Annu. Rev. Immunol*, 23, 515-548.
- Grohmann, U. *et al.*, 2002. *Nat. Immunol*, 3(11), 1097-1101.
- Gröne, H.J. *et al.*, 1999. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 83, 205-211.
- Grossman, W.J. *et al.*, 2004. *Immunity*, 21(4), 589-601.

- Grouard, G. *et al.*, 1997. *J. Exp. Med.*, 185(6), 1101-1111.
- Groux, H. *et al.*, 1998. *J. Immunol.*, 160(7), 3188-3193.
- Groux, H. *et al.*, 1997. *Nature*, 389(6652), 737-742.
- Guidos, C., 2006. *Immunol. Rev.*, 209, 5-9.
- Guillonneau, C. *et al.*, 2005. *Transplantation*, 80(4), 546-554.
- Guillonneau, C., Hill, M., *et al.*, 2007. *J. Clin. Invest.*, 117(4), 1096-1106.
- Guillonneau, C., Séveno, C., *et al.*, 2007. *J. Immunol.*, 179(12), 8164-8171.
- Habicht, A. *et al.*, 2007. *Am. J. Transplant.*, 7(12), 2683-2692.
- Hadeiba, H. *et al.*, 2008. *Nat. Immunol.*, 9(11), 1253-1260.
- Halamay, K.E. *et al.*, 2002. *Cell. Immunol.*, 216(1-2), 6-14.
- Hanson, E.M. *et al.*, 2009. *J. Immunol.*, 183(2), 937-944.
- Hara, S. *et al.*, 2009. *Hematology*, 14(3), 150-158.
- Harari, O. & Liao, J.K., 2004. *Curr. Pharm. Des.*, 10(8), 893-898.
- Harding, F.A. *et al.*, 1992. *Nature*, 356(6370), 607-609.
- Harrison, L.C. *et al.*, 1996. *J. Exp. Med.*, 184(6), 2167-2174.
- Haspot, F. *et al.*, 2005. *Am. J. Transplant.*, 5(10), 2339-2348.
- Haspot, F. *et al.*, 2002. *Blood*, 99(6), 2228-2234.
- Hayashi, K. & Altman, A., 2007. *Pharmacol. Res.*, 55(6), 537-544.
- Hayday, A. & Tigelaar, R., 2003. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(3), 233-242.
- Herold, K.C. *et al.*, 1997. *J. Immunol.*, 159(9), 4150-4153.
- Herrera, O.B. *et al.*, 2004. *J. Immunol.*, 173(8), 4828-4837.
- Highfill, S.L. *et al.*, 2010. *Blood*, 116(25), 5738-5747.
- Hill, M. *et al.*, 2011. *Am J Transplant.*
- Hillhouse, E.E. *et al.*, 2010. *Immunol. Cell Biol.*, 88(8), 771-780.
- Hochrein, H., O'Keefe, M. & Wagner, H., 2002. *Hum. Immunol.*, 63(12), 1103-1110.
- Hoechst, B. *et al.*, 2008. *Gastroenterology*, 135(1), 234-243.
- Hogquist, K.A. & Bevan, M.J., 1996. *Semin. Immunol.*, 8(2), 63-68.
- Hölscher, C. *et al.*, 2001. *J. Immunol.*, 167(12), 6957-6966.
- Holt, P.G., Schon-Hegrad, M.A. & Oliver, J., 1988. *J. Exp. Med.*, 167(2), 262-274.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S., 2003. *Science*, 299(5609), 1057-1061.
- Hornick, P.I. *et al.*, 2000. *Circulation*, 101(20), 2405-2410.
- Hornick, P.I. *et al.*, 1998. *Circulation*, 97(13), 1257-1263.
- Hsieh, C.-S. *et al.*, 2004. *Immunity*, 21(2), 267-277.
- Huang, B. *et al.*, 2006. *Cancer Res.*, 66(2), 1123-1131.
- Huang, C.-T. *et al.*, 2004. *Immunity*, 21(4), 503-513.
- Huang, J.F. *et al.*, 1999. *Science*, 286(5441), 952-954.
- Huang, X. *et al.*, 2008. *Transplantation*, 85(5), 675-680.
- Hugues, S. *et al.*, 2004. *Nat. Immunol.*, 5(12), 1235-1242.
- Huppa, J.B. & Davis, M.M., 2003. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(12), 973-983.
- Hutloff, A. *et al.*, 1999. *Nature*, 397(6716), 263-266.
- Inaba, K. *et al.*, 1998. *J. Exp. Med.*, 188(11), 2163-2173.
- Ishikawa, S. *et al.*, 2001. *J. Exp. Med.*, 193(12), 1393-1402.
- Itoh, M. *et al.*, 1999. *J. Immunol.*, 162(9), 5317-5326.
- Itoh, Y. & Germain, R.N., 1997. *J. Exp. Med.*, 186(5), 757-766.
- Jahnsen, F.L. *et al.*, 2000. *J. Immunol.*, 165(7), 4062-4068.
- Jankovic, D. *et al.*, 1998. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(4), 619-629.
- Jenkins, M.K. & Schwartz, R.H., 1987. *J. Exp. Med.*, 165(2), 302-319.
- Jiang, S., Herrera, O. & Lechler, R.I., 2004. *Curr. Opin. Immunol.*, 16(5), 550-557.
- Jiang, S. *et al.*, 1998. *Hum. Immunol.*, 59(11), 690-699.
- Jiang, X., Shimaoka, T., *et al.*, 2005. *J. Immunol.*, 175(4), 2051-2055.
- Jiang, X.-X., Zhang, Y., *et al.*, 2005. *Blood*, 105(10), 4120-4126.
- Jin, L.-P. *et al.*, 2005. *J. Reprod. Immunol.*, 65(2), 133-146.
- Joffre, O. *et al.*, 2008. *Nat. Med.*, 14(1), 88-92.
- de Jong, E.C., Smits, H.H. & Kapsenberg, M.L., 2005. *Springer Semin. Immunopathol.*, 26(3), 289-307.
- Jonuleit, H. *et al.*, 2000. *J. Exp. Med.*, 192(9), 1213-1222.
- Josien, R. *et al.*, 1998. *J. Clin. Invest.*, 102(11), 1920-1926.
- Kadowaki, N., 2007. *Allergol Int.*, 56(3), 193-199.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M., 1994. *Eur. J. Immunol.*, 24(12), 3068-3072.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., *et al.*, 1994. *Nature*, 369(6475), 31-37.

- Kägi, D. *et al.*, 1996. *Annu. Rev. Immunol*, 14, 207-232.
- Kägi, D. *et al.*, 1994. *Science*, 265(5171), 528-530.
- Kahan, B.D., Rajagopalan, P.R. & Hall, M., 1999. *Transplantation*, 67(2), 276-284.
- Kameyoshi, Y. *et al.*, 1992. *J. Exp. Med.*, 176(2), 587-592.
- Kane, L.P. *et al.*, 2001. *Nat. Immunol*, 2(1), 37-44.
- Karandikar, N.J. *et al.*, 1998. *J. Neuroimmunol*, 89(1-2), 10-18.
- Karim, M., Bushell, A.R. & Wood, K.J., 2002. *Curr. Opin. Immunol*, 14(5), 584-591.
- Kawai, T. *et al.*, 1995. *Transplantation*, 59(2), 256-262.
- Kawai, T. *et al.*, 2008. *N. Engl. J. Med.*, 358(4), 353-361.
- Kawai, T. *et al.*, 1999. *Oncogene*, 18(23), 3471-3480.
- Kawamoto, A. *et al.*, 2003. *Circulation*, 107(3), 461-468.
- Kearney, E.R. *et al.*, 1994. *Immunity*, 1(4), 327-339.
- Kehrl, J.H. *et al.*, 1986. *J. Exp. Med.*, 163(5), 1037-1050.
- Khan, Q. *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 162(10), 5860-5867.
- Khattari, R. *et al.*, 2003. *Nat. Immunol*, 4(4), 337-342.
- Kim, K.S. *et al.*, 2001. *Am. J. Pathol*, 158(3), 977-986.
- Kinnula, V.L. *et al.*, 2004. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 31(2), 147-153.
- Kirk, A.D. *et al.*, 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(16), 8789-8794.
- Kirk, A.D. *et al.*, 2001. *Transplantation*, 72(3), 377-384.
- Kissmeyer-Nielsen, F. *et al.*, 1966. *Lancet*, 2(7465), 662-665.
- Kiyomoto, T. *et al.*, 2005. *Transplantation*, 80(12), 1749-1755.
- Klein, L. *et al.*, 2000. *Nat. Med*, 6(1), 56-61.
- Kobayashi, K., Kaneda, K. & Kasama, T., 2001. *Microsc. Res. Tech.*, 53(4), 241-245.
- Koh, D.R. *et al.*, 1992. *Science*, 256(5060), 1210-1213.
- Kohrt, H.E. *et al.*, 2010. *Eur. J. Immunol*, 40(7), 1862-1869.
- Krampera, M. *et al.*, 2006. *Stem Cells*, 24(2), 386-398.
- Krampera, M. *et al.*, 2003. *Blood*, 101(9), 3722-3729.
- Kreisel, D., Krupnick, A.S., Balsara, K.R., *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 169(11), 6154-6161.
- Kreisel, D., Krupnick, A.S., Gelman, A.E., *et al.*, 2002. *Nat. Med*, 8(3), 233-239.
- Kretschmer, K. *et al.*, 2005. *Nat. Immunol*, 6(12), 1219-1227.
- Kronenberg, M., 2005. *Annu. Rev. Immunol*, 23, 877-900.
- Kronin, V. *et al.*, 1996. *J. Immunol*, 157(9), 3819-3827.
- Kronin, V. *et al.*, 2000. *Int. Immunol*, 12(5), 731-735.
- Krummel, M.F. & Allison, J.P., 1996. *J. Exp. Med.*, 183(6), 2533-2540.
- Kryczek, I. *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(1), 40-44.
- Kuroda, N. *et al.*, 2005. *J. Immunol*, 174(4), 1862-1870.
- Kurts, C. *et al.*, 1997. *J. Exp. Med.*, 186(2), 239-245.
- Kurts, C. *et al.*, 1998. *J. Exp. Med.*, 188(2), 409-414.
- Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I., 2003. *J. Leukoc. Biol.*, 74(2), 186-196.
- Kusmartsev, S. *et al.*, 2003. *Cancer Res*, 63(15), 4441-4449.
- Kusmartsev, S., Nagaraj, S. & Gabrilovich, D.I., 2005. *J. Immunol*, 175(7), 4583-4592.
- Kusmartsev, S. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 172(2), 989-999.
- Kusmartsev, S.A., Li, Y. & Chen, S.H., 2000. *J. Immunol*, 165(2), 779-785.
- Kyewski, B. & Derbinski, J., 2004. *Nat. Rev. Immunol*, 4(9), 688-698.
- Lafferty, K.J. *et al.*, 1976. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 54(6), 573-586.
- Lakkis, F.G. *et al.*, 2000. *Nat. Med*, 6(6), 686-688.
- Lan, Z. *et al.*, 2010. *Transplantation*, 90(12), 1278-1285.
- Lanzavecchia, A., Lezzi, G. & Viola, A., 1999. *Cell*, 96(1), 1-4.
- Lapteva, N. & Huang, X.F., 2010. *Expert Opin Biol Ther*, 10(5), 725-733.
- Larsen, C.P. *et al.*, 1996. *Nature*, 381(6581), 434-438.
- Larsen, C.P. *et al.*, 2005. *Am. J. Transplant*, 5(3), 443-453.
- Laskowski, I.A. *et al.*, 2002. *J. Am. Soc. Nephrol*, 13(2), 519-527.
- Latchman, Y. *et al.*, 2001. *Nat. Immunol*, 2(3), 261-268.
- Läubli, H., Spanaus, K.-S. & Borsig, L., 2009. *Blood*, 114(20), 4583-4591.
- Laufer, T.M. *et al.*, 1996. *Nature*, 383(6595), 81-85.
- Lechler, R.I. & Batchelor, J.R., 1982. *J. Exp. Med.*, 155(1), 31-41.
- Lee, G.K. *et al.*, 2002. *Immunology*, 107(4), 452-460.
- Lee, K.M. *et al.*, 1998. *Science*, 282(5397), 2263-2266.
- Lee, R.S. *et al.*, 1994. *J. Exp. Med.*, 179(3), 865-872.
- Lee, Y.-H. *et al.*, 2008. *J. Immunol*, 180(2), 825-832.

- Legge, K.L. *et al.*, 2002. *J. Exp. Med.*, 196(2), 217-227.
- Lejeune, P. *et al.*, 1994. *J. Immunol.*, 152(10), 5077-5083.
- Li, Q., Pan, P.-Y., *et al.*, 2004. *Cancer Res.*, 64(3), 1130-1139.
- Li, R. *et al.*, 2007. *J. Immunol.*, 179(8), 5191-5203.
- Li, X.C., Li, Y., *et al.*, 1999. *J. Immunol.*, 163(5), 2500-2507.
- Li, X.L. *et al.*, 2010. *J. Immunol.*, 185(2), 823-833.
- Li, Y., Hu, J., *et al.*, 2004. *EMBO J.*, 23(5), 1112-1122.
- Li, Y., Li, X.C., *et al.*, 1999. *Nat. Med.*, 5(11), 1298-1302.
- Li, Y. *et al.*, 2008. *Transplantation*, 86(12), 1837-1843.
- Liang, B., Workman, C., *et al.*, 2008. *J. Immunol.*, 180(9), 5916-5926.
- Liang, S., Ristich, V., *et al.*, 2008. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(24), 8357-8362.
- Liblau, R. *et al.*, 1991. *Eur. J. Immunol.*, 21(6), 1391-1395.
- Liblau, R.S. *et al.*, 1994. *Immunol. Rev.*, 142, 193-208.
- Lim, D.-G. *et al.*, 2007. *Transpl. Immunol.*, 18(2), 94-100.
- Lin, H. *et al.*, 1993. *J. Exp. Med.*, 178(5), 1801-1806.
- Lin, X. *et al.*, 2000. *Mol. Cell. Biol.*, 20(8), 2933-2940.
- Lin, Y.-X. *et al.*, 2009. *Transplant. Proc.*, 41(10), 4229-4231.
- Lindahl, K.F. & Wilson, D.B., 1977. *J. Exp. Med.*, 145(3), 508-522.
- Linsley, P.S. *et al.*, 1996. *Immunity*, 4(6), 535-543.
- Liston, A. *et al.*, 2003. *Nat. Immunol.*, 4(4), 350-354.
- Liu, Q. *et al.*, 1999. *Genes Dev.*, 13(7), 786-791.
- Liu, W. *et al.*, 2006. *J. Exp. Med.*, 203(7), 1701-1711.
- Liu, X.C. *et al.*, 2011. *Transplant. Proc.*, 43(5), 1962-1966.
- Liu, Y. *et al.*, 2007. *Transplant. Proc.*, 39(10), 3396-3403.
- Liu, Y. *et al.*, 2008. *Nat. Immunol.*, 9(6), 632-640.
- Liu, Z. *et al.*, 1996. *J. Clin. Invest.*, 98(5), 1150-1157.
- Liu, Z. *et al.*, 1998. *Int. Immunol.*, 10(6), 775-783.
- Lohmann, T., Leslie, R.D. & Londei, M., 1996. *J. Autoimmun.*, 9(3), 385-389.
- Long, S.A. & Buckner, J.H., 2008. *J. Autoimmun.*, 30(4), 293-302.
- Lopez, M. *et al.*, 2006. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17(10), 2844-2853.
- Lou, Y. *et al.*, 2007. *J. Immunol.*, 178(3), 1534-1541.
- Louis, J. *et al.*, 1998. *Curr. Opin. Immunol.*, 10(4), 459-464.
- Louis, S. *et al.*, 2006. *Transplantation*, 81(3), 398-407.
- Louvet, C. *et al.*, 2004. *Transplantation*, 78(9), 1259-1266.
- Lu, L. *et al.*, 2001. *J. Immunol.*, 166(12), 7042-7052.
- Lusso, P. *et al.*, 1995. *J. Exp. Med.*, 181(4), 1303-1310.
- Lutz, M.B. & Schuler, G., 2002. *Trends Immunol.*, 23(9), 445-449.
- Lutz, M.B. *et al.*, 2000. *Eur. J. Immunol.*, 30(7), 1813-1822.
- Macián, F. *et al.*, 2002. *Cell*, 109(6), 719-731.
- Maeda, Y. *et al.*, 2005. *Blood*, 106(2), 749-755.
- Magnani, C.F. *et al.*, 2011. *Eur. J. Immunol.*, 41(6), 1652-1662.
- Maier, T., Holda, J.H. & Claman, H.N., 1989. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 288, 235-244.
- Makarenkova, V.P. *et al.*, 2006. *J. Immunol.*, 176(4), 2085-2094.
- Makrigiannakis, A. *et al.*, 2001. *Nat. Immunol.*, 2(11), 1018-1024.
- Manavalan, J.S. *et al.*, 2003. *Transpl. Immunol.*, 11(3-4), 245-258.
- Mann, M.K. *et al.*, 2007. *J. Immunol.*, 178(6), 3447-3456.
- Mantovani, G. *et al.*, 2003. *J. Mol. Med.*, 81(10), 664-673.
- Marengère, L.E. *et al.*, 1996. *Science*, 272(5265), 1170-1173.
- Marie, J.C. *et al.*, 2005. *J. Exp. Med.*, 201(7), 1061-1067.
- Marigo, I. *et al.*, 2010. *Immunity*, 32(6), 790-802.
- Markiewski, M.M. *et al.*, 2008. *Nat. Immunol.*, 9(11), 1225-1235.
- Marra, L.E. *et al.*, 2004. *J. Immunol.*, 172(2), 1028-1035.
- Marshall, M.A. *et al.*, 2001. *Microbes Infect.*, 3(13), 1051-1061.
- Martin, M. *et al.*, 2001. *J. Exp. Med.*, 194(11), 1675-1681.
- Martín, P. *et al.*, 2002. *Blood*, 100(2), 383-390.
- de Martin, R. *et al.*, 1993. *EMBO J.*, 12(7), 2773-2779.
- Martínez-Llordella, M. *et al.*, 2007. *Am. J. Transplant.*, 7(2), 309-319.
- Mason, P.D., Robinson, C.M. & Lechler, R.I., 1996. *Kidney Int.*, 50(3), 1019-1025.
- Mathioudaki, K. *et al.*, 2004. *Biol. Chem.*, 385(9), 779-783.
- Matsushita, T. *et al.*, 2008. *J. Clin. Invest.*, 118(10), 3420-3430.

- Mattarollo, S.R. *et al.*, 2010. *J. Immunol*, 184(10), 5663-5669.
- Mazzoni, A. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 168(2), 689-695.
- McGeachy, M.J., Stephens, L.A. & Anderton, S.M., 2005. *J. Immunol*, 175(5), 3025-3032.
- Meisel, R. *et al.*, 2004. *Blood*, 103(12), 4619-4621.
- Melani, C. *et al.*, 2003. *Blood*, 102(6), 2138-2145.
- Melero, I., Bach, N. & Chen, L., 1997. *Life Sci*, 60(23), 2035-2041.
- Mellor, A.L. & Munn, D.H., 2004. *Nat. Rev. Immunol*, 4(10), 762-774.
- Mellstedt, H. *et al.*, 1999. *Curr. Opin. Hematol*, 6(3), 169-175.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E. & Von Andrian, U.H., 2004. *Nature*, 427(6970), 154-159.
- Ménager-Marcq, I. *et al.*, 2006. *Gastroenterology*, 131(6), 1775-1785.
- Mencacci, A. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 169(6), 3180-3190.
- MERRILL, J.P. *et al.*, 1956. *J Am Med Assoc*, 160(4), 277-282.
- Michie, A.M. *et al.*, 2010. *FEBS J*, 277(1), 74-80.
- MICHON, L. *et al.*, 1953. *Presse Med*, 61(70), 1419-1423.
- Miller, J.F., 1975. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 194, 55-76.
- Miller, J.F.A.P., 2002. *Immunol. Rev*, 185, 7-14.
- Mills, C.D. *et al.*, 1992. *J. Immunol*, 149(8), 2709-2714.
- Minamimura, K., Gao, W. & Maki, T., 2006. *J. Immunol*, 176(7), 4125-4132.
- Mizoguchi, E. *et al.*, 2000. *Int. Immunol*, 12(5), 597-605.
- Le Moine, A., Goldman, M. & Abramowicz, D., 2002. *Transplantation*, 73(9), 1373-1381.
- Mombaerts, P. *et al.*, 1993. *Nature*, 365(6441), 53-56.
- Monk, N.J. *et al.*, 2003. *Nat. Med*, 9(10), 1275-1280.
- Monks, C.R. *et al.*, 1998. *Nature*, 395(6697), 82-86.
- Moore, K.W. *et al.*, 2001. *Annu. Rev. Immunol*, 19, 683-765.
- Morgan, M.E. *et al.*, 2005. *Hum. Immunol*, 66(1), 13-20.
- Morón, G., Dadaglio, G. & Leclerc, C., 2004. *Trends Immunol*, 25(2), 92-97.
- Morris, A. & Möller, G., 1968. *J. Immunol*, 101(3), 439-445.
- Moseman, E.A. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 173(7), 4433-4442.
- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L., 1989. *Annu. Rev. Immunol*, 7, 145-173.
- Mosmann, T.R. & Sad, S., 1996. *Immunol. Today*, 17(3), 138-146.
- Mosmann, T.R. *et al.*, 1986. *J. Immunol*, 136(7), 2348-2357.
- Moulin, V. *et al.*, 2000. *J. Exp. Med*, 192(4), 475-482.
- Movahedi, K. *et al.*, 2008. *Blood*, 111(8), 4233-4244.
- Mues, B. *et al.*, 1989. *Immunology*, 67(3), 303-307.
- Munder, M. *et al.*, 1999. *J. Immunol*, 163(7), 3771-3777.
- Munn, D.H. *et al.*, 2004. *J. Clin. Invest*, 114(2), 280-290.
- Munn, D.H. *et al.*, 2002. *Science*, 297(5588), 1867-1870.
- Nagaraj, S. *et al.*, 2007. *Nat Med*, 13(7), 828-835.
- Najafian, N. *et al.*, 2003. *J. Clin. Invest*, 112(7), 1037-1048.
- Nakamura, Y. *et al.*, 2006. *Clin. Cancer Res*, 12(4), 1201-1207.
- Nakashima, S. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 169(8), 4620-4627.
- Nashan, B. *et al.*, 1997. *Lancet*, 350(9086), 1193-1198.
- Nauta, A.J. & Fibbe, W.E., 2007. *Blood*, 110(10), 3499-3506.
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(4), 2080-2087.
- Nauta, A.J., Westerhuis, G., *et al.*, 2006. *Blood*, 108(6), 2114-2120.
- Navarrete, A.-M. *et al.*, 2011. *Vaccine*, 29(15), 2649-2652.
- Nefedova, Y. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 172(1), 464-474.
- Negulescu, P.A. *et al.*, 1996. *Immunity*, 4(5), 421-430.
- Nelson, P.J. *et al.*, 1993. *J. Immunol*, 151(5), 2601-2612.
- Di Nicola, M. *et al.*, 2002. *Blood*, 99(10), 3838-3843.
- Nishizuka, Y. & Sakakura, T., 1969. *Science*, 166(906), 753-755.
- Noris, M. *et al.*, 2007. *J. Am. Soc. Nephrol*, 18(3), 1007-1018.
- Núñez-Cruz, S. *et al.*, 2003. *Nat. Immunol*, 4(10), 999-1008.
- O'Garra, A. & Howard, M., 1992. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 651, 182-199.
- O'Shea, J.J. & Paul, W.E., 2010. *Science*, 327(5969), 1098-1102.
- Obayashi, K., Doi, T. & Koyasu, S., 2007. *Int. Immunol*, 19(2), 217-226.
- Oh, K. *et al.*, 2005. *J. Immunol*, 174(4), 2030-2036.
- Ohm, J.E. & Carbone, D.P., 2001. *Immunol. Res*, 23(2-3), 263-272.
- Ohnmacht, C. *et al.*, 2009. *J. Exp. Med*, 206(3), 549-559.
- Olsson, C. *et al.*, 1999. *J. Biol. Chem*, 274(20), 14400-14405.

- Omatsu, Y. *et al.*, 2005. *J. Immunol*, 174(11), 6657-6662.
- Onishi, Y. *et al.*, 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 105(29), 10113-10118.
- Orosz, C.G. & Pelletier, R.P., 1997. *Curr. Opin. Immunol*, 9(5), 676-680.
- Ostrand-Rosenberg, S., 2010. *Cancer Immunol Immunother*, 59(10), 1593-1600.
- Ostrand-Rosenberg, S. & Sinha, P., 2009. *J. Immunol.*, 182(8), 4499-4506.
- Otsuji, M. *et al.*, 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 93(23), 13119-13124.
- Padhan, K. & Varma, R., 2010. *Immunology*, 129(3), 322-328.
- Pak, A.S. *et al.*, 1995. *Clin. Cancer Res*, 1(1), 95-103.
- Pakala, S.V., Kurrer, M.O. & Katz, J.D., 1997. *J. Exp. Med*, 186(2), 299-306.
- Pallier, A. *et al.*, 2010. *Kidney Int*, 78(5), 503-513.
- Pan, P.-Y. *et al.*, 2008. *Blood*, 111(1), 219-228.
- Pandiyani, P. *et al.*, 2007. *Nat. Immunol*, 8(12), 1353-1362.
- Papageorgiou, S.G. *et al.*, 2011. *Oncologist*.
- Papiernik, M. & Banz, A., 2001. *Microbes Infect*, 3(11), 937-945.
- Papiernik, M. *et al.*, 1998. *Int. Immunol*, 10(4), 371-378.
- Paraiso, K.H.T. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 178(5), 2893-2900.
- Parekh, V.V. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 170(12), 5897-5911.
- Patel, A.K. *et al.*, 2011. *J. Mol. Biol*, 409(3), 369-383.
- Pattison, J. *et al.*, 1994. *Lancet*, 343(8891), 209-211.
- Paust, S. *et al.*, 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 101(28), 10398-10403.
- Peláez, B. *et al.*, 2001. *J. Immunol*, 166(11), 6608-6615.
- Peng, G. *et al.*, 2007. *Immunity*, 27(2), 334-348.
- Perl, L. *et al.*, 2010. *Isr. Med. Assoc. J*, 12(2), 110-115.
- Perrin, P.J. *et al.*, 1996. *J. Immunol*, 157(4), 1333-1336.
- Petit-Koskas, E. *et al.*, 1988. *Eur. J. Immunol*, 18(1), 111-116.
- Pfeifhofer, C. *et al.*, 2003. *J. Exp. Med*, 197(11), 1525-1535.
- Phelps, C.J. *et al.*, 2003. *Science*, 299(5605), 411-414.
- Pietra, B.A. *et al.*, 2000. *J. Clin. Invest*, 106(8), 1003-1010.
- Pircher, H. *et al.*, 1991. *Nature*, 351(6326), 482-485.
- Pittenger, M.F. *et al.*, 1999. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Pober, J.S. & Cotran, R.S., 1990. *Transplantation*, 50(4), 537-544.
- Pocock, J. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 170(12), 6280-6291.
- Poirier, N. *et al.*, 2010. *Sci Transl Med*, 2(17), 17ra10.
- Poirier, N., Blancho, G. & Vanhove, B., 2011. *Transpl. Int*, 24(1), 2-11.
- Pons, J.A. *et al.*, 2008. *Transplantation*, 86(10), 1370-1378.
- Ponticelli, C. *et al.*, 2001. *Transplantation*, 72(7), 1261-1267.
- Popov, I.A. *et al.*, 1995. *Transplantation*, 60(12), 1621-1624.
- PORTER, K.A., 1965. *Br. Med. Bull*, 21, 171-175.
- Prasad, K.V. *et al.*, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 91(7), 2834-2838.
- Psaltis, P.J. *et al.*, 2008. *Stem Cells*, 26(9), 2201-2210.
- Puccetti, P. & Fallarino, F., 2008. *Blood Cells Mol. Dis*, 40(1), 101-105.
- Qureshi, O.S. *et al.*, 2011. *Science*, 332(6029), 600-603.
- Rasmusson, I. *et al.*, 2005. *Exp. Cell Res*, 305(1), 33-41.
- Raulet, D.H., 1994. *Curr. Biol*, 4(3), 246-248.
- Ren, X. *et al.*, 2007. *Cell Death Differ*, 14(12), 2076-2084.
- Rieux-Laucat, F. *et al.*, 1995. *Science*, 268(5215), 1347-1349.
- Rifa'i, M. *et al.*, 2004. *J. Exp. Med*, 200(9), 1123-1134.
- Ringdén, O. *et al.*, 2006. *Transplantation*, 81(10), 1390-1397.
- Ristich, V. *et al.*, 2007. *Hum. Immunol*, 68(4), 264-271.
- Rivoltini, L. *et al.*, 2002. *Immunol. Rev*, 188, 97-113.
- Rocha, P.N. *et al.*, 2003. *Immunol. Rev*, 196, 51-64.
- Röck, J. *et al.*, 2007. *Eur. J. Immunol*, 37(12), 3564-3575.
- Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G. & Ochoa, A.C., 2007. *Blood*, 109(4), 1568-1573.
- Rodriguez, P.C. *et al.*, 2002. *J. Biol. Chem*, 277(24), 21123-21129.
- Roncarolo, M.-G. & Battaglia, M., 2007. *Nat. Rev. Immunol*, 7(8), 585-598.
- Roncarolo, M.G. *et al.*, 2001. *Immunol. Rev*, 182, 68-79.
- Roncarolo, M.G. *et al.*, 2006. *Immunol. Rev*, 212, 28-50.
- de la Rosa, M. *et al.*, 2004. *Eur. J. Immunol*, 34(9), 2480-2488.
- Rothstein, D.M. & Sayegh, M.H., 2003. *Immunol. Rev*, 196, 85-108.
- Rouse, B.T., 2007. *J. Intern. Med*, 262(1), 78-95.

- Rouvier, E., Luciani, M.F. & Golstein, P., 1993. *J. Exp. Med.*, 177(1), 195-200.
- Rudd, C.E., 2008. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(2), 153-160.
- Rudd, C.E. & Schneider, H., 2003. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(7), 544-556.
- Ruggenenti, P. *et al.*, 2007. *Transplantation*, 84(8), 956-964.
- Rulifson, I.C. *et al.*, 1997. *J. Immunol.*, 158(2), 658-665.
- Russell, M.E. *et al.*, 1996. *J. Clin. Invest.*, 97(3), 833-838.
- Sad, S. & Mosmann, T.R., 1994. *J. Immunol.*, 153(8), 3514-3522.
- Sadlack, B. *et al.*, 1993. *Cell*, 75(2), 253-261.
- Sakaguchi, S., 2004. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531-562.
- Sakaguchi, S., 2005. *Nat. Immunol.*, 6(4), 345-352.
- Sakaguchi, S. *et al.*, 1985. *J. Exp. Med.*, 161(1), 72-87.
- Sakaguchi, S. *et al.*, 1995. *J. Immunol.*, 155(3), 1151-1164.
- Sakaguchi, S. *et al.*, 2001. *Immunol. Rev.*, 182, 18-32.
- Sakaguchi, S., Takahashi, T. & Nishizuka, Y., 1982a. *J. Exp. Med.*, 156(6), 1565-1576.
- Sakaguchi, S., Takahashi, T. & Nishizuka, Y., 1982b. *J. Exp. Med.*, 156(6), 1577-1586.
- Sakaguchi, S. *et al.*, 2008. *Cell*, 133(5), 775-787.
- Salama, A.D. *et al.*, 2003. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14(6), 1643-1651.
- Salomon, B. *et al.*, 2000. *Immunity*, 12(4), 431-440.
- Sánchez-Fueyo, A. *et al.*, 2002. *J. Immunol.*, 168(5), 2274-2281.
- Sarris, M. *et al.*, 2008. *Immunity*, 28(3), 402-413.
- Sato, K. *et al.*, 2007. *Blood*, 109(1), 228-234.
- Sauer, H., Wartenberg, M. & Hescheler, J., 2001. *Cell. Physiol. Biochem.*, 11(4), 173-186.
- Sawitzki, B. *et al.*, 2005. *J. Exp. Med.*, 201(12), 1925-1935.
- Schaeffer, E.M. *et al.*, 2001. *Nat. Immunol.*, 2(12), 1183-1188.
- Schebesch, C. *et al.*, 1997. *Immunology*, 92(4), 478-486.
- Scheipers, P. & Reiser, H., 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(17), 10083-10088.
- Schild, H. *et al.*, 1994. *Cell*, 76(1), 29-37.
- Schmidt-Wolf, I.G. *et al.*, 1992. *Blood*, 80(12), 3242-3250.
- Schmielau, J. & Finn, O.J., 2001. *Cancer Res.*, 61(12), 4756-4760.
- Schneider, H. *et al.*, 2006. *Science*, 313(5795), 1972-1975.
- Schneider, H. *et al.*, 1995. *J. Exp. Med.*, 181(1), 351-355.
- Schneider, H. *et al.*, 2008. *Eur. J. Immunol.*, 38(1), 40-47.
- Schneider, H. *et al.*, 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(36), 12861-12866.
- Schulze-Luehrmann, J. & Ghosh, S., 2006. *Immunity*, 25(5), 701-715.
- Schwartz, R.H., 1990. *Science*, 248(4961), 1349-1356.
- Schwartz, R.H., 2003. *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 305-334.
- Schwartzberg, P.L., Finkelstein, L.D. & Readinger, J.A., 2005. *Nat. Rev. Immunol.*, 5(4), 284-295.
- Schweitzer, A.N. & Sharpe, A.H., 1998. *J. Immunol.*, 161(6), 2762-2771.
- Scollay, R.G., Butcher, E.C. & Weissman, I.L., 1980. *Eur. J. Immunol.*, 10(3), 210-218.
- Scorilas, A. *et al.*, 2001. *Genomics*, 72(2), 217-221.
- Scott, B. *et al.*, 1994. *Immunity*, 1(1), 73-83.
- Scotto, L. *et al.*, 2004. *Hum. Immunol.*, 65(11), 1297-1306.
- Segundo, D.S. *et al.*, 2006. *Transplantation*, 82(4), 550-557.
- Seino, K.I. *et al.*, 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(5), 2577-2581.
- Serafini, P. *et al.*, 2006. *J. Exp. Med.*, 203(12), 2691-2702.
- Serafini, P. *et al.*, 2004. *Cancer Immunol. Immunother.*, 53(2), 64-72.
- Sharpe, A.H. & Freeman, G.J., 2002. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(2), 116-126.
- Sherman, L.A. & Chattopadhyay, S., 1993. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 385-402.
- Shevach, E.M., 2009. *Immunity*, 30(5), 636-645.
- Shimaoka, M. *et al.*, 2003. *Cell*, 112(1), 99-111.
- Shimizu, J. *et al.*, 2002. *Nat. Immunol.*, 3(2), 135-142.
- Shin, S. *et al.*, 2005. *Science*, 308(5719), 252-255.
- Shortman, K. & Liu, Y.-J., 2002. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(3), 151-161.
- Sinha, P. *et al.*, 2007. *J. Immunol.*, 179(2), 977-983.
- Sinha, P. *et al.*, 2007. *Cancer Res.*, 67(9), 4507-4513.
- Sis, B. *et al.*, 2010. *Am. J. Transplant.*, 10(3), 464-471.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S., 2009. *Annu. Rev. Immunol.*, 27, 591-619.
- Solheim, J.C. *et al.*, 2007. *Cancer Gene Ther.*, 14(4), 364-371.
- Song, E. *et al.*, 2000. *Cell. Immunol.*, 204(1), 19-28.
- Song, E. *et al.*, 2002. *Kidney Int.*, 61(2), 676-685.

- Sonoda, K.-H., Taniguchi, M. & Stein-Streilein, J., 2002. *J. Immunol*, 168(4), 2028-2034.
- Sotiropoulou, P.A. *et al.*, 2006. *Stem Cells*, 24(1), 74-85.
- Spaggiari, G.M. *et al.*, 2008. *Blood*, 111(3), 1327-1333.
- Spence, P.J. & Green, E.A., 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(3), 973-978.
- Steele, D.J. *et al.*, 1996. *J. Exp. Med*, 183(2), 699-703.
- Stegh, A.H. & DePinho, R.A., 2011. *Cell Cycle*, 10(1), 33-38.
- Stephens, G.L. *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 173(8), 5008-5020.
- Stephens, L.A. & Mason, D., 2000. *J. Immunol*, 165(6), 3105-3110.
- Strober, S., 1984. *Annu. Rev. Immunol*, 2, 219-237.
- Su, Y.-wen & Jumaa, H., 2003. *Immunity*, 19(2), 295-305.
- Suciu-Foca, N. *et al.*, 2005. *Int. Immunopharmacol*, 5(1), 7-11.
- Sullivan, T.J. *et al.*, 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(5), 2587-2592.
- Sun, C.-M. *et al.*, 2005. *Immunity*, 22(4), 467-477.
- Sun, Z. *et al.*, 2000. *Nature*, 404(6776), 402-407.
- Suntharalingam, G. *et al.*, 2006. *N. Engl. J. Med*, 355(10), 1018-1028.
- Suri-Payer, E. *et al.*, 1998. *J. Immunol*, 160(3), 1212-1218.
- Süss, G. & Shortman, K., 1996. *J. Exp. Med*, 183(4), 1789-1796.
- Sykes, M. & Sachs, D.H., 1988. *Immunol. Today*, 9(1), 23-27.
- Szanya, V. *et al.*, 2002. *J. Immunol*, 169(5), 2461-2465.
- Szuster-Ciesielska, A. *et al.*, 2004. *Acta Oncol*, 43(3), 252-258.
- Tacke, M. *et al.*, 1995. *J. Immunol*, 154(10), 5121-5127.
- Tai, X. *et al.*, 2005. *Nat. Immunol*, 6(2), 152-162.
- Takahashi, T. *et al.*, 2000. *J. Exp. Med*, 192(2), 303-310.
- Takahashi, T. *et al.*, 1994. *Cell*, 76(6), 969-976.
- Takenoshita, S. *et al.*, 2002. *J. Gastroenterol*, 37(12), 991-999.
- Talieri, M. *et al.*, 2003. *Thromb. Haemost.*, 89(6), 1081-1088.
- Tan, M.C.B. *et al.*, 2009. *J. Immunol*, 182(3), 1746-1755.
- Tanaka, K. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 179(8), 5204-5210.
- Tang, Q. & Krummel, M.F., 2006. *Curr. Opin. Immunol*, 18(4), 496-502.
- Tang, Q. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 171(7), 3348-3352.
- Tanriver, Y. *et al.*, 2010. *J. Immunol*, 184(4), 1757-1764.
- Taylor, P.A., Noelle, R.J. & Blazar, B.R., 2001. *J. Exp. Med*, 193(11), 1311-1318.
- Le Texier, L. *et al.*, 2011. *Am. J. Transplant*, 11(3), 429-438.
- Thompson, C.B. *et al.*, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86(4), 1333-1337.
- Thornton, A.M. & Shevach, E.M., 1998. *J. Exp. Med*, 188(2), 287-296.
- Tian, J. *et al.*, 2001. *J. Immunol*, 167(2), 1081-1089.
- Tiemessen, M.M. *et al.*, 2007. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(49), 19446-19451.
- Tivol, E.A. *et al.*, 1995. *Immunity*, 3(5), 541-547.
- Tögel, F. *et al.*, 2005. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 289(1), F31-42.
- Tone, M. *et al.*, 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(25), 15059-15064.
- Toyofuku, A. *et al.*, 2006. *Diabetes*, 55(1), 34-39.
- Tsai, M.-K. *et al.*, 2004. *Transplantation*, 77(1), 48-54.
- Tsang, J.Y.S., Chai, J.G. & Lechler, R., 2003. *Blood*, 101(7), 2704-2710.
- Tse, W.T. *et al.*, 2003. *Transplantation*, 75(3), 389-397.
- Tu, W. *et al.*, 2008. *Blood*, 112(6), 2554-2562.
- Turka, L.A. *et al.*, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(22), 11102-11105.
- Turnquist, H.R. *et al.*, 2007. *J. Immunol*, 178(11), 7018-7031.
- Ubaldi, V. *et al.*, 2003. *Clin. Dev. Immunol*, 10(1), 13-17.
- Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V., 2006. *Eur. J. Immunol*, 36(10), 2566-2573.
- Urakami, H. *et al.*, 2006. *Transplant. Proc.*, 38(10), 3244-3246.
- Vanhove, B. *et al.*, 2003. *Blood*, 102(2), 564-570.
- Vella, J.P. *et al.*, 1997. *Transplantation*, 64(6), 795-800.
- Vickers, S.M. *et al.*, 1999. *Arch Surg*, 134(3), 245-251.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W. & Workman, C.J., 2008. *Nat. Rev. Immunol*, 8(7), 523-532.
- Vincenti, F. *et al.*, 2005. *N. Engl. J. Med*, 353(8), 770-781.
- Viola, A. & Lanzavecchia, A., 1996. *Science*, 273(5271), 104-106.
- van Vlasselaer, P., Punnonen, J. & de Vries, J.E., 1992. *J. Immunol*, 148(7), 2062-2067.
- Voelkl, S., Gary, R. & Mackensen, A., 2011. *Eur. J. Immunol*, 41(3), 739-748.
- Waaga, A.M. *et al.*, 2000. *Curr. Opin. Immunol*, 12(5), 517-521.
- Walker, L.S. *et al.*, 1999. *J. Exp. Med*, 190(8), 1115-1122.

- Walker, L.S.K. & Abbas, A.K., 2002. *Nat. Rev. Immunol*, 2(1), 11-19.
- Walker, M.R. *et al.*, 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(11), 4103-4108.
- Wang, C. *et al.*, 2010. *Transpl. Immunol*, 22(3-4), 172-178.
- Wang, H. *et al.*, 2006. *Transplantation*, 82(11), 1484-1492.
- Wang, J.H. *et al.*, 1996. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, 14(1), 27-35.
- Wang, Q. *et al.*, 2003. *Immunol. Lett*, 90(1), 33-42.
- Wang, Z. *et al.*, 2008. *Transpl. Immunol*, 19(1), 69-73.
- Wange, R.L., 2000. *Sci. STKE*, 2000(63), re1.
- Ward, S.G. *et al.*, 1993. *Eur. J. Immunol*, 23(10), 2572-2577.
- Waris, G. & Ahsan, H., 2006. *J. Carcinog*, 5, 14.
- Watanabe, N. *et al.*, 2005. *Nature*, 436(7054), 1181-1185.
- Watanabe-Fukunaga, R. *et al.*, 1992. *J. Immunol*, 148(4), 1274-1279.
- Waterhouse, P. *et al.*, 1995. *Science*, 270(5238), 985-988.
- Watts, T.H. & DeBenedette, M.A., 1999. *Curr. Opin. Immunol*, 11(3), 286-293.
- Wei, B. *et al.*, 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(6), 2010-2015.
- Weiner, H.L., 2001. *Microbes Infect*, 3(11), 947-954.
- Weiss, A. & Littman, D.R., 1994. *Cell*, 76(2), 263-274.
- Wetzel, S.A., McKeithan, T.W. & Parker, D.C., 2002. *J. Immunol*, 169(11), 6092-6101.
- De Wilde, V. *et al.*, 2009. *Am. J. Transplant*, 9(9), 2034-2047.
- Williams, G.M. *et al.*, 1968. *N. Engl. J. Med.*, 279(12), 611-618.
- Wing, K. *et al.*, 2008. *Science*, 322(5899), 271-275.
- Wohlfert, E.A. & Clark, R.B., 2007. *Trends Immunol*, 28(4), 154-160.
- Wolf, S.D. *et al.*, 1996. *J. Exp. Med*, 184(6), 2271-2278.
- Wood, K.J. & Sakaguchi, S., 2003. *Nat. Rev. Immunol*, 3(3), 199-210.
- Woodward, J.E. *et al.*, 1998. *Transplantation*, 66(1), 14-20.
- Workman, C.J. & Vignali, D.A.A., 2003. *Eur. J. Immunol*, 33(4), 970-979.
- Workman, C.J. *et al.*, 2009. *J. Immunol*, 182(4), 1885-1891.
- Wülfig, C. & Davis, M.M., 1998. *Science*, 282(5397), 2266-2269.
- Wykes, M. & MacPherson, G., 2000. *Immunology*, 100(1), 1-3.
- Xue, Q. *et al.*, 2010. *Stem Cells Dev*, 19(1), 27-38.
- Xystrakis, E., Cavailles, P., *et al.*, 2004. *J. Immunol*, 173(5), 3140-3147.
- Xystrakis, E., Dejean, A.S., *et al.*, 2004. *Blood*, 104(10), 3294-3301.
- Yamaguchi, Y. *et al.*, 1997. *Stem Cells*, 15(2), 144-153.
- Yan, Z. & Banerjee, R., 2010. *Biochemistry*, 49(6), 1059-1066.
- Yan, Z., Garg, S.K. & Banerjee, R., 2010. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41525 -41532.
- Yanaba, K. *et al.*, 2008. *Immunity*, 28(5), 639-650.
- Yanaba, K. *et al.*, 2009. *J. Immunol*, 182(12), 7459-7472.
- Yang, J. *et al.*, 2008. *Circulation*, 117(5), 660-669.
- Yang, R. *et al.*, 2006. *Cancer Res*, 66(13), 6807-6815.
- Yang, S.-H. *et al.*, 2009. *Exp. Mol. Med*, 41(5), 315-324.
- Yao, S. *et al.*, 2011. *Immunity*, 34(5), 729-740.
- Yasunami, Y. *et al.*, 2005. *J. Exp. Med*, 202(7), 913-918.
- Yin, D. & Fathman, C.G., 1995. *J. Immunol*, 155(4), 1655-1659.
- Yokosuka, T. & Saito, T., 2009. *Immunol. Rev*, 229(1), 27-40.
- Youn, J.-I. *et al.*, 2008. *J. Immunol*, 181(8), 5791-5802.
- Young, D.A. *et al.*, 2000. *J. Immunol*, 164(7), 3563-3572.
- Young, K.J. *et al.*, 2003. *J. Immunol*, 171(1), 134-141.
- Young, M.R. *et al.*, 1996. *J. Immunol*, 156(5), 1916-1922.
- Yu, X.-Z. *et al.*, 2004. *J. Clin. Invest*, 113(11), 1624-1630.
- Yun, J.J. *et al.*, 2004. *Circulation*, 109(7), 932-937.
- Zanin-Zhorov, A., Dustin, M.L. & Blazar, B.R., 2011. *Trends Immunol.*
- Zea, A.H. *et al.*, 2005. *Cancer Res*, 65(8), 3044-3048.
- Zeiser, R. *et al.*, 2006. *Blood*, 108(1), 390-399.
- Zhang, D. *et al.*, 2007. *Blood*, 109(9), 4071-4079.
- Zhang, J., Raper, A., *et al.*, 2006. *Blood*, 107(9), 3600-3608.
- Zhang, W. *et al.*, 2008. *Transplantation*, 86(8), 1125-1134.
- Zhang, W. *et al.*, 1998. *Cell*, 92(1), 83-92.
- Zhang, W. *et al.*, 1999. *Immunity*, 10(3), 323-332.
- Zhang, Z.-X., Ma, Y., *et al.*, 2006. *J. Immunol*, 177(10), 6920-6929.
- Zhang, Z.X. *et al.*, 2000. *Nat. Med*, 6(7), 782-789.

- Zheng, X.X. *et al.*, 1999. *J. Immunol.*, 162(8), 4983-4990.
Zheng, X.X. *et al.*, 2003. *Immunol. Rev.*, 196, 75-84.
Zheng, X.X. *et al.*, 1997. *J. Immunol.*, 159(3), 1169-1173.
Zhou, Z. *et al.*, 2010. *Stem Cells*, 28(3), 620-632.
Zhu, M. *et al.*, 2002. *J. Biol. Chem.*, 277(48), 46151-46158.
Zhu, X.-Y. *et al.*, 2005. *Biol. Reprod.*, 72(2), 338-345.
Zinkernagel, R.M. *et al.*, 1978. *Nature*, 271(5642), 251-253.
Zuklys, S. *et al.*, 2000. *J. Immunol.*, 165(4), 1976-1983.

Annexes

Annexes

I- Annexe I

Les cellules myéloïdes suppressives en transplantation.

Nahzli DILEK, Nicolas VAN ROMPAEY, Alain LE MOINE et Bernard VANHOVE.

Revue publiée dans *Current Opinion in Organ Transplantation*. 15(6):765-768, December 2010.

Titre original : *Myeloid-derived suppressor cells in transplantation.*

Myeloid-derived suppressor cells in transplantation

Nahzli Dilek^{a,b,c}, Nicolas van Rompaey^d, Alain Le Moine^d and Bernard Vanhove^{a,b,c}

^aINSERM, UMR543, ^bCHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), ^cFaculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France and ^dInstitute for Medical Immunology, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

Correspondence to Bernard Vanhove, INSERM, UMR543, CHU Hôtel Dieu, 30 Bl. J. Marquet, 44093 Nantes, France
Tel: +33 240 06 74 17, fax: +33 240 06 74 11, e-mail: bernard.vanhove@univ-nantes.fr

Current Opinion in Organ Transplantation 2010; 15:000–000

Purpose of review

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population of immature cells that are considered as potential therapeutic targets. Indeed, MDSCs have been shown to suppress immune responses to several types of tumor cells and blocking their suppressive activity may adequately enhance immune response against tumor antigens. On the contrary, the activity of MDSCs may be desirable in suppressing unwanted immune responses such as allograft rejection and might be involved as non-T regulatory cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. In addition, recent data reported that MDSC also control innate immune responses suggesting that MDSC might be important players in controlling ischemia reperfusion injury.

Recent findings

Herein, we focused on the few recent studies questioning the possible role played by MDSCs in solid-organ transplantation as well as in experimental models of graft versus host disease.

Summary

A growing body of evidence demonstrates that MDSCs are important physiological regulators of innate and adaptive immunity. Now, accumulating studies suggest that this concept can be transposed to the early and late transplantation immunity. Nevertheless, additional studies with mechanistic approaches in animal together with studies in human are required to better define their position and their interactions with immunosuppressive drugs.

Keywords

immunosuppression, myeloid cells, regulatory T cells, transplant tolerance

Cur Opin Organ Transplant 15:000–000
© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
1097-2418

Introduction

Solid-organ transplantation is today widely accepted and used for treatment of end-stage organ diseases, when other conventional therapeutics are not efficient. The improvement of organ conservation, surgical procedures, rejection therapeutic management (immunosuppressive treatments) and posttransplant infection management (curative and preventive treatments) has widely contributed to this success. However, solid-organ transplantation still remains a heavy treatment for the patients who are subjected to chronic immunosuppressive treatments which cannot prevent the chronic rejection and have several secondary effects, such as renal dysfunctions, viral infections, cancers and metabolic disorders. Thereby, the ideal would be to obtain a tolerance state to allograft. A better knowledge of immunological mechanisms and immune responses implicated in the graft loss or acceptance could allow the development of tailored immunosuppressive treatments where immunosuppressive drugs would be reduced and tolerogenic mechanisms pro-

moted. Therefore, a throughout knowledge of the cells implicated in immune tolerance is warranted.

Myeloid-derived suppressor cells and transplantation tolerance

In literature, transplant tolerance has mostly been associated with the action of regulatory T cells (Tregs) [1]. However, it has also been shown that in some cases Tregs are not the only players. Indeed, some non-T regulatory cells have been associated with tolerance induction. For example, administration of anti-CD28 Abs [2] or anti-donor class II Abs [3] resulted in tolerance to kidney allografts in the rat across a full major histocompatibility complex (MHC) barrier with an immune suppression that is at least partially dependent on non-T cells. In most cases, non-T cell populations with potential regulatory activity in the transplant setting have been identified as regulatory dendritic cells producing IDO [4] and heme oxygenase-1 (HO-1) [5], alternatively activated macrophages creating a Th2 environment [6], natural killer

2 Cellular transplantation

T (NKT) cells [7], plasmacytoid dendritic cells producing large amount of type I interferon (IFN) [8], mesenchymal stem cells secreting TGF- β and HGF [9,10], or IFN- γ -stimulated monocyte-derived cells inducing a cell contact and caspase-dependent depletion of activated T cells [11]. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are another type of non-T regulatory cells that have been associated with impaired immune reactivity to Ag challenge (tumors and infections), chronic inflammation or superantigen-induced tolerance of CD4⁺ T lymphocytes [12]. These cells are a heterogeneous population of cells that consists of myeloid progenitor cells and immature myeloid cells (immature macrophages, immature granulocytes and immature dendritic cells). In mice, these cells are functionally able to inhibit T cell responses by inducing the apoptosis of activated T cells via upregulation of nitric oxide production [13]. Nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak/STAT5 signaling pathway [14]. Moreover, MDSCs can also produce arginase 1 under the action of Th2-type cytokines. Arginase 1 synergizes with nitric oxide to induce peroxynitrites, which are known to have a major role in the impairment of tyrosine phosphorylation. They inhibit this way via nitration of tyrosine residues and then drive the apoptosis of Ag-primed T lymphocytes [15]. It has also been suggested that CD4⁺CD25⁺ Tregs mediate MDSC suppressive activity. This mediation requires an interaction between CD152 on Tregs with CD80 on MDSCs. In fact, CD80 marker is upregulated upon contact of MDSCs with activated T lymphocytes [16]. Mouse MDSCs are defined phenotypically by their expression of CD11b and Gr1, although functionally distinct subsets within this population have been identified (granulocytic or monocytic MDSCs) [17**]. Gr1 marker is expressed only in mice but not in rat and human. It includes the markers Ly6C and Ly6G for macrophage and neutrophil, respectively, whereas CD11b (also called α M-integrin) characterizes macrophages [18]. The human MDSC equivalents are most commonly defined as CD14⁻CD11b⁺ or CD14⁺CD11b⁺ cells, more narrowly, as cells that express the common myeloid marker CD33 but lack the expression of mature myeloid and lymphoid cell markers [19]. The rat counterparts express the CD11b/c and HIS48 myeloid markers [20].

MDSCs have mainly been found to contribute to the immunosuppression in tumor microenvironment. But in few cases, recent data showed that these non-T regulatory cells have also been associated with long-term survival and tolerance in transplantation.

In mice, adoptive transfer of functional MDSCs generated *in vitro* from mouse embryonic stem cells prevented the graft-versus-host disease (GVDH) [21*]. Those embryonic stem cells-derived CD115⁺ MDSCs were

very similar to ex-vivo MDSCs found in tumor-bearing mice and could efficiently protect mice from developing alloreactive T-cell-mediated lethal GVDH (nearly 82% long-term survival). Their suppressive function involved iNOS and IL-10. Moreover, in-vitro ES-derived MDSCs enhanced significantly the development of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs as compared to tumor-derived MDSCs.

In kidney allograft in a rat model, a perioperative treatment with CD28-specific modulating antibodies allowed graft tolerance (survival >100 days after transplantation) paralleled by the accumulation of MDSCs identified in peripheral blood and in tolerant kidney graft recipient [22]. These cells, characterized by a CD3 ClassII⁻ CD11b⁺CD80/86⁺ phenotype, induced a contact-dependent apoptosis of activated effector T cells that themselves triggered iNOS expression by MDSCs. Interestingly, Treg cells could not elicit iNOS in MDSC and did not undergo apoptosis after contact with MDSC. By contrast, another group showed that in-vivo induction of Gr1⁺CD11b⁺ MDSCs and CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, respectively, with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF, Neupogen) and IL-2 complex, promoted skin allograft survival in mice [23*]. Interestingly, they showed an increase of Tregs when mice are treated with the combination of Neupogen and IL-2C suggesting an additive effect on host alloreactive T cells. Thereby, this observation suggested that both MDSCs and Treg could cooperate and allowed the long-term survival of allograft. However, the mechanisms implicated in MDSCs-Treg cooperation and the suppressive mechanisms of MDSCs have to be elucidated.

Crosstalk between myeloid-derived suppressor cells, innate and adaptive immunity

Polymicrobial sepsis, viral infection or, more simply, a sterile inflammation through the Toll-like receptor (TLR)4 stimulation by lipopolysaccharide induce a dramatic increase of MDSCs in the spleen, lymph nodes, bone marrow and the liver [17**,24–26]. In all these experiments, the induced MDSCs suppressed concomitant T cell responses although the mechanisms of suppression were not systematically elucidated or equivalent. Interestingly, in one of these, MDSCs from septic mice caused CD8⁺ T cell tolerance, as demonstrated by the suppression experiments of antigen-specific IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes in adoptively transferred nonseptic immunized mice. We observed that multiple injections of lipopolysaccharide increased CD11b⁺GR-1⁺ MDSCs by a four-fold factor in mouse bone marrow, lymph node and spleen [24]. Of note, repeated lipopolysaccharide injections desensitized mice

to a further injection of endotoxin compared to non-injected controls, a process characterized by a loss of TNF- α and IL-1 β productions and by an up-regulation of IL-10 production upon lipopolysaccharide challenge. The endotoxin desensitization and MDSC induction were concomitant with the observation of a significant delay of skin allograft rejection, although a direct relationship between the endotoxin desensitization process and the dampening of alloreactivity has not been investigated. MDSCs generated by endotoxin equally suppressed CD4 and CD8 T cell responses as attested by in-vitro suppression assays containing naive and memory T cells stimulated through anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. In those assays, T cell proliferation, Th1, Th2 and Th17 cytokine productions were blocked by the addition of MDSCs, whereas IL-10 production was systematically upregulated. The main source of IL-10 was the MDSCs themselves and this required a cell-to-cell contact with activated T cells as it was the case for T cell suppression by MDSCs. Both GR-1 high and intermediate cells, but not GR-1 negative cells suppressed T cell activation and were associated with IL-10 production. In this case neither iNOS nor arginase neutralization was able to reverse suppression and IL-10 neutralization only restored IFN- γ production. We found that MDSCs expanded under TLR4 stimulation suppress T cell responses *in vitro* and *in vivo* by using a 'novel mechanism' that depended upon the inducible enzyme heme oxygenase-1 (HO-1). HO-1 is a potent antioxidant and anti-inflammatory enzyme. The activation and expression of HO-1 is induced by its substrate heme and many other cellular stresses including ischemia [27*,28]. HO-1 catabolizes heme into carbon monoxide, biliverdin and ferrous ions. Biliverdin is further transformed into bilirubin by biliverdin reductase. Ferrous ions induce ferritin synthesis and iron efflux from cells. Carbon monoxide and biliverdin have strong anti-inflammatory, antiproliferative, antiapoptotic and antioxidant properties. It has been reported that the mechanism of action of HO-1 and carbon monoxide is dependent on the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling transduction pathway in target cells [29]. HO-1 deficiency is associated with a systemic inflammation and increased ischemia reperfusion injuries, whereas HO-1 overexpression suppresses xenograft rejection, reduces ischemia reperfusion injury, pancreatitis, experimental autoimmune encephalomyelitis and humoral immunization [27*,28]. The treatment of MDSCs by an HO-1 inhibitor (SnPP) reverted suppression *in vitro* and *in vivo* in transfer experiments.

Those experiments illustrate at least one part of the complex crosstalk between innate and adaptive immunity, since a strong innate activation (through TLR4) induced T cell suppression by MDSCs. In turn, MDSCs require T cell signaling to control their proliferation/

Myeloid-derived suppressor cells in transplantation Džek et al. 3

activation. Moreover, we now accumulate evidence that a specific in-vivo T cell activation strongly induces MDSCs (unpublished data).

Is it really relevant for transplantation? At least two arguments support it. First, particularly for liver transplantation, a setting in which endotoxin translocation through the portal vein is very frequent. In this setting, there is a massive posttransplantation release of IL-10 by liver cells and up to 20% of liver transplant recipients become spontaneously tolerant (reviewed in [26] and [30]). Moreover, a recent observation performed in a mouse model of polymicrobial sepsis showed that hepatospecific abrogation of the IL-6 family cytokine receptor gp130-STAT3 was required for animal survival and to control systemic inflammation. More exciting was the feature that the gp130-STAT3 pathway was critical for MDSC mobilization and tissue accumulation in this model [31**] and a single adoptive transfer of MDSC prevented mortality in infected gp130-STAT3-deficient animals. The recruitment of MDSC operated through the early release of acute-phase proteins (APPs) and several chemokines. This study clearly established a role for MDSC in the regulation of innate immunity in response to sepsis, thus reinforcing the concept of innate-innate crosstalk by MDSCs. The second argument (which is linked to the first) relies on the fact that sterile inflammation during transplantation procedure might also involve recruitment and activation of MDSCs. Indeed, many damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as the high mobility group box-1 protein (HMGB1) trigger inflammation during ischemia reperfusion injury susceptible to start the crosstalk innate-innate and adaptive-innate involving MDSCs. Further investigations are required to identify a possible protective role of MDSCs in these complex circumstances.

At last, very recent data showed the involvement of MDSCs in a model of pancreatic islet allotransplantation in pharmacologically induced diabetic mice [32**]. In this model, an adoptive transfer of bone marrow-derived MDSCs (BM-MDSCs) generated with GM-CSF and IL-6 increased significantly the percentage of long-term survivors (about 75% normoglycemic mice during observation period of 200 days) in the group of mice transplanted with allogeneic islets in the absence of any immunosuppressive drug. BM-MDSCs induced a tolerance against alloantigen present in the islet cells through an inhibition of IFN- γ -producing T cells.

Conclusion

All together, these observations highlight the role of MDSC in transplantation tolerance, which now comes in addition to their recognized role in tumor tolerance. The heterogeneous origin of these cells gives them the

4 Cellular transplantation

capacity to use several mechanisms for their regulatory function. Indeed, MDSCs play like Tregs an important role in the induction [21*,23*,24,32**] or maintenance of graft tolerance [22]. Thus, these data suggest a new form of endogenous immunosuppression by MDSCs. Their potential effect with other immunosuppressive therapies should be more investigated.

Acknowledgements

The authors thank the Progrès Foundation for supporting research at ITUN.

N.V.R. is a research fellow of the Fonds Erasme (Erasmus Hospital, Belgium). A.L.M. is a research associate of the FNRS-Belgium. N.D. is a PhD student. B.V. is a director of Research at the CNRS France.

References and recommended reading

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

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (pp. 000–000).

- 1 Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:199–210.
- 2 Haegert F, Silvano C, Dugast A, et al. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tyrosinase degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant* 2006; 6:2339–2348.
- 3 Desaugre N, Lair D, Dupont A, et al. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103⁺ cells. *J Immunol* 2006; 176:3915–3925.
- 4 Miller AL, Munn DH. B2M expression by dendritic cells: tolerance and tyrosinase cataplexy. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:762–774.
- 5 Chausse C, Rémy S, Royat P, et al. Heme oxygenase 1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 2006; 106:1694–1702.
- 6 Tzachanis D, Beiswolkaya A, Nadler LM, Boussios VA. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T cell responses. *Blood* 2002; 99:1466–1473.
- 7 Seino KJ, Fukao K, Muramoto K, et al. Requirement for natural killer 1 (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:2677–2681.
- 8 Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:610–621.
- 9 Roussasse L. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2006; 312:2169–2176.
- 10 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99:3838–3843.
- 11 Blum-Erber BG, Sattler C, Hutchinson JA, et al. Macrophages driven to a novel state of activation have anti-inflammatory properties in mice. *J Immunol* 2008; 180:336–340.
- 12 Serafini P, De Santo C, Mingo I, et al. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:54–72.
- 13 Mazzoni A, Breno Y, Visentin A, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO dependent mechanism. *J Immunol* 2002; 168:689–695.
- 14 Bingisser RM, Tibbitt PA, Holt PG, Kees UR. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 1998; 160:6729–6734.
- 15 Bito C, Naville M, Toccoia AC, et al. Peroxyrimine inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxyrimine-driven apoptotic death. *J Immunol* 1999; 162:3366–3368.
- 16 Yang R, Cai Z, Zhang Y, et al. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma associated Gr¹CD11b⁺ myeloid cells. *Cancer Res* 2006; 66:6807–6816.
- 17 Gabrilowicz D, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:162–174.
- This is a comprehensive and complete review of the origin, mechanisms of expansion and suppression of MDSCs.
- 18 Corzo CA, Cotter M, Cheng P, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2009; 182:6683–6701.
- 19 Almand B, Clark J, Nikrass E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001; 166:670–689.
- 20 Piers RM, Scott GP, Macchioni RE, Giral MR. Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma. II. Expansion of myeloid suppressor cells that promote tumor progression. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51:190–199.
- 21 Zhou Z, French DL, Ma G, et al. Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2010; 28:620–632.
- In this paper, authors showed for the first time that two subpopulations of functional MDSCs can be obtained *in vitro* from mouse embryonic stem cells and bone marrow hematopoietic stem cells: CD11b⁺Ly6C⁺ and CD11b⁺Ly6C⁻ cells. These cells suppressed strongly T cell proliferation via nitric oxide and IL-10 production and induced CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells compared to tumor derived MDSCs. Moreover, the adoptive transfer of embryonic stem cells MDSCs prevented lethal graft versus host disease *in vivo*.
- 22 Dugast A, Haudubert T, Coulon F, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 2008; 180:7698–7706.
- 23 Adedigbo D, Serafini P, Zoso A, et al. *In vivo* induction of myeloid suppressor cells and CD4⁺Foxp3⁺ T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. *Cell Transplant* (in press).
- The synergy between MDSCs and CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells is highlighted in this work. Authors showed that the *in vivo* induction of both cells by immunomodulatory agents prolonged skin allograft survival in mice. Indeed, it suggested the therapeutic potential of these cells to promote transplantation tolerance.
- 24 De Wilde V, Van Rompaey N, Hill M, et al. Endotoxin-induced myeloid derived suppressor cells inhibit albumin responses via heme oxygenase 1. *Am J Transplant* 2009; 9:2034–2047.
- 25 Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88 dependent expansion of an immature GR-1⁺CD11b⁺ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 2007; 204:1463–1474.
- 26 Alegre M, Leemans J, Le Moens A, et al. The multiple facets of toll-like receptors in transplantation biology. *Transplantation* 2008; 86:1–9.
- 27 Giacchino R, Jersey S, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase 1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:323–354.
- This is a very clear and detailed review of immunosuppressive effects and regulation of HO-1 activity.
- 28 Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med* 2009; 15:50–58.
- 29 Broward S, Orntoft LE, Arnsperger J, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192:1016–1026.
- 30 Natarajan S, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and myeloid derived suppressor cells: potential for regulation and therapy of liver auto- and alloimmunity. *Immunobiology* 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2968064/>. (Accessed 27 July 2010)
- 31 Sander LE, Sackett SD, Diener U, et al. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 2010; 207:1463–1466.
- Using a mouse model of polymicrobial sepsis, authors showed that abrogation of acute-phase proteins (APPs) production by hepatocyte (via IL-6 receptor and STAT3 signaling), significantly increased mortality despite normal bacterial clearance. It is elegantly demonstrated that the overwhelmed inflammation was controlled by the mobilization and tissue accumulation of MDSCs. The adoptive transfer of MDSC reversed dysregulated inflammation and restored survival of gp130 deficient mice. On the opposite, removing MDSCs worsened the prognosis. This is a clear demonstration that MDSCs also regulate innate immune responses and might become a valuable tool for the control of early innate immune responses during transplantation (including ischemia reperfusion injury and T cell priming).
- 32 Mingo I, Basso E, Solito S, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the CREB1 transcription factor. *Immunity* 2010; 32:790–802.
- Adoptive transfer of BM MDSCs (bone marrow-derived cells generated with GM-CSF and IL-6) induced tolerance in transplanted mice with allogeneic islet cells. The authors showed that the immunoregulatory activity of these cells was entirely dependent on the CREB1 transcription factor. Thus, it suggested that MDSCs acted on their suppressive activity in allograft transplantation under the control of this transcription factor.

AQ1

II- Annexe II

**Le.blocage de CD28 induit une régulation immune
dépendante de CTLA-4 et favorise les cellules T
régulatrices en transplantation d'organe.**

Nicolas POIRIER*, Agnes M AZIMZADEH*, Tianshu ZHANG*, Nahzli DILEK,
Caroline MARY, Bao NGUYEN, Xavier TILLOU, Guosheng WU, Karine RENAUDIN,
Jeremy HERVOUET, Bernard MARTINET, Flora COULON, Emma ALLAIN-
LAUNAY, Georges KARAM, Jean-Paul SOULILLOU, Richard N PIERSON III*, Gilles
BLANCHO* et Bernard VANHOVE* .

* *Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.*

Article publié dans *Scienc Translational Medicine*. 2010, Feb 3; 2:17ra10.

Titre original : *Inducing CTLA-4-dependent Immune Regulation by Selective CD28 blockade Promotes Regulatory T cells in Organ Transplantation..*



Inducing CTLA-4–Dependent Immune Regulation by Selective CD28 Blockade Promotes Regulatory T Cells in Organ Transplantation

Nicolas Poirier, *et al.*

Sci Transl Med 2, 17ra10 (2010);

DOI: 10.1126/scitranslmed.3000116

Editor's Summary

Increasing Tolerance with Less Toxicity

According to Chinese legend, 2500 years ago the physician Pien Ch'iao exchanged the hearts of two warriors, one of strong spirit and weak will and the other of weak spirit and strong will, with the aim of achieving balance in their characters. Of course, without modern surgical techniques and the ability to suppress organ rejection by the recipient's immune system, such transplants would have been impossible. It was not until the discovery of the powerful immunosuppressant drug cyclosporin that organ transplants between unrelated individuals became routinely successful, beginning in the 1980s. Cyclosporin and some newer similar drugs, however, have toxic side effects, and none of them can stop eventual rejection of the organ, so researchers are seeking other options. Now, Vanhove and colleagues test an alternative immunosuppressive strategy. T cells are a major culprit in the immune response directed against transplanted organs, and therefore a number of immunosuppressive drugs target T cells. Cyclosporin, for example, inhibits calcineurin, a protein phosphatase that under normal conditions increases the expression of interleukin 2, which—among other functions—promotes the proliferation of activated T cells. Certain newer approaches to immunosuppression target the process by which T cells become activated. In general, this process is induced by antigen binding to the T cell receptor and reinforced by costimulatory molecules—CD80 and CD86—binding to the T cell CD28 receptor. Additionally, CD80/86 can bind to the CTLA-4 receptor, resulting in T cell inhibition. CTLA-4 is also required for the function of regulatory T cells (Tregs), which suppress aberrant immune responses and are important for inducing tolerance toward transplanted tissue. Several drugs that block CD80/86 have been developed as a nontoxic alternative to calcineurin inhibitors, but in addition to affecting the CD28-mediated pathway of T cell stimulation, these reagents also inhibit the CTLA-4 signals required for Treg function. To avoid inhibiting CTLA-4–dependent regulation of the immune system while suppressing T cell activation, the Vanhove, Blancho, and Pierson labs aimed to block CD28 function directly in experiments on kidney and heart transplantation in baboons and monkeys. Previous work showed that down-regulation of CD28 activity with an anti-CD28 monoclonal antibody inhibited rejection of organ transplants in rodents. For the new nonhuman primate studies, the researchers used a fragment of a human CD28-specific monoclonal antibody fused to a carrier molecule to increase its half-life *in vivo*. This fusion antibody, sc28AT, recognizes CD28 from monkeys and baboons as well as humans, and it competes with CD80/86 for binding to CD28. sc28AT increased the number of functional Tregs and reduced chronic rejection of the transplanted tissue in the primates when used together with a calcineurin inhibitor. This is good news because it suggests that the dose of such inhibitors (and their toxic side effects) could be reduced in patients when given with a molecule targeting CD28. It remains to be determined whether this approach offers practical advantages over straight CD80/86 blockade when tested in the clinic.

Downloaded from stm.sciencemag.org on August 26, 2011

A complete electronic version of this article and other services, including high-resolution figures, can be found at:

<http://stm.sciencemag.org/content/2/17/17ra10.full.html>

Supplementary Material can be found in the online version of this article at:

<http://stm.sciencemag.org/content/suppl/2010/02/01/2.17.17ra10.DC1.html>

Information about obtaining reprints of this article or about obtaining permission to reproduce this article in whole or in part can be found at:

<http://www.sciencemag.org/about/permissions.dtl>

Science Translational Medicine (print ISSN 1946-6234; online ISSN 1946-6242) is published weekly, except the last week in December, by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. Copyright 2010 by the American Association for the Advancement of Science; all rights reserved. The title *Science Translational Medicine* is a registered trademark of AAAS.

RESEARCH ARTICLE

ORGAN TRANSPLANTS

Inducing CTLA-4–Dependent Immune Regulation by Selective CD28 Blockade Promotes Regulatory T Cells in Organ Transplantation

Nicolas Poirier,^{1*} Agnes M. Azimzadeh,^{2*} Tianshu Zhang,^{2*} Nahzli Dilek,¹ Caroline Mary,³ Bao Nguyen,² Xavier Tillou,¹ Guosheng Wu,² Karine Reneaudin,⁴ Jeremy Hervouet,¹ Bernard Martinet,¹ Flora Coulon,¹ Emma Allain-Launay,¹ Georges Karam,¹ Jean-Paul Souillou,¹ Richard N. Pierson III,^{2†} Gilles Blancho,^{1††} Bernard Vanhove^{1†}

(Published 3 February 2010; Volume 2 Issue 17 17ra10)

Transplantation is the treatment of choice for patients with end-stage organ failure. Its success is limited by side effects of immunosuppressive drugs, such as inhibitors of the calcineurin pathway that prevent rejection by reducing synthesis of interleukin-2 by T cells. Moreover, none of the existing drugs efficiently prevent the eventual rejection of the organ. Blocking the CD28-mediated T cell costimulation pathway is a nontoxic alternative immunosuppression strategy that is now achieved by blockade of CD80/86, the receptor for CD28 on antigen-presenting cells. However, interaction of CD80/86 with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) is required for immune regulation. Therefore, CD28 blockade, instead of CD80/86 blockade, might preserve regulatory signals mediated by CTLA-4 and preserve immune regulation. By using monovalent antibodies, we identified true CD28 antagonists that induced CTLA-4–dependent decreased T cell function compatible with regulatory T (Treg) cell suppression. In transplantation experiments in primates, blocking CD28 augmented intragraft and peripheral blood Treg cells, induced molecular signatures of immune regulation, and prevented graft rejection and vasculopathy in synergy with calcineurin inhibition. These findings suggest that targeting costimulation blockade at CD28 preserves CTLA-4–dependent immune regulation and promotes allograft survival.

INTRODUCTION

T cells were identified as major players in immune responses after allotransplantation and in autoimmunity. T cell activation is induced by specific antigen recognition and reinforced by engagement of costimulatory molecules that regulate their differentiation into either pathogenic effector cells or anti-inflammatory regulatory cells. Costimulation by CD28 and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) contributes to determining this balance after initial antigen exposure. The current paradigm holds that constitutively expressed CD28 binds CD80/86 to provide a costimulatory signal important for sustaining T cell proliferation and proinflammatory responses (1). Furthermore, although CD28 signals are critical for regulatory T (Treg) cell homeostasis (2), CD28 engagement by CD80/86 molecules can inhibit Treg activity (3). CTLA-4, the other CD80/86 ligand, delivers antiproliferative signals to T cells (4), triggers indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (5) production in antigen-presenting cells (APCs), and is essential for the suppressive function of Treg cells (6) and the induction of tolerance to allografts (7, 8). Targeting the CD28-CD80/86 pathway in patients with CTLA-4-Ig (immunoglobulin) reagents (belatacept, abatacept, and CD80/86 antagonists)

is a promising alternative to current immunosuppressive treatments in autoimmunity (9, 10) and renal transplantation (11). However, CD80/86-specific blocking strategies inhibit CTLA-4 signals crucial to the function of Treg cells and do not reproducibly induce transplant tolerance (12, 13). We thus hypothesized that blocking CD28 without affecting CTLA-4 could be an effective strategy for modulating immune responses by preventing the maturation of pathogenic effectors while preserving the function of Treg cells. Here, we used non-cross-linking selective CD28 antagonists and showed that this treatment decreased the allogeneic immune response against kidney or heart transplant and prolonged allograft survival in two primate models.

RESULTS

CTLA-4–dependent and CTLA-4–independent components of CD28 blockade

sc28AT, a monovalent fusion antibody, competes with CD80/86 for binding to CD28 (14). Because the binding epitope is different from the epitope of superagonistic CD28 antibodies (15) (fig. S1A), sc28AT did not induce T cell receptor (TCR)–independent activation and proliferation of human T cells (fig. S1B) or human Treg cells (fig. S1C) *in vitro*. We investigated *in vitro* the consequences of selective CD28 blockade with sc28AT on cognate human T cell interactions with B cells used as APCs by live cell dynamic microscopy. sc28AT prevented the formation of stable T cell–APC conjugates, increased T cell motility, and reduced T cell activation as measured by calcium

¹INSERM U643, IITERT-Uro-Nephro, Centaure Network, CHU Nantes, 30 Bl J. Monnet, 44093 Nantes, France. ²Department of Surgery, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD 21201, USA. ³TCL Pharma SAS, 44035 Nantes, France. ⁴University of Nantes, UFR of Medicine, 44035 Nantes, France.

*These authors contributed equally to this work.

†These authors contributed equally to this work.

††To whom correspondence should be addressed. E-mail: gilles.blancho@chu-nantes.fr

RESEARCH ARTICLE

flux (Fig. 1, A to C, and movies S1 to S3). The effect of sc28AT on conjugate formation and T cell motility was abolished by the simultaneous blockade of CTLA-4 (Fig. 1, A and B), suggesting that the interaction of CTLA-4 with CD80/86 was essential for sc28AT-mediated activity. Although a minority of T cells still established prolonged contacts with APCs in the presence of sc28AT, these contacts resulted in greatly reduced calcium influx relative to T cells interacting with APCs in the absence of CD28 blockade, and this reduction was not reversed by CTLA-4 blockade (Fig. 1C and fig. S2). The importance of CTLA-4-CD80/86 interaction for T cell motility was confirmed after CD80/86 targeting by either CD80/86 antibodies or CTLA-4-Ig (Fig. 1B), which did not modify T cell-APC contacts but prevented T cell activation (Fig. 1, A and C). These data reveal CTLA-4-dependent (promotion of T cell motility and inhibition of T cell-APC contacts) and CTLA-4-independent (inhibition of T cell activation) components in the action of monovalent antibodies against CD28. Furthermore, sc28AT reduced the proliferation of human and primate T cells in mixed lymphocyte reactions (MLRs; Fig. 2A) and decreased cytokine release after stimulation of Jurkat T cells with superantigens (Fig. 2B), showing that inhibition of long-term T cell-APC contacts by specifically antagonizing CD28-CD80/86 interaction suppresses effector T (Teff) cell activation.

Compatibility of CD28 blockade with Treg function

Immunosuppressive drugs might either block or synergize with the suppressive activity of Treg cells. It was therefore important to analyze the consequences of CD28 blockade on the function of Treg cells. The suppression by Treg cells of the proliferation of naïve CD4⁺ T cells in response to allogeneic irradiated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) synergized with sc28AT, whereas addition of CTLA-4 antagonists blocked the suppression (Fig. 2C). To examine the effect of sc28AT specifically on Treg cells, we activated

Treg cells with allogeneic mature dendritic cells (mDCs) in the presence of sc28AT and secondarily tested for their ability to suppress the proliferation of naïve T cells stimulated with allogeneic mDCs. Treg suppression was significantly increased when Treg cells were primed in the presence of sc28AT, whereas it was not modified by CTLA-4 blockade (Fig. 2D). Together, these data suggest that signals through CTLA-4 and CD28 regulate positively and negatively, respectively, the regulatory activity of Treg. In particular, the enhanced Treg immunosuppressive capacity observed after CD28 blockade with sc28AT in vitro prompted us to examine the potential effect of this CD28 antagonist in vivo.

Selective CD28 blockade in transplantation

To investigate the action of CD28 blockade in vivo, we used a life-sustaining kidney transplant model in baboons. The animals were divided into four groups (Fig. 3A). (i) Without immunosuppressive treatment, kidney transplant was rejected within a week (median graft survival of 6 days) with acute biopsy-proven cellular rejection ($n = 3$). (ii) With monotherapy with the calcineurin inhibitor tacrolimus for 90 days, 50% of recipients developed a renal graft failure with a biopsy-proven cellular acute rejection during the first week after transplantation. The other 50% had stable kidney function over the 3-month experiment but developed cellular acute rejection within a week after withdrawal of the drug. The median survival time (MST) in this group was 47 days ($n = 4$; rejection at 6, 7, 94, and 97 days). (iii) sc28AT induction monotherapy for 25 days (see pharmacokinetic profiles in fig. S3A and description of target cells in fig. S3C) modestly, but significantly, prolonged graft survival ($n = 4$; MST, 11 days). (iv) Combined administration of tacrolimus (0 to 90 days) and sc28AT (0 to 25 days) resulted in a significant increase in graft survival ($n = 5$; MST, 103 days; 23, 36, 103, 130, and 269 days). No rejection episode (clinical or biopsy-proven) developed in any of these bitherapy recipients even after complete withdrawal of immunosuppression at day 90. However, three animals in this group were euthanized at days 23, 36, and 130 after developing pyelonephritis or acute tubular necrosis and one animal was lost at day 103 from an anesthetic accident. Anatomopathological analyses excluded rejection in these animals.

No differences were observed between groups with regard to CD3⁺, CD4⁺, or CD8⁺ T cell infiltration into the graft. In contrast, CD20⁺-infiltrating B cells were barely detectable after sc28AT treatment alone or in combination with tacrolimus, whereas they were abundant in kidney graft biopsies from untreated animals or animals treated with tacrolimus alone (fig. S4). Furthermore, mRNA concentrations of inflammatory cytokines interleukin-6 (*IL-6*) and interferon- γ (*IFN- γ*) were reduced in kidney graft biopsies 1 week after transplantation in animals treated with sc28AT relative to control untreated animals (fig. S5). In contrast, mRNA concentrations of transforming growth factor- β (*TGF- β*), as well as *CD25*, *CTLA-4*, *Foxp3*, and heme oxygenase-1 (*HO-1*), were increased in sc28AT-treated animals (fig. S5).

Absolute numbers of total lymphocytes and CD3⁺ T cells varied slightly within the normal range after sc28AT treatment (Fig. 3B) (16), indicating that sc28AT

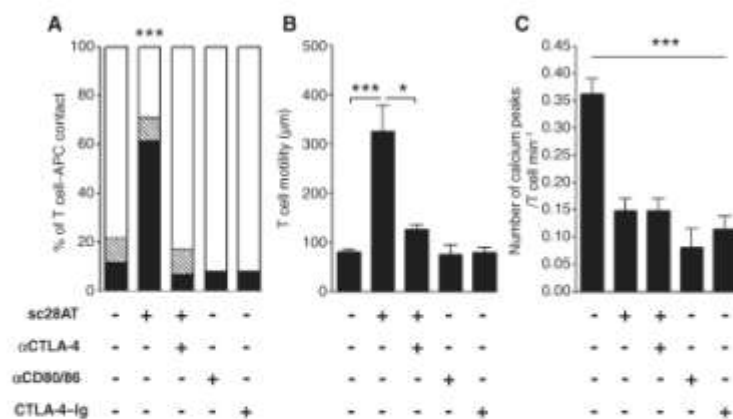


Fig. 1. CTLA-4-dependent impairment of T cell-APC contact after selective CD28 blockade. (A) Time-lapse microscopy of cognate contacts between EBV-specific T cells and B cell-EBV APCs in the presence of the indicated antibody. Results are shown as percentage of cells establishing short (≤ 5 min; black bars), medium (between 5 and 15 min; hatched bars), and long (≥ 15 min; white bars) contacts over 20 min. (B) T cells were cultured as in (A) and the cumulative distance moved of individual cells was recorded to assess T cell motility. (C) T cells were cultured as in (A) and calcium peaks were recorded. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

RESEARCH ARTICLE

did not induce T cell depletion. In addition, the expression of activation markers on T cells was not markedly modified by CD28 blockade (Fig. 3C and fig. S6A), although we observed an increase in the percentage of CD25⁺ T cells 1 week after transplantation in the sc28AT group (Fig. 3C, right panel). Serum levels of IFN- γ , tumor necrosis factor- α , IL-2, IL-4, IL-5, or IL-6 cytokines were low and similar in animals receiving sc28AT and controls (fig. S6B). Thus, interaction of sc28AT with CD28 on T cells did not result in polyclonal T cell activation.

To investigate the alloreactivity of peripheral T cells in kidney recipients that received sc28AT and tacrolimus bitherapy and failed to reject the allograft, we performed ex vivo MLR. The proliferative re-

sponse against donor cells was reduced after combination therapy, whereas the alloreactive response against cells from a third-party animal was preserved, suggesting the acquisition of donor-specific hyporesponsiveness in animals treated with sc28AT and tacrolimus (Fig. 3D).

Increase in Treg cells after transplantation and specific CD28 blockade

We determined levels of Treg cells with multiparameter flow cytometry. CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} Treg cells also expressed Foxp3, CTLA-4, and CD28 (Fig. 4A). After administration of sc28AT, alone or in combination with tacrolimus, the percentage of Treg cells increased by a factor of >2 within a week to reach 5 to 6% of CD4⁺ T cells relative to

3% in untreated recipients and 2% in recipients treated with tacrolimus alone (Fig. 4B). Absolute Treg counts similarly increased by factors of 2 to 3 in recipients treated with sc28AT alone or together with tacrolimus relative to their pretreatment levels and with untreated or tacrolimus-treated animals (Fig. 4C). Animal receiving tacrolimus alone did not display any change in levels of Treg during the 3-month treatment (Fig. 4, B and C). We investigated whether these phenotypically defined Treg cells were functional. CD25⁺ PBMCs harvested from control tacrolimus-treated ungrafted baboons were unable to suppress Teff cell proliferation (Fig. 4D). This is in agreement with a previous study showing that CD4⁺CD25⁺ T cells are barely detectable in peripheral blood of naïve baboons and this cell population does not exhibit suppressive activity (17). In contrast, CD25⁺ PBMCs obtained 90 days after transplant from kidney allograft recipients treated with sc28AT in combination with tacrolimus were very effective at suppressing Teff proliferation even at low Treg-to-Teff ratios (Fig. 4D).

The increase in Treg cells detected after transplantation was not due to nonspecific expansion of existing CD4⁺CD25⁺ Treg cells by sc28AT, because infusion of sc28AT at the same dose in nontransplanted baboons during a week did not elicit changes to the frequency of Treg cells (fig. S7).

T cells expressing Foxp3 and CTLA-4 accumulate in the kidney allograft after CD28 inhibition

To better characterize the localization of Treg cells in kidney graft recipients that received a bitherapy, we examined kidney biopsies for the presence of cells expressing the Treg markers Foxp3 and CTLA-4. We observed increased infiltration with T cells expressing Foxp3, CTLA-4, or both molecules 1 week after transplantation in animals treated with sc28AT monotherapy relative to untreated controls (Fig. 5, A and B). In recipients that received sc28AT plus tacrolimus, the number of infiltrating Treg cells expressing Foxp3 and CTLA-4 was initially low and similar to levels observed in recipients treated with tacrolimus alone (Fig. 5C). However, numbers of infiltrating Treg cells increased by factors of 2 to 3 within 1 to 3 months after transplantation in recipients treated with sc28AT and tacrolimus,

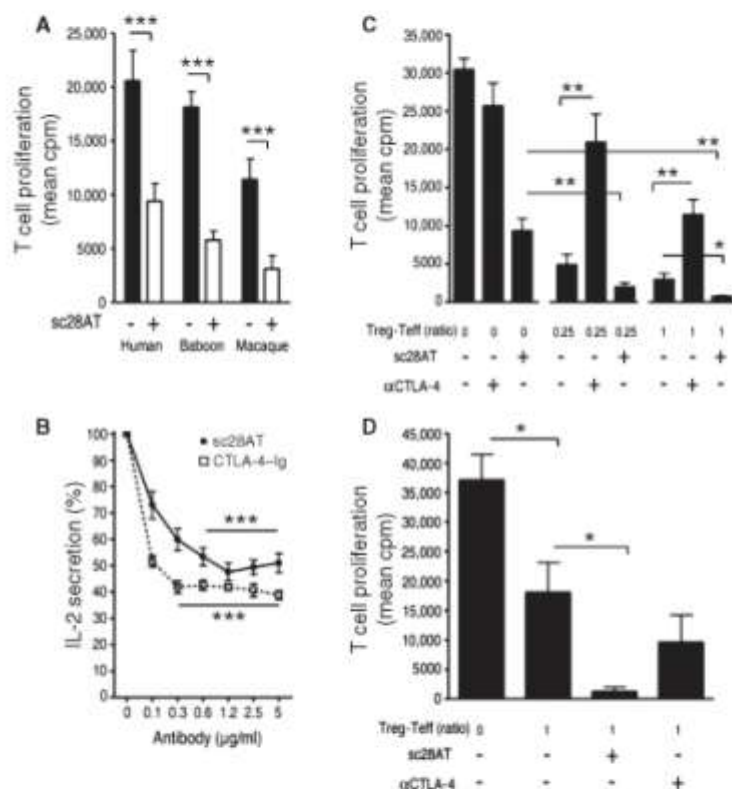


Fig. 2. Monovalent CD28 antagonists block allorecognition but do not impede the function of Treg cells in vitro. **(A)** Mixed lymphocyte reaction using human ($n = 10$), baboon ($n = 15$), or macaque ($n = 9$) PBMCs. Black bars, mean \pm SD in control conditions (mouse irrelevant IgG1); white bars, mean \pm SD with sc28AT (10 μ g/ml). **(B)** IL-2 secretion by Jurkat T cells stimulated with bacterial superantigen (staphylococcal enterotoxin E) and Raji B cells in the presence of sc28AT ($n = 8$) or CTLA-4-Ig ($n = 3$). Results are expressed as percentage of IL-2 secretion observed in the absence of antibody (100%). **(C)** Suppressive activity of human Treg is not impeded by CD28 blockade. Treg cells were added to CD4⁺CD25⁺ T cells stimulated with allogeneic irradiated PBMCs at the indicated ratio in the presence of CD28 or CTLA-4 (10 μ g/ml) blocking antibodies. Results are mean counts per minute (cpm) \pm SD of one of three representative assays. **(D)** Suppressive activity of human Treg pretreated with CD28 or CTLA-4 blocking antibody. Treg cells were first cultured with allogeneic mDCs in the presence of sc28AT or antibody against CTLA-4 Fab fragments (10 μ g/ml) for 18 hours, washed, and assessed in a suppression assay. Results are mean cpm \pm SD of one of three representative assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

RESEARCH ARTICLE

and Treg infiltration in kidney grafts was markedly higher in bitherapy recipients relative to recipients treated with tacrolimus alone (Fig. 5C).

IDO expression in kidney transplant after CD28 inhibition

IDO is an enzyme that is up-regulated after engagement of CD80/86 on APCs by CTLA-4 on T_H or Treg cells (18). IDO limits T cell re-

sponses by tryptophan deprivation and by the proapoptotic action of tryptophan catabolites (19). Comparison of IDO mRNA levels in groups treated with or without sc28AT (alone or in combination with tacrolimus) showed that selective CD28 blockade was accompanied by a notable increase in intragraft IDO mRNA expression (Fig. 6A). IDO expression was detectable by fluorescence microscopy in graft biopsies

Fig. 3. Administration of sc28AT and tacrolimus prevents kidney allograft rejection in baboons. **(A)** Rejection-free survival after renal allotransplantation for baboons without therapy ($n = 3$) or treated with a 25-day induction therapy with sc28AT alone ($n = 4$), tacrolimus for 90 days ($n = 4$), and sc28AT plus tacrolimus (25 and 90 days, respectively; $n = 5$). Vertical hash marks, death of recipients without graft rejection as assessed by histology. White square, remaining living baboon. $**P = 0.008$ versus tacrolimus monotherapy; $\#P = 0.01$ versus untreated controls. **(B)** Total lymphocyte counts (means \pm SD, top panel) and CD3⁺ T cell counts (bottom panel) in untreated recipients ($n = 3$) and recipients treated with sc28AT monotherapy ($n = 4$). **(C)** Phenotype of blood T cells during the first week after transplantation in controls ($n = 3$; left) and sc28AT monotherapy recipients ($n = 4$; right). T cells expressing the specified marker on days 0, 1, 2, 4, and 6 from left (black bars) to right (white bars). $*P < 0.05$. **(D)** Donor-specific hyporesponsiveness. PBMCs were harvested in the sc28AT plus tacrolimus group and tested in MLR against donor cells before transplantation (black bars) and at day 90 (white bars) and against third-party cells at day 90 (gray bars). Results are mean stimulatory index \pm SD of triplicate wells. Two experiments are shown. $**P = 0.0014$.

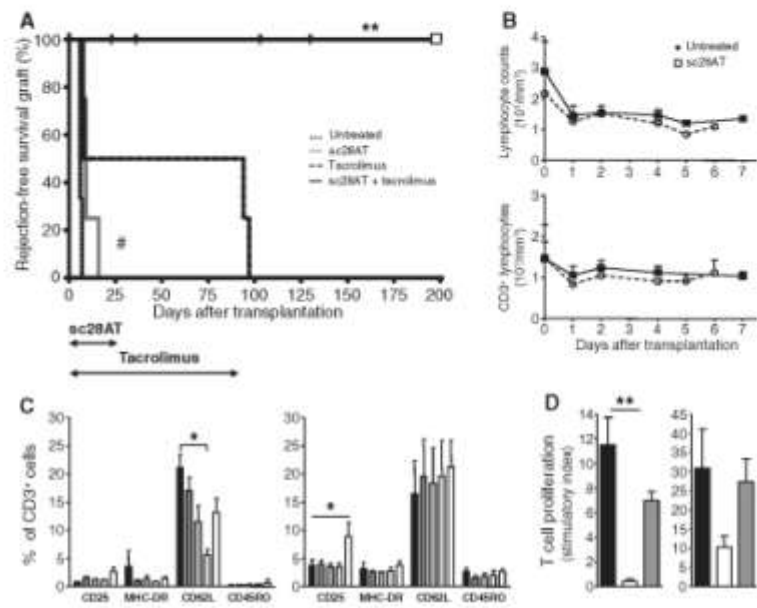
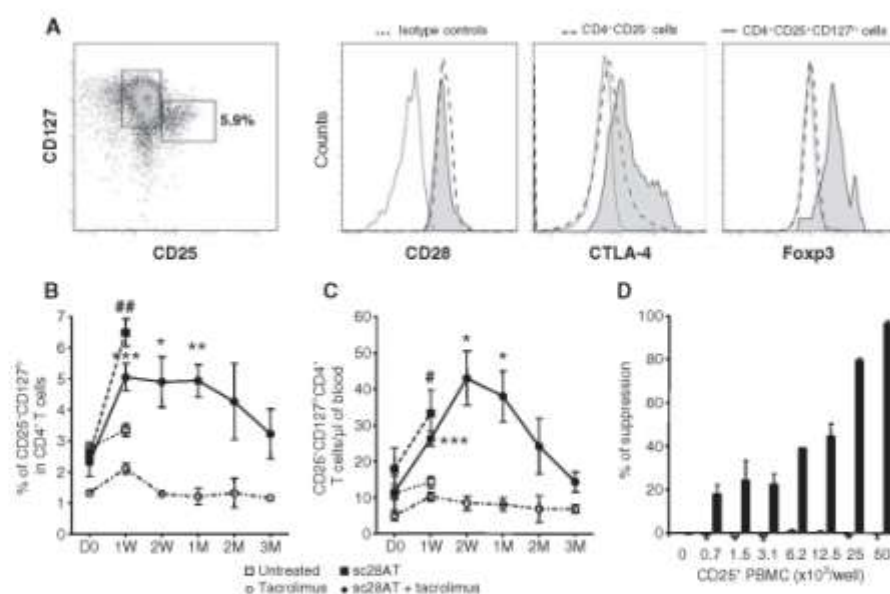


Fig. 4. Treg cell enrichment in the peripheral blood of kidney allograft baboon recipients treated with sc28AT. **(A)** CD25⁺CD127^{lo} Treg cells analyzed in blood by flow cytometry after gating on CD3⁺CD4⁺ cells. These cells also expressed CD28 and intracellular CTLA-4 and Foxp3. **(B and C)** Kinetics of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^{lo} Treg levels in blood, percentage of CD4⁺ T cells (B) or absolute number (C), in control untreated animals ($n = 3$), sc28AT monotherapy ($n = 4$), tacrolimus monotherapy ($n = 4$ until week 1 and then $n = 2$), and sc28AT plus tacrolimus ($n = 5$ up to 2 weeks, $n = 4$ at 1 month, and then $n = 3$). D, days; W, weeks; M, months. $\#P = 0.02$, $\#\#P = 0.0011$ versus untreated group; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ versus tacrolimus monotherapy group. **(D)** Suppressive activity of CD25⁺ PBMCs from sc28AT plus tacrolimus recipients at day 90 after transplantation (black bars; $n = 3$) or from control ungrafted baboons treated with tacrolimus (white bars; $n = 4$).



RESEARCH ARTICLE

from sc28AT-treated recipients (Fig. 6B) in association with CD31⁺ endothelial cells (Fig. 6C), DC-SIGN⁺-infiltrating cells (representing a subset of immature myeloid cells; Fig. 6D), and actin⁺ smooth muscle cells (Fig. 6E). IDO expression could not be detected in graft biopsies from untreated recipients or from recipients treated with tacrolimus alone (Fig. 6B).

Fig. 5. Increased Treg cell infiltration in kidney allografts after selective CD28 blockade with sc28AT. **(A)** Confocal-like microscopy analysis of a kidney graft biopsy from a sc28AT plus tacrolimus-treated recipient 1 month after transplantation. Blue, CD3 staining; green, Foxp3 staining; red, CTLA-4 staining. Scale bars, 10 μ m. **(B)** Quantitative evaluation of graft infiltration by T cells expressing Foxp3, CTLA-4, or both in control and sc28AT monotherapy recipients 1 week after transplant (expressed as percentage of CD3⁺ T cells). Data from individual animals are represented with a specific color and the four individual data points represent quadruplicate evaluations performed on two different tissue sections of the same animal. **(C)** Same as (B) in recipients treated with tacrolimus alone or sc28AT plus tacrolimus at 1 week, 1 month, and 3 months after transplant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

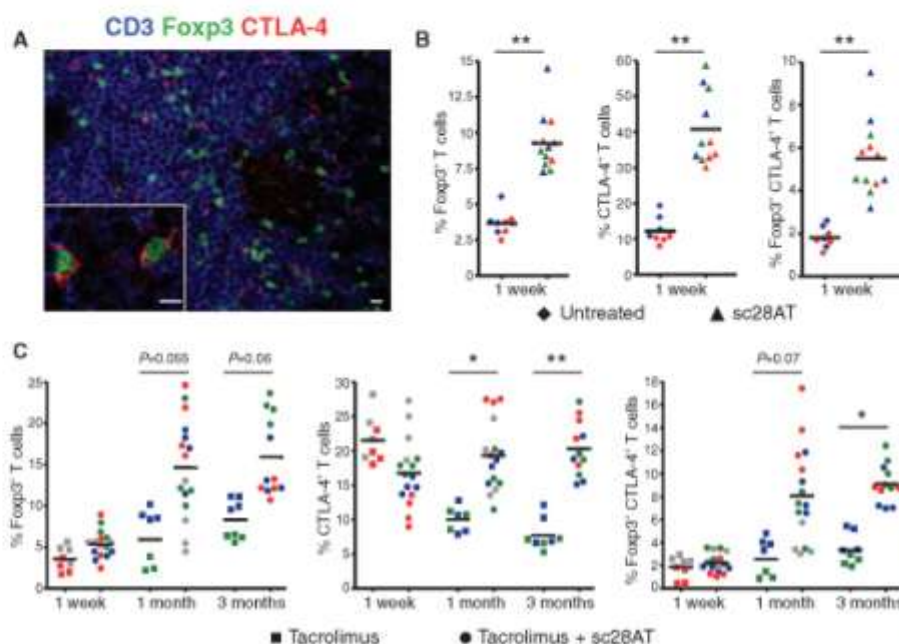
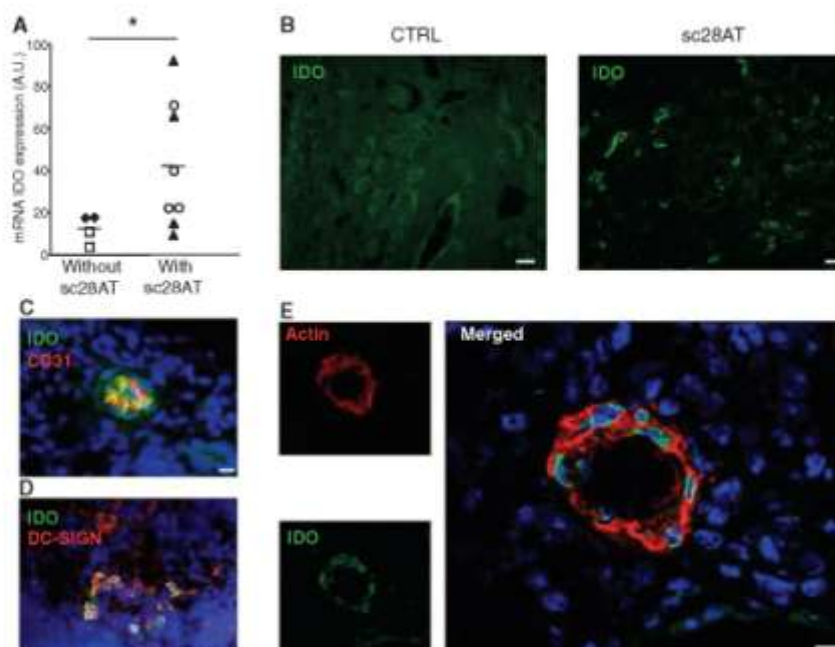


Fig. 6. Expression of IDO in allograft of sc28AT-treated recipients. **(A)** Quantitative PCR measurement of IDO mRNA transcripts 1 week after transplantation in kidney graft biopsies from control untreated (◆, $n = 2$) or tacrolimus alone-treated recipients (□, $n = 2$) and from sc28AT alone (▲, $n = 4$) or sc28AT plus tacrolimus recipients (○, $n = 4$). Each point represents the mean of duplicate measurements. * $P = 0.04$. **(B)** Immunohistology of biopsies from a control and a sc28AT-treated recipient labeled with an antibody against IDO (green) 1 week after transplantation. Scale bar, 100 μ m. **(C)** Costaining of IDO (green) and CD31, an endothelial cell marker (red), showing a small blood vessel. **(D)** Costaining of IDO (green) and DC-SIGN, a C-type lectin expressed by immature myeloid cells (red), in the renal parenchyma. **(E)** Costaining of IDO (green) and smooth muscle actin (red), showing colocalization in an arteriole. Nuclei are in blue. Scale bars, 10 μ m [(C) to (E)].

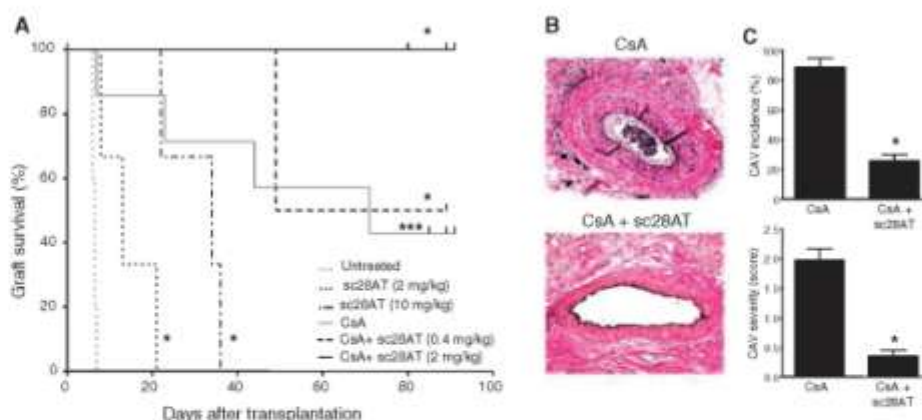


CD28 blockade inhibits acute and chronic rejection of heart allografts in macaques in synergy with calcineurin inhibition

We tested sc28AT in a more stringent model of heterotopic heart transplantation in the cynomolgus macaque (20) using sc28AT alone or in combination with a calcineurin inhibitor [cyclosporin A (CsA)].

RESEARCH ARTICLE

Fig. 7. Selective CD28 inhibition prolongs cardiac allograft survival and prevents CAV in macaques. **(A)** Cardiac allograft survival for monkeys without therapy ($n = 5$) or treated with sc28AT monotherapy at 2 mg/kg per day ($n = 3$) or 10 mg/kg per day ($n = 3$), CsA monotherapy ($n = 6$), CsA plus sc28AT at 0.4 mg/kg bitherapy ($n = 2$), or CsA plus sc28AT at 2 mg/kg bitherapy ($n = 3$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus control untreated recipients. **(B)** A representative vessel from a cardiac allograft treated with CsA (day 72, left panel) shows grade 2 CAV with distinct neointimal thickening and 10 to 50% (estimated at 25% in this instance) luminal narrowing. In contrast, a representative graft artery from a recipient treated with sc28AT plus CsA shows an absence of neointimal proliferation (day 80, bottom panel).



(C) CAV incidence and severity at days 70 to 90, graded as described in Materials and Methods, were significantly lower ($P < 0.05$) in CD28 blockade plus CsA combination therapy ($n = 4$) relative to CsA alone ($n = 5$).

The pharmacokinetic profiles are presented in fig. S3B. sc28AT bound to target T cells in the blood and showed tissue penetration in the spleen, lymph nodes, and, to some extent, thymus (fig. S3D). In macaques treated for 20 days with sc28AT monotherapy at 2 mg/kg ($n = 3$) or 10 mg/kg ($n = 3$), cardiac allografts had a median survival of 13 and 34 days, respectively (Fig. 7A). Thus, treatment with sc28AT alone resulted in a significant prolongation of graft survival relative to untreated monkeys (MST, 6 days; $n = 5$). Another group received CsA monotherapy that was dosed at 10 to 25 mg/kg intramuscularly daily to achieve therapeutic trough levels of >400 ng/ml (21). Four of eight treated animals exhibited symptomatic acute allograft rejection on days 7, 23, 44, and 71. One recipient died of an infection on day 26. The other three recipients exhibited graft survival >80 days without any evidence of clinical rejection, and transplanted hearts were electively explanted around day 90.

When CsA was combined with sc28AT at 0.4 mg/kg daily, one of two animals developed symptomatic rejection at day 49. When sc28AT was dosed at 2 mg/kg daily and combined with CsA, all three recipients displayed prolonged graft survival of >80 days. One animal was killed with a beating graft at day 80 because of a lymphoma, and the two remaining functional heart grafts were electively explanted around day 90 in the absence of any detectable clinical rejection. The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) rejection scores were consistently lower in protocol biopsies and explanted grafts from monkeys treated with sc28AT plus CsA relative to animals treated with CsA alone (fig. S8). Whereas all grafts treated with CsA monotherapy exhibited severe cardiac allograft vasculopathy (CAV) at the time of explant, CAV incidence and severity were significantly reduced when sc28AT was combined with CsA (Fig. 7, B and C).

In addition, long-term graft survival induced by CsA and CD28 blockade was associated with a control of alloantibody production that was otherwise induced in heart graft recipients under monotherapy during the first month after transplantation (fig. S9). We also analyzed levels of $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ Treg cells in the blood of two sc28AT monotherapy-treated recipients by flow cytometry. As expected, $>80\%$ of $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$ Treg cells expressed Foxp3 and $>50\%$ expressed CTLA-4. Treg cells represented $3.5 \pm 0.1\%$ of $CD4^+$ T cells before transplantation, and their level increased

to reach $6.3 \pm 0.4\%$ of $CD4^+$ T cells at 3 weeks after transplantation in sc28AT-treated recipients.

The synergy observed between sc28AT and CsA suggested that sc28AT might be used as calcineurin-sparing regimen to reduce allograft rejection while decreasing calcineurin toxicity. We therefore explored whether sc28AT combined with a subtherapeutic CsA regimen (CsA tapered to trough levels of 100 to 300 ng/ml within 2 weeks after transplant) modulates alloimmunity and CAV. Relative to monotherapy with sc28AT (MST, 22 days; range, 8 to 36; $n = 6$) or subtherapeutic CsA (MST, 38 days; range, 12 to 49; $n = 7$), addition of CD28 blockade prolonged graft survival (MST, 59 days; range, 21 to >88 ; $n = 6$; $P < 0.05$) (fig. S10A). Subtherapeutic CsA-treated grafts showed severe CAV as early as 2 weeks after transplantation (day 14 CAV score, 1.5 ± 0.8), whereas added CD28 blockade was associated with significantly attenuated CAV scores (day 14, 0 ± 0.01 ; $P = 0.036$) (fig. S10B).

DISCUSSION

Our study tested the immunoregulatory effect of selective CD28 blockade on kidney and heart allografts in primates. It had been shown previously in rodents that antibody-mediated CD28 downmodulation delayed acute rejection (22) or inhibited chronic rejection (23, 24) after organ transplantation. The lack of a CD28-specific modulating or antagonist antibody for humans or nonhuman primates has prevented verification of this effect in primates or in humans, where the role of Treg cells in transplant outcome is still a matter of debate (25, 26). We found that sc28AT, a chimeric human/primate CD28 monovalent antagonist antibody (27), selectively blocked CD28 interactions with its ligands without sharing superagonistic activity because it could not stimulate human Tefl or Treg cells in vitro, a feature characteristic of superagonistic antibodies. Also, sc28AT did not activate or deplete T cells in primates in vivo and did not increase Treg levels in nontransplanted primates. Thus, two major features differentiate sc28AT from a superagonistic antibody. First, sc28AT is monovalent and, as such, cannot induce CD28 receptor cross-linking (27). Second, it does not bind the target epitope

RESEARCH ARTICLE

on CD28 that is essential for inducing the TCR-independent superagonistic signal (15). Using sc28AT *in vivo*, we found that sc28AT synergized with calcineurin inhibitors to promote acceptance of both kidney and heart allografts in nonhuman primates. Furthermore, because an important goal of clinical transplantation is to eliminate calcineurin inhibitors or limit their use (because of their toxicity), induction treatment with sc28AT was also associated with a subtherapeutic regimen of CsA in the heart transplant model. This resulted in a significant delay in the occurrence of first rejection episodes and reduced the severity of CAV. These observations confirmed the synergy between calcineurin inhibition and CD28 blockade. However, because several grafts in this series were ultimately rejected, it also indicated the importance of a strong immunosuppression in the early post-operation period in this experimental mismatched transplantation setting. Finally, our data from the baboon model suggest that selective blockade of CD28 directly impaired T_H1 cells while promoting regulation provided by Treg cells, CTLA-4, and other immunomodulatory mediators such as IDO, HO-1, and TGF- β .

We showed that sc28AT antagonized T cell activation *in vitro* by preventing the formation of stable T cell-APC conjugates and by increasing T cell motility, which was otherwise reduced after cognate interactions with APCs through a TCR-induced stop signal (28). Antagonistic antibody against CTLA-4 reversed the effect of sc28AT treatment, in accordance with findings that CTLA-4 overrides the TCR-induced stop signal (28). Similar results were obtained when CTLA-4 engagement was prevented by CTLA-4-Ig or antibodies against CD80/86. These data suggest an intrinsic role for CTLA-4 in the T cell-inhibitory effect of sc28AT. However, another interpretation might be that in the context of deficient CTLA-4 signals, T cells can overcome CD28 blockade, possibly because of a decrease in the activation threshold, and manage enough signaling to lead to efficient interaction. In contrast, the reduction of calcium peaks in T cells that established a stable contact with APCs despite CD28 blockade could not be reversed by the simultaneous blockade of CTLA-4. Thus, the mechanism of action of selective CD28 blockade on T cells involves both CTLA-4-dependent and CTLA-4-independent components. Notably, sc28AT caused impaired alloreactive T cell proliferation in MLR *in vitro*, which could contribute to allograft survival *in vivo* by skewing the T_H1-Treg balance toward regulation.

An emerging hypothesis presents CD28 and CTLA-4 molecules as a "rheostat" for targeting T cell responses toward immunity or regulation, respectively (29). If CD28 is blocked, then CTLA-4-CD80/86 interactions would be favored and T cell responses would be shifted toward regulation. *In vitro*, we could block the suppressive activity of human Treg cells with Fab antibodies against CTLA-4, as has been shown in mice (30). In contrast, sc28AT did not block but instead increased the suppressive activity of Treg cells in accordance with data showing that CD28 stimulation abolishes the suppressive function of Treg cells (1).

In kidney or heart allograft transplantation in primates, acute rejection was prevented, chronic rejection was attenuated, and functional Treg cells were increased after treatment with sc28AT combined with calcineurin inhibitors. Donor-specific hyporesponsiveness was demonstrated in the kidney transplant model. Early graft biopsies showed less infiltration by CD20⁺ B cells, which have been associated with severe acute rejection (31). The reduction in B cell infiltration might be attributed classically to reduced help by T cells or to a direct effect of Treg cells on B cells (32). Indeed, sc28AT treatment

favored graft infiltration by T cells expressing Foxp3 and CTLA-4, which is associated with the suppressive function of Treg cells (6). Finally, examination of graft tissue revealed that selective CD28 blockade resulted in reduced levels of inflammatory cytokines but increased expression of immunoregulatory TGF- β , HO-1, and IDO. The effects on B and Treg cells might not be clinically relevant shortly after transplantation at a time when alloreactive T cells are strongly stimulated and Treg cells have not yet infiltrated the allograft. Indeed, the full control of acute rejection in the early post-transplant period could be achieved only in bitherapy with therapeutic levels of calcineurin inhibitors. However, Treg cells (and other induced immune regulation mechanisms) might become relevant to prevent late rejection events, because allograft survival persisted after withdrawal of the immunosuppressive treatment in several recipients. In addition, Treg cells could contribute to limit chronic rejection because CAV was consistently reduced in heart grafts in macaques. Furthermore, the exclusive availability of CD80/86 ligands for CTLA-4 binding and the role of CTLA-4 in immune regulation suggest that CTLA-4 could be important in this process.

What mechanisms underlie the induction of Treg cells in sc28AT-treated animals? The observation that the administration of sc28AT to nongrafted primates did not alter the frequency of Treg cells excluded a direct effect of the monovalent antibody. Rather, allogeneic T cells might have been driven to differentiate into Treg cells *in vivo* in response to the allograft because CD28 signaling was absent, whereas CTLA-4-CD80/86 interactions could take place. Indeed, although the survival of natural Treg cells is strictly CD28-dependent (2), the generation of adaptive Treg cells can occur in situations of suboptimal costimulation (33) or in the absence of CD28 signals (34). Additionally, selective CTLA-4 engagement can induce adaptive Treg cells with alloantigen specificity (35). The observation that PBMCs from kidney graft recipients treated with sc28AT and tacrolimus were hyporesponsive to donor APCs but not third-party cells is consistent with this possibility. In contrast to clinical immunosuppression achieved by a CD80/86 antagonist, which was not associated with induction of Treg cells and not relying on immune regulation (36, 37), our findings are consistent with previously reported downstream mechanisms of suppression attributed to Treg cells in transplantation, including release of TGF- β , expression of CTLA-4, and induction of IDO and HO-1 enzymes (38).

Our study shows that selective blockade of CD28 costimulation after transplantation reduced alloreactivity and increased the pool of peripheral Treg cells. In addition, Treg cells accumulated in the graft, where they likely modulated pathogenic T cells and promoted prolonged allograft survival. Whether selective CD28 blockade has significant practical advantages relative to CD80/86 blockade (11), as our model predicts, remains to be formally tested. However, the efficacy of CD28 antagonists in combination with conventional immunosuppression to inhibit acute and chronic allograft rejection in primates is promising. Although superagonistic activity has been excluded here, any translation of a CD28 antagonist into clinical application must first reevaluate that point.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

A nonactivating human CD28-specific single-chain Fv antibody fragment was developed from the CD28-specific CD28.3 clone (14) and linked to α_1 -antitrypsin (sc28AT) to prolong its half-life in the serum

RESEARCH ARTICLE

in vivo (27). sc28AT was produced by TcL Pharma and by a National Institutes of Health (NIH) production platform (K. Reimann, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) from transformed Chinese hamster ovary cells and purified from supernatant by ion exchange chromatography. sc28AT was quantified by two complementary specific sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (TcL Pharma). sc28AT cross-reacts with CD28 from cynomolgus monkey, baboon, and marmoset but not from dog, rabbit, rat, and mouse and has the same binding affinity as the parental murine Fab fragment (27). Antibody against human CTLA-4 (clone I47.1) was provided by Medarex. Fab monovalent fragments were prepared with Immunopure IgG1 Fab Preparation kit (Pierce). Antibodies against human CD80 (clone M24) and CD86 (clone IG10) were provided by Innogenetics. CTLA-4-Ig (LEA29Y) was prepared from transfected Cos cells in our laboratory. Fluorescent monoclonal antibodies (mAbs) against human CD3 (SP34-2), CD4 (L200), CD8 (RPA-T8), CD28 (28.6), CD25 (M-A251), CD45RO (UCHL1), CD62L (FMC46), CD127 (hIL-7R-M21), CTLA-4 (BNI3), and HLA-DR (G46-6) were from BD Biosciences. Biotinylated antibody against human α_1 -antitrypsin (Abcam) was used with streptavidin-phycoerythrin (Beckman Coulter) for sc28AT staining on T cells. The APC-conjugated antibody against human Foxp3 staining kit (PCH101 and 236A/E7) was purchased from eBioscience and used according to the manufacturer's instructions. Primary antibodies used for immunohistochemical staining were rabbit antibodies against human CD3 (DAKO) and human IDO-1 [provided by J. Anegon, Nantes, France (39)] and mouse antibodies against human CD11b (BEAR1; Beckman Coulter), human CD20 (L26; DAKO), human CD31 (LCI4; Serotec), human CTLA-4 (BNI3; BD Biosciences), human Foxp3 (236A/E7; eBioscience), human DC-SIGN (DCN46; BD Biosciences), and human α -smooth muscle actin (O.N.5; Abcam).

Epitope analysis

The determination of the epitope recognized by the CD28.3 antibody was performed by Agrobio. Briefly, CD28.3 Fab fragments were added to human CD28 (R&D Systems) immobilized on Sepharose. Immune complexes were reduced and alkylated with iodoacetamide (55 mM, 1 hour) before chymotrypsin (1 mg/50 mg of bound antibody) was added for 4 hours at 18° to 25°C. The Sepharose was then washed with 25 mM ammonium carbonate followed by 50 mM glycine (pH 2.5). Eluted peptides were then concentrated on a C18 matrix and analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (TOF)-TOF. The epitope was determined by peptide mass fingerprinting.

Live cell dynamic microscopy

A human Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4⁺CD28⁺ T cell clone (2×10^5 cells) (40) was stained with the Fura-2 acetoxymethyl ester probe (0.5 μ M for 30 min; Interchim), washed, and added to 4×10^5 human EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines [pool of cells from three donors, obtained as described (41)] on a coverslip coated with poly-L-lysine (0.001%; Sigma). Using the MetaFluor image analysis software (Molecular Devices), we acquired bright-field and fluorescent images at 15-s intervals on a Leica microscope (Leica Microsystems). Individual T cell-APC interactions and individual T cell calcium peaks were recorded manually over a 20-min incubation period with MetaFluor (version 7.1.7) and MetaMorph (version 7.5.6; Roper Scientific) software. A calcium peak was recorded when fluorescence levels reached twice the baseline level. T cells were tracked with the

ImageJ free software (version 1.41). The total number of cells analyzed was 60 cells for control condition (from 11 experiments), 31 cells for sc28AT condition (from 7 experiments), and 29 cells for sc28AT plus antibody against CTLA-4 (from 4 experiments), 13 cells for antibody against CD80/86 (from 3 experiments), and 26 cells for CTLA-4-Ig condition (from 5 experiments). Antibodies were all used at 10 μ g/ml. Data are presented as mean \pm SD for each condition.

Mixed lymphocyte reactions

PBMCs were isolated from whole blood by density centrifugation over Ficoll-Paque (Eurobio). Freshly isolated PBMCs were incubated with allogeneic irradiated PBMCs (10^5 cells per well of each cell type) for 5 days at 37°C and 5% CO₂ in complete medium (RPMI 1640, 10% heat-inactivated allogeneic pooled sera, 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, and 5 mM HEPES, all from Sigma). Cells were pulsed with 1 μ Ci of [³H]thymidine during the final 8 hours of culture and then harvested and counted in a scintillation counter. In other experiments, PBMCs were maintained in culture without allogeneic cells and assayed similarly as above.

Cytokine secretion assays

To assess IL-2 production by T cells, we stimulated 10^5 Jurkat T cells with 2×10^5 Raji B cells in microtiter plates in the presence of staphylococcus enterotoxin E (5 ng/ml) for 48 hours at 37°C and 5% CO₂ in complete medium. IL-2 secretion was evaluated in the supernatant with the Max Set Deluxe Human IL-2 ELISA kit (BioLegend). To analyze the synthesis of multiple cytokines by human PBMCs, we cultured 10^5 PBMCs from healthy humans in triplicate for 5 days in complete medium with control or antibodies to CD28. After 48 hours, 30 μ l of supernatant was collected from each triplicate, pooled, and analyzed for cytokine concentration with a Human Th1/Th2 Cytokine kit (BD Biosciences).

Suppression assays

All experiments were performed with PBMCs obtained from healthy donors. CD4⁺ T cells were enriched from PBMCs by negative selection with CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi) and an autoMACS separator (Miltenyi). Enriched CD4⁺ cells were then stained with mAbs against human CD4, CD25, and CD127 at 4°C for 30 min. CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} Treg cells and CD4⁺CD25^{lo} naive T cells were then sorted (purity routinely above 95%) with a high-speed cell sorter (FACS Aria, BD Biosciences) and FACSDiva software (BD Biosciences). CD4⁺CD25^{lo} cells (2×10^4) were cocultured with 10^5 allogeneic irradiated PBMCs and autologous CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} Treg cells at a 1:1 or 1:0.25 ratio for 5 days at 37°C and 5% CO₂ in human complete medium. Blocking antibodies were added at the start of the culture at 10 μ g/ml. Proliferation was assessed by [³H]thymidine incorporation during the last 8 hours of culture.

Allogeneic mDCs were generated from monocytes as described (42). Briefly, monocytes were enriched by dextranation (>85% CD14⁺) and cultured for 6 days in medium supplemented with IL-4 (40 ng/ml; R&D Systems) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1000 IU/ml; Gentaur). Cells were harvested on day 5 and cultured for 24 hours with lipopolysaccharide for maturation (1 μ g/ml; *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma). Allogeneic mDCs (5×10^5) were then cocultured with 5×10^4 Treg cells in complete medium with the indicated blocking antibodies (10 μ g/ml) for 18 hours. mDCs or Treg cells were washed and

RESEARCH ARTICLE

added to 5×10^4 CD4⁺CD25⁻ cells (same donor as Treg cells) stimulated with 5×10^3 allogeneic mDCs (same donor as mDCs used for Treg activation). Cells were then cultured for 5 additional days, and proliferative responses were assessed by [³H]thymidine incorporation.

Baboon Treg suppression assays

CD25⁺ and CD25⁻ cells were prepared from PBMCs during the third month after transplantation with fluorescein isothiocyanate (FITC) mAb against human CD25 and specific anti-FITC microbeads (Miltenyi) and positive or negative selection, respectively. To determine suppression, we mixed 10^5 carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled CD25⁻ PBMCs with different numbers of unlabeled CD25⁺ PBMCs (at ratios of 1:0.5 to 1:0.0078) in duplicate wells of a plate previously coated with antibodies against human CD3 (10 µg/ml; 2 hours at 37°C). The proliferative response was evaluated after 3 days by measuring the percentage of CFSE-diluted cells by flow cytometry. The percentage of suppression was calculated by comparing the percentage of proliferated cells (CFSE dilution) in the presence of indicated numbers of CD25⁺ PBMCs to the percentage of proliferated cells in the absence of CD25⁺ cells (= maximal proliferation).

Animals

Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (2 to 3 kg) were obtained from Covance Research Products and Three Springs Scientific Inc. Baboons (*Papio anubis*) (6 to 15 kg) were obtained from the Centre National de la Recherche Scientifique Primate Center. Experiments performed on macaques were in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Maryland Medical School and carried out in compliance with the Department of Health and Human Services-NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Experiments performed in baboons complied with recommendations of the Institutional Ethical Guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France). The donor-recipient combinations were chosen according to blood group compatibility, major histocompatibility complex (MHC) mismatching by DRB MHC class II locus typing, and verification of MHC incompatibility by MLR (stimulatory index > 5).

Renal transplantation in baboons

Renal allotransplantation was performed in binephrectomized recipients, as described (43). Twenty-four-hour diuresis was monitored daily, as well as blood urea nitrogen. Transplantectomies were performed when plasma creatinine levels rose up to 400 µM, and surgical biopsies were performed for histological examination before euthanasia. One biopsy fragment was collected for hematoxylin and eosin (H&E)-blinded histological examination by a pathologist. A second fragment was snap-frozen in liquid nitrogen for mRNA extraction, and a third fragment was placed in Tissue-Tek (Sakura Finetek) for immunohistochemical staining. Protocol biopsies were performed at 1 week, 1 month, and 3 months after transplantation. Control groups either were untreated ($n = 3$) or received tacrolimus alone (Prograf, provided by Astellas) ($n = 4$). Tacrolimus was given once daily from day 0 to day 90 after transplantation (0.05 to 0.15 mg/kg intramuscularly) to achieve target therapeutic trough levels (10 to 20 ng/ml). sc28AT was administered once daily (4 mg/kg intravenously) during the first 25 days after transplantation. Blood samples were collected for fluorescence-activated cell sorting analysis and assessment of serum levels of

sc28AT and cytokines (Non-Human Primate Th1/Th2 Cytokine kit, BD Biosciences) before the daily administration of sc28AT.

Cardiac transplantation in cynomolgus monkeys

All recipient animals underwent heterotopic intra-abdominal cardiac allograft transplantation, as described (44). Surgical cardiac biopsies were performed on postoperative days 7, 14, and 28 and monthly thereafter until graft explant. Graft function was monitored daily by palpation and implanted telemetry (Data Sciences International). Clinical acute graft rejection was detected as consistent high body temperature (>38.5°C) coupled with either a decrease in graft heart rate (to <120 beats per minute or a drop of >40 beats per minute from a stable baseline) or an increase in graft diastolic pressure of >10 mmHg. Graft rejection was defined as loss of contraction by telemetry and confirmed at explant and was always preceded by signs of acute rejection. Control groups either were left untreated ($n = 5$) or received CsA (Neoral, Novartis) ($n = 6$). CsA was given once daily (5 to 25 mg/kg intramuscularly) to achieve target therapeutic (>400 ng/ml) or subtherapeutic (100 to 300 ng/ml) trough levels. sc28AT was given as indicated in Fig. 7. In three therapeutic CsA-treated animals, a first episode of symptomatic acute rejection was treated with three daily steroid boluses (10 mg/kg; Solu-Medrol, Pharmacia). Rejection was reversed in two of the three treated animals. In one therapeutic CsA-treated animal, suspected rejection based on histological analysis of the biopsy tissue sample was also treated with a 3-day course of steroids. One recipient died of infection different from the ones that rejected the heart at day 26 and was excluded from statistical analysis. Cellular infiltrates were analyzed on H&E-stained paraffin sections and graded for acute rejection by ISHLT criteria (45). CAV incidence in beating hearts explanted after day 70 (therapeutic CsA group) or in weekly sample biopsies (subtherapeutic CsA group) was recorded as percent of arteries and arteriolar vessels involved (CAV score ≥ 1) at each time point. CAV severity was scored in these explanted hearts as follows: grade 0, normal arterial morphology; grade 1, activated endothelial cells with enlarged nuclei and/or adherent leukocytes, without luminal narrowing (<10%); grade 2, distinct neointimal thickening, luminal narrowing <50%; grade 3, extensive neointimal proliferation with >50% luminal occlusion. Scoring was independently performed for each explanted heart by three evaluators (T.Z., R.N.P., and B.N.) blinded with respect to the treatment group. The mean CAV score for each biopsy or explant was calculated with the following equation: (#grade 0 vessels $\times 0$ + #grade 1 vessels $\times 1$ + #grade 2 vessels $\times 2$ + #grade 3 vessels $\times 3$)/total number of arterial vessels scored. Individual means were averaged to calculate the group mean \pm SD for each treatment group.

Immunohistochemical staining

Serial frozen sections (10 µm) were prepared from surgical or protocol renal biopsies. Slides were air-dried at room temperature for 1 hour before acetone fixation for 10 min at room temperature. Sections were saturated with phosphate-buffered saline containing 10% baboon serum, 2% normal goat serum, and 4% bovine serum albumin. Sections were incubated overnight with primary antibodies at 4°C, followed by fluorescent secondary antibodies and nuclear staining (4',6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen). For intracellular immunostaining (CTLA-4, Foxp3, and IDO), sections were permeabilized with 0.5% saponin (Sigma) in the saturating solution. Treg infiltration was determined by a triple staining with antibodies against human CD3 (followed by

RESEARCH ARTICLE

Alexa Fluor 350-conjugated antibody against rabbit IgG; Invitrogen), human CTLA-4 (followed by Alexa Fluor 594-conjugated antibody against mouse IgG2a; Invitrogen), and human Foxp3 (followed by Alexa Fluor 488-conjugated antibody against mouse IgG1; Invitrogen). The percentage of CD3⁺ cells expressing Foxp3, CTLA-4, or both was quantified manually (by an investigator blinded to the experimental conditions) on four different pictures from two different areas of each tissue section separated by at least 100 μ m. IDO localization was determined by double staining with antibodies against human IDO-1 (followed by FITC-conjugated antibody against rabbit IgG; Jackson ImmunoResearch) and human CD31, human DC-SIGN, or human α -smooth muscle actin (followed by Alexa Fluor 568-conjugated antibody against mouse IgG; Invitrogen). The specificity of IDO-1 staining was confirmed by competition experiments with the IDO-1 peptide that had been used to raise the antibody. Slides were analyzed with standard fluorescence microscopy or confocal-like microscopy (ApoTome, Carl Zeiss) and the AxioVision imaging software (Carl Zeiss).

Messenger RNA analysis

Messenger RNA was extracted from snap-frozen renal biopsies with RNA microextraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of mRNA were controlled by infrared spectrometry (NanoDrop, Thermo Scientific). Messenger RNA was amplified and retrotranscribed with the Omniscript RT kit (Qiagen), and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was then performed, as previously described (43), with an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer). Amplifications were performed for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (probe Hs99999909_m1; Applied Biosystems), IDO (forward, 5'-ACGGTCTGGTGTATGAGGGT-3'; reverse, 5'-CACGGACTGAGGGATTGACT-3'), IL-2 receptor (probe Hs00907778_m1; Applied Biosystems), CTLA-4 (forward, 5'-TCTTCATCCCTGTCTTCTCAA-3'; reverse, 5'-GGTCAATCCATTCCCATCA-3'), Foxp3 (forward, 5'-CCCTGCCCTTCTCATCCA-3'; reverse, 5'-GTGGCCCGGATGTGAAAA-3'), HO-1 (probe Hs00157965_m1; Applied Biosystems), IFN- γ (forward, 5'-TGGGTCTCTTGGCTGTACTG-3'; reverse, 5'-TTAATGCTCTCCCTTGGTCTCC-3'), and IL-6 (probe Hs00174131_m1; Applied Biosystems).

Statistical analyses

Graft survival times were plotted with the Kaplan-Meier representation, and survival time between different groups was evaluated with a log-rank test. Continuous variables were expressed as the mean \pm SD, unless otherwise indicated, and compared with the Mann-Whitney nonparametric test. MLR data were analyzed with unpaired *t* tests. Discrete variables (that is, incidence of early rejection) were compared with a contingency table and the χ^2 test. *P* values of <0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed on a personal computer with the statistical package SPSS for Windows XP (version 11.0, SPSS) or GraphPad InStat (version 5.1, GraphPad Software).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

www.science translationalmedicine.org/cgi/content/full/2/17/17ra10/DC1

Fig. S1. Nonagonistic properties of monovalent fragments from the CD28 antibody.

Fig. S2. Calcium flux profiles in vitro.

Fig. S3. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of sc2B8T.

Fig. S4. Immunohistological analysis of kidney graft biopsies.

Fig. S5. qPCR measurement of mRNA transcripts in kidney graft biopsies.

Fig. S6. Nonagonistic properties of sc2B8T in vivo.

Fig. S7. Sc2B8T daily injection in naive baboons does not enhance peripheral regulatory T cells.

Fig. S8. Representative histological analysis of cynomolgus monkey heart allografts at 3 months after transplantation (H&E staining).

Fig. S9. Long-term graft survival induced by CsA and CD28 blockade is associated with control of alloantibody production.

Fig. S10. Selective CD28 blockade synergized with low dose of cyclosporin A to delay cardiac allograft rejection and cardiac allograft vasculopathy in macaques.

Movies S1 to S3. Time-lapse microscopy analyses of T cell motility in vitro.

REFERENCES AND NOTES

1. Takahashi, Y., Kunisysu, M., Toda, N., Sakaguchi, M., Itoh, M., Iwata, J., Shimizu, S., Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* **10**, 1969–1980 (1998).
2. B. Salomon, D. J. Linschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, J. A. Bluestone, B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431–440 (2000).
3. Y. Zheng, C. N. Marzetti, M. Liu, F. Burke, K. L. Mead, D. M. Sansom, CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J. Immunol.* **172**, 2778–2784 (2004).
4. P. Waterhouse, J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Greiner, T. W. Mak. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ota-4. *Science* **270**, 985–988 (1995).
5. A. L. Mellor, D. H. Munn, IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 762–774 (2004).
6. K. Wing, Y. Onishi, P. Pilero-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, S. Sakaguchi, CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–275 (2008).
7. X. X. Zhang, T. G. Makkes, W. W. Hancock, Y. Li, D. L. Greiner, X. C. Li, J. P. Mordes, M. H. Sayegh, A. A. Rossini, T. B. Strom, CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. *J. Immunol.* **162**, 4983–4990 (1999).
8. M. K. Tsai, H. N. Ho, H. F. Chien, P. Ou-Yang, C. J. Lee, P. H. Lee, The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: A crosscheck hypothesis. *Transplantation* **77**, 48–54 (2004).
9. M. L. Alegre, K. A. Frauwirth, C. B. Thompson, T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 220–228 (2001).
10. J. M. Kremer, R. Westhovens, M. Leon, E. Di Giorgio, R. Aerts, S. Steinfeld, A. Ruzell, M. Dougados, P. Emery, I. F. Nuamah, G. R. Williams, J. C. Becker, D. T. Hagerly, L. W. Moreland, Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1907–1915 (2003).
11. F. Vincont, C. Lamsen, A. Durbach, T. Wiskerke, B. Nathan, G. Blanches, P. Lang, J. Griboy, P. F. Halloran, K. Soley, D. Hageny, E. Levy, W. Zhou, K. Natarajan, B. Charpentier, Belatacept Study Group. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **353**, 770–781 (2005).
12. A. D. Kirk, D. K. Tadaki, A. Colnker, D. S. Batty, J. D. Bering, J. O. Colonna, F. Cruzata, E. A. Elter, G. S. Gray, R. L. Kampen, N. B. Patterson, P. Sebat, J. Swanson, H. Xu, D. M. Harlan, Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* **72**, 377–384 (2001).
13. K. G. Haanstra, J. Rihgen, E. A. Sick, S. Rendlen-Mueller, E. M. Kuhn, L. Boon, M. Jonker, Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation* **75**, 607–613 (2003).
14. J. Nunes, S. Klasen, M. Regueneau, C. Pavin, D. Couez, C. Mawais, M. Bagnatoc, D. Olive, CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: Analysis of early and late activation events. *Int. Immunol.* **5**, 311–315 (1993).
15. F. Lüdtke, Y. Huang, K. M. Donnelly, C. Gantemann, I. Müller, E. Winkler, T. Korfa, S. Kurmita, S. J. Davis, T. Hanks, T. Hink, Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J. Exp. Med.* **197**, 955–966 (2003).
16. H. J. Schuurman, H. T. Smith, E. Cozzi, Reference values for clinical chemistry and clinical hematology parameters in baboons. *Xenotransplantation* **11**, 511–516 (2004).
17. C. M. Porter, J. A. Horvath-Ardalaco, A. K. Singh, K. A. Horvath, E. T. Bloom, M. M. Mohiuddin, Characterization and expansion of baboon CD4⁺CD25⁺ Treg cells for potential use in a non-human primate xenotransplantation model. *Xenotransplantation* **14**, 298–308 (2007).
18. D. H. Munn, M. D. Sharma, A. L. Mellor, Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* **172**, 4100–4110 (2004).

RESEARCH ARTICLE

19. U. Grothmann, C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Caldinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fierotti, P. Puccetti, CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 1097–1101 (2002).
20. A. M. Azimzadeh, S. Pfeiffer, G. Wu, C. Schröder, G. L. Zorn III, S. S. Kellshadi, E. Ozkayrak, M. Kehy, J. B. Atkinson, G. G. Miller, R. N. Pierson II. Allosmunity in primate heart recipients with CD154 blockade: Evidence for alternative costimulation mechanisms. *Transplantation* **81**, 255–264 (2006).
21. H. J. Schuurman, W. Slingerland, K. Menninger, M. Ossevoort, J. C. Hengy, B. Dorobek, J. Vonderscher, J. Ringers, M. Gdeh, M. Jonker. Pharmacokinetics of cyclosporine in monkeys after oral and intramuscular administration: Relation to efficacy in kidney allografting. *Transp. Int.* **14**, 320–328 (2001).
22. T. J. Dengler, G. Szabo, B. Sido, W. Nitschmeyer, R. Zimmermann, C. F. Vah, T. Hönl, S. C. Meier. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody Δ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* **67**, 392–398 (1999).
23. V. M. Dong, X. Yuan, A. J. Coto, A. M. Waaga, M. H. Sayegh, A. Chandraker. Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* **73**, 1310–1317 (2002).
24. C. Guillonnet, C. Séveno, A. S. Dugant, X. L. Li, K. Rimaudin, F. Harpot, C. Uta, J. Verziere, I. Anegón, B. Vanhove. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40lg-treated heart allograft recipients. *J. Immunol.* **179**, 8164–8171 (2007).
25. S. Louis, C. Breudeau, M. Gini, A. Dupont, F. Moizant, N. Robillard, A. Moreau, J. P. Souillou, S. Brocard. Contrasting CD28/CD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* **81**, 398–407 (2006).
26. C. M. Alvares, G. Opelz, L. F. Garcia, C. Sosa. Expression of regulatory T-cell-related molecule genes and clinical outcome in kidney transplant recipients. *Transplantation* **87**, 857–863 (2009).
27. B. Vanhove, G. Laflamme, F. Coulon, M. Mough, P. Vusto, J. Harpot, J. Tollier, J. P. Souillou. Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv- α_1 -antitrypsin fusion antibody. *Blood* **102**, 564–570 (2003).
28. H. Schneider, J. Downey, A. Smith, B. H. Zinselmeyer, C. Rush, J. M. Brewer, B. Wei, N. Hogg, P. Ganside, C. E. Rudd. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* **313**, 1972–1975 (2006).
29. D. M. Sansom, C. N. Manzotti, Y. Zheng. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* **24**, 314–319 (2003).
30. Q. Tang, E. K. Boden, K. J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi, J. A. Bluestone. Distinct roles of CTLA-4 and TGF- β in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2996–3005 (2004).
31. M. Sarwal, M. S. Chua, N. Kamthorn, S. C. Hsieh, T. Sattenwhite, M. Masik, O. Salvatierra Jr. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N. Engl. J. Med.* **349**, 125–138 (2003).
32. J. Ludwig-Portugal, E. E. Hamilton-Williams, C. Gottschalk, C. Kiers. Cutting edge: CD25⁺ regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *J. Immunol.* **181**, 4447–4451 (2008).
33. K. Kretschmer, I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazale, M. C. Nussenzweig, H. von Boehmer. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* **6**, 1219–1227 (2005).
34. M. Belghith, J. A. Bluestone, S. Bartot, J. Mégret, J. F. Bach, L. Chatenoud. TGF- β dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat. Med.* **9**, 1202–1208 (2003).
35. R. Li, N. Perez, S. Karamuthi-Melethil, B. S. Prabhakar, M. J. Holzman, C. Vizu, Enhanced engagement of CTLA-4 induces antigen-specific CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ and CD4⁺CD25⁺ TGF- β 1⁺ adaptive regulatory T cells. *J. Immunol.* **179**, 5191–5203 (2007).
36. H. Chavez, S. Braudneu, K. Abbed, Y. Taoufic, F. Kriaa, B. Chaepentier, A. Durbach. Absence of CD4CD25 regulatory T cell expansion in renal transplanted patients treated in vivo with Belatacept mediated CD28-CD80/86 blockade. *Transp. Immunol.* **17**, 243–248 (2007).
37. J. A. Bluestone, W. Liu, J. M. Yaba, Z. G. Liszka, A. Putnam, M. Bellingher, D. M. Geiss, R. M. Townsend, F. Vincent. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am. J. Transp. Int.* **8**, 2086–2096 (2008).
38. Q. Tang, J. A. Bluestone. The Foxp3⁺ regulatory T cell: A jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* **9**, 239–244 (2008).
39. M. Hill, S. Tanguy-Royer, P. Royer, C. Chauveau, K. Asghar, L. Tesson, F. Lavalme, S. Rémy, R. Biron, F. X. Hubert, M. Heslan, M. Rimbert, L. Berthelot, J. R. Mollere, R. Josien, M. Grégoire, I. Anegón. IC0 expands human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 3054–3062 (2007).
40. C. Blich, X. Saulquin, G. Gallot, R. Wiers, C. Ferrand, P. Tiberghien, E. Houssaint, H. Vié. The T cell repertoire selected in vitro against EBV: Diversity, specificity, and improved purification through early IL-2 receptor α -chain (CD25)-positive selection. *J. Immunol.* **164**, 4924–4932 (2000).
41. G. Gallot, S. Vollar, R. Wiers, B. Clémenceau, C. Ferrand, P. Tiberghien, J. Gaschet, N. Robillard, H. Vié. Selection of Epstein-Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes can be performed with B lymphoblastoid cell lines created in serum-free media. *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 158–168 (2006).
42. C. Chauveau, S. Rémy, P. J. Royer, M. Hill, S. Tanguy-Royer, F. X. Hubert, L. Tesson, R. Biron, G. Beriou, M. Grégoire, R. Josien, M. C. Côté, L. Anegón. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* **106**, 1694–1702 (2005).
43. G. Bouday, J. Ashton-Chess, P. Bernard, G. Karam, H. Vié, A. Moreau, D. Minault, K. Lorré, J. P. Souillou, G. Blancha. Association of rapamycin and co-stimulation blockade using anti-B7 antibodies in renal allotransplantation in baboons. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 1752–1760 (2004).
44. R. N. Pierson II, A. C. Chang, M. G. Blum, K. S. Blair, M. A. Scott, J. B. Atkinson, B. J. Collins, J. P. Zhang, D. W. Thomas, L. C. Burky, G. G. Miller. Prolongation of primate cardiac allograft survival by treatment with anti-CD40 ligand (CD154) antibody. *Transplantation* **68**, 1800–1805 (1999).
45. M. E. Bellingham, N. R. Cary, M. E. Hammond, J. Kemnitz, C. Marboe, H. A. McCallister, D. C. Snow, G. L. Winters, A. Zerbe. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J. Heart Transplant.* **9**, 587–593 (1998).
46. Acknowledgments: We thank A. Lazaris, C. Avon, X. Cheng, N. Sengamparar, E. Welly, D. Minault, C. Lefevre, S. Lebas-Bernadet, P. Huln (IR26, Nantes, France), and T. Haudebourg for technical assistance.
- Funding: Roche Organ Transplantation Research Foundation grant 466230972 (B.V.); Prognosis Foundation (Nantes, France); Tcd Pharma (Nantes, France); NIH grant U01 AI 066719; American Society of Transplant Surgeons Mid-Career Award; Department of Defense Operational Requirements Document contract N00014-04-1-0621; and American Heart Association Grant-in-Aid (R.N.P.); and Maryland Restoration Fund Program Other Tobacco Related Diseases research grant (AMA and RNP).
- Author contributions: NP performed baboon experiment and in vitro experiments, interpreted the data, and prepared the manuscript. AMA initiated and designed the *M. fascicularis* study, performed experiments, interpreted the data, and prepared the manuscript. T.Z. conducted heart transplantations and histology analysis in *M. fascicularis*. N.D. and C.M. performed experiments. B.N. conducted heart transplantations and histology analysis in *M. fascicularis*. X.T. conducted kidney transplantations in baboon. G.W. assisted with heart transplantations in *M. fascicularis*. K.R. analyzed the kidney biopsies. J.H. assisted with kidney transplantations in baboon. B.M. prepared and purified recombinant molecules. G.K. conducted kidney transplantations in baboons. F.C. prepared antibodies and antibody fragments and performed ELISA. E.A.-L. assisted with immunohistological analyses. J.-P.S. analyzed the data and edited the manuscript. R.N.P. founded the research, designed *M. fascicularis* experiments, analyzed the data, and edited the manuscript. G.B. organized and designed the baboon experiments, supervised the analyses, and edited the manuscript. B.V. founded the research, designed experiments, performed experiments, analyzed the data, and prepared the manuscript.
- Competing interests: B.V. and J.-P.S. are shareholders in Tcd Pharma, a company that is developing CD28 antagonists.

Submitted 24 April 2009

Accepted 15 January 2010

Published 3 February 2010

10.1126/scitranslmed.3000116

Citation: N. Poirier, A. M. Azimzadeh, T. Zhang, N. Dilek, C. Mary, B. Nguyen, X. Tillou, G. Wu, K. Rimaudin, J. Hervouet, B. Martinez, F. Coulon, E. Allain-Launay, G. Karam, J.-P. Souillou, R. N. Pierson II, G. Blancha, B. Vanhove. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci. Transl. Med.* **2**, 17ra10 (2010).

III- Annexe III

**La déplétion des lymphocytes activés LAG-3+
médiée par des anticorps anti-LAG-3 prévient
l'hypersensibilité retardée chez le primate non-humain.**

Nicolas POIRIER*, **Thomas HAUDEBOURG***, **C BRIGNONE**, **Nahzli DILEK**, **Jeremy HERVOUET**, **David MINAULT**, **Flora COULON**, **Romain VUILLEFROY DE SILLY**, **FREDERIC TRIEBEL**, **Gilles BLANCHO** et **Bernard VANHOVE**.

** Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.*

Article publié dans *Clinical & Experimental Immunology*. 2011 May;164(2):265-74.

Titre original : *Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3(+))-activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates.*

Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3⁺)-activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates

N. Poirier,^{*†} T. Haudebourg,^{*†}
C. Brignone,^{*} N. Dilek,^{*} J. Hervouet,^{*}
D. Minault,^{*} F. Coulon,^{*}
R. V. de Silly,[†] F. Triebel,[†] G. Blancho^{*†}
and B. Vanhove^{*†}

^{*}INSERM, UMR643; Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, and [†]Immunop SA, Orsay, France

Accepted for publication 5 January 2011
Correspondence: G. Blancho, ITUN, INSERM UMR643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.
E-mail: gilles.blancho@chu-nantes.fr
E-mail for the senior author: bernard.vanhove@univ-nantes.fr

[†]These authors contributed equally to the first and the last authorship of this study, respectively.

Summary

Lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3, CD223) is a marker for recently activated effector T cells. Activated T lymphocytes are of major importance in many autoimmune diseases and organ transplant rejection. Therefore, specifically depleting LAG-3⁺ T cells might lead to targeted immunosuppression that would spare resting T cells while eliminating pathogenic activated T cells. We have shown previously that anti-LAG-3 antibodies sharing depleting as well as modulating activities inhibit heart allograft rejection in rats. Here, we have developed and characterized a cytotoxic LAG-3 chimeric antibody (chimeric A9H12), and evaluated its potential as a selective therapeutic depleting agent in a non-human primate model of delayed-type hypersensitivity (DTH). Chimeric A9H12 showed a high affinity to its antigen and depleted both cytomegalovirus (CMV)-activated CD4⁺ and CD8⁺ human T lymphocytes *in vitro*. *In vivo*, a single intravenous injection at either 1 or 0.1 mg/kg was sufficient to deplete LAG-3⁺ activated T cells in lymph nodes and to prevent the T helper type 1 (Th1)-driven skin inflammation in a tuberculin-induced DTH model in baboons. T lymphocyte and macrophage infiltration into the skin was also reduced. The *in vivo* effect was long-lasting, as several weeks to months were required after injection to restore a positive reaction after antigen challenge. Our data confirm that LAG-3 is a promising therapeutic target for depleting antibodies that might lead to higher therapeutic indexes compared to traditional immunosuppressive agents in autoimmune diseases and transplantation.

Keywords: delayed-type hypersensitivity, LAG-3, primate, therapeutic antibodies

Introduction

Selectively inhibiting or deleting activated T lymphocytes represents a promising therapeutic approach as an alternative to current immunosuppressive treatments in autoimmunity and transplantation. One strategy might be the use of depleting antibodies that target specific antigens on activated T cells. This provides a competitive advantage of targeting only pathogenic T cells that are specific for auto- or alloantigens without modifying the protective immunity directed against third-party antigens [1]. The proof of concept for selective depletion of pathogenic T lymphocytes has been demonstrated in an engineered mouse model, whereby their T cells express a viral thymidine kinase suicide gene that metabolizes the non-toxic prodrug ganciclovir into a metabolite that is toxic only to dividing cells. The result was

a significant delay in the rejection of skin and heart grafts and the induction of an immune tolerance in a fraction of the recipient mice [2]. However, the therapeutic translation of this strategy requires the targeting of an antigen that is highly specific for activated T cells. So far, few molecules that are expressed selectively by activated T cells have been identified. Among these are CD25, CD152, CD154 and CD223 (lymphocyte-activation gene-3; LAG-3[3]). LAG-3 is an important regulator of T cell homeostasis [4] that is related evolutionarily to CD4 and, like CD4, is associated with the T cell receptor. It has retained an affinity 2 logs higher than CD4 for their common ligand, major histocompatibility complex (MHC) class II. LAG-3 is a transmembrane protein that forms dimers at the surface of both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [3,5] residing in inflamed secondary lymphoid organs or tissues (i.e. human tumours or

N. Poirier *et al.*

rejected allograft), but not in spleen, thymus or blood. During inflammation LAG-3 and MHC class II are up-regulated strongly [6] and play an important role in antigen-presenting cell (APC) and dendritic cell (DC) activation [7,8]. In addition, LAG-3 is a negative regulator of T cell receptor (TCR)-mediated signal transduction in effector T cells and functions in the same manner as cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) [9–12]. Finally, LAG-3 controls activated regulatory T cells (T_{reg}), while it is not expressed by unstimulated natural T_{reg} [13]. However, LAG-3 is expressed by interleukin (IL)-10-secreting early growth response (Egr)-2⁺LAG-3⁺CD4⁺ T_{reg} , associated with Peyer's patches [14].

We have shown previously that depleting anti-LAG-3 antibodies prevented the development of alloreactive effector T cells in a heart allotransplant model in rodents and represents an effective treatment for allograft rejection [15]. In this study, we have characterized a cytotoxic anti-LAG-3 chimeric antibody (chimeric A9H12) and evaluated its potential for selective therapeutic depletion in a non-human primate model of delayed-type hypersensitivity (DTH), a low-invasive and non-terminal model based on the induction of local T helper type 1 (Th-1)-mediated cellular immune responses [16]. Our investigation demonstrated that LAG-3⁺ T lymphocytes could be depleted *in vivo* in primates and that this resulted in a long-lasting inhibition of immune responses in this preclinical model.

Materials and methods

Production of the chimeric A9H12 monoclonal antibody (mAb)

C57/B6 mice were immunized three times with Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with human LAG-3 cDNA, followed by an intravenous (i.v.) booster injection of a recombinant hLAG-3lg protein purified from the supernatant of transfected CHO cells. Three days after the boost, splenocytes were fused with the X63.AG8653 fusion partner [17] to obtain hybridoma cells, using traditional techniques. The A9H12 hybridoma was selected for its antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) activity towards LAG-3 expressing cells and subcloned to yield a stable cell line.

A bicistronic vector coding for the variable heavy (VH) and variable light (VL) domains of A9H12 fused to human CL kappa and CH1-hinge-CH2-CH3 immunoglobulin (Ig)G1 regions was generated and used to transfect CHO-S cells (Invitrogen, Illkirch, France). After antibiotic selection and limiting dilutions, a stable subclone was selected to produce the chimeric A9H12 in ProCHO5 medium (Lonza, Vervier, Belgium). The product in the supernatant cell was purified by adsorption on a HiTrap recombinant Protein A FF column (GE Healthcare, Velizy, France), eluted by acid pH (Glycin HCl, 0.1 M, pH 2.8) and dialysed against phosphate-buffered saline (PBS; Invitrogen).

Flow cytometry

LAG-3⁺ CHO cells or human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with 1 µg/ml of *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB; Sigma Aldrich, L'Isle D'Abeau Chesnes, France) for 48 h were used as targets. Chimeric A9H12 binding was revealed with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat F(ab'), anti-human IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). The cross-reactivity of chimeric A9H12 against monkey T lymphocyte was assessed using baboon PBMCs isolated from whole blood by Ficoll-Paque density centrifugation (Eurobio, Les Ulis, France), followed by red blood cell lysis. Freshly isolated PBMC were incubated for 48 h at 37°C, 5% CO₂, with 10 µg/ml of concanavalin A (Sigma) in complete medium (RPMI-1640, 10% heat-inactivated baboon serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 5 mM HEPES; Sigma). PBMC were washed and stained with 10 µg/ml of anti-LAG-3 antibody (30 min at 4°C) followed by FITC-labelled goat anti-human IgG (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Cells were washed and analysed using an LSR II TM flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) with DIVA software. LAG-3⁺ T lymphocytes from inguinal lymph node biopsies were monitored by fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis using a FITC-conjugated anti-LAG-3 antibody (clone 11E3) which does not compete with the A9H12 mAb.

Affinity assessment

The affinity of chimeric A9H12 was evaluated on a BIAcore 2000 using a sensor chip coated with 500 resonance units of hLAG-3lg recombinant protein. Antibody solutions [5, 25 and 100 mM prepared in HEPES buffered saline (HBS)] were injected over a period of 3 min followed by a dissociation period of 5 min at 37°C.

ADCC

The potency of the chimeric A9H12 to induce ADCC was investigated on healthy PBMCs from cytomegalovirus (CMV)-positive donors. PBMCs were isolated from blood collected in lithium heparin tubes (BD Vacutainer®) by centrifugation over Ficoll-Paque (GE Healthcare) and cryopreserved. PBMCs were thawed and cultured at 1×10^6 /ml in the presence of a CMV peptide pool (mix of 138 15-mers with 11 amino acid overlaps spanning the entire sequence of the pp65 protein; BD Biosciences) in RPMI-1640, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/ml penicillin/50 µg/ml of streptomycin, 1× modified Eagle's medium (MEM) non-essential amino acids; 10 mM HEPES (all from Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone, Brebières, France). The CMV

Anti-LAG-3 antibodies to deplete T cells

peptides induced the expression of LAG-3 on CD8⁺ T cells, and to a lesser extent on CD4⁺ T cells, as well as inducing proliferation. After 5 days, 0.175×10^6 /well of CMV-stimulated PBMCs were incubated in the presence of various concentrations of chimeric A9H12 or an isotype-matched control (human IgG1; Chemicon, Lyon, France) in U-bottomed 96-well plates over 4 h at 37°C to assess ADCC. The cells were then stained with CD3-phycoerythrin (PE), CD4-PE-Cy7, CD8-APC-Cy7, CD25-APC (BD Biosciences) and FITC-conjugated anti-LAG-3 mAb (17B4 antibody, 1 µg/point) for 30 min at 4°C. After centrifugation, the cells were incubated for 15 min at room temperature with 7-amino-actinomycin D (7-AAD; BD Biosciences) and analysed by flow cytometry. After exclusion of dead cells based on size/granularity and 7-AAD staining, the percentage of LAG-3⁺ and CD25⁺ cells in the CD3⁺CD4⁺ and the CD3⁺CD8⁺ cell subpopulations were evaluated.

Animals

Baboons (*Papio anubis*, from the CNRS Primatology Center, Rousset, France) were negative for all quarantine tests, including a tuberculin skin test. Animals were housed at the large animal facility of our laboratory following the recommendations of the Institutional Ethical Guidelines of the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, France. All experiments were performed under general anaesthesia with Zoletil (Virbac, Carron, France). Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies were performed during DTH experiments on five baboons receiving an i.v. bolus of either 1 mg/kg or 0.1 mg/kg of chimeric A9H12.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Chimeric A9H12 was quantified in baboon sera using a specific sandwich ELISA. LAG-3-Ig (Immutep, Orsay, France) was immobilized on plastic at pH 9.5 overnight at a concentration of 5 µg/ml. After saturation with 5% gelatin at 37°C for 2 h, serum diluted in PBS-0.05% Tween 20 were incubated for 4 h at room temperature, washed and revealed with a mouse anti-human IgG kappa chain antibody (EFS, Nantes, France) at a 1:2000 dilution, followed by peroxidase-labelled goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PA, USA) at a 1:5000 dilution. Optical density was recorded at 450 nm after a tetramethylbenzidine (TMB) revelation period of 10 min at room temperature in the dark and addition of 25 µl 1 N sulphuric acid/well.

BCG vaccination and DTH assay

Baboons were immunized intradermally (i.d.) twice with a bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine (0.1 ml; 2–8 × 10⁷ UFS; Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France) in the upper region of the leg, 4 and 2 weeks before the DTH skin test. To investigate antigen-specific T cell immunity before DTH skin

testing, successful immunization was confirmed by interferon (IFN)-γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay (non-human primate IFN-γ ELISPOT kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) on freshly isolated PBMC, according to the manufacturer's instructions.

Intradermal reactions (IDR) were performed with duplicate intradermal injections of two doses (2000 UI or 40 UI) of tuberculin-purified protein derivative (PPD; Symbiotics Corporation, San Diego, CA, USA) in 0.1 ml in the skin on the right back of the animals. Saline (0.1 ml) was used as a negative control. Dermal responses at the injection sites were measured using a caliper square. The diameter of each indurated erythema was measured by two observers from days 3–8, and were considered positive when > 4 mm in diameter. The mean of the reading was recorded. Skin biopsies from the DTH or control (saline) site were performed at day 4 on one duplicate and placed in Tissue Tek optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France) for immunohistochemical analysis. A second IDR was performed after a 3-week washout period and animals received one i.v. injection of either 1 mg/kg or 0.1 mg/kg of chimeric A9H12 1 day before this second challenge with PPD. A third IDR was performed after a further 3–6-week washout period and animals were left untreated. In some cases, a fourth IDR was performed after another 3-month washout period and animals were also left untreated.

Immunohistochemical staining

Frozen sections (10 µm) were prepared from surgical skin biopsies embedded in Tissue-Tek OCT compound and maintained at -80°C. Sections were air-dried at room temperature for 1 h before acetone fixation for 10 min at room temperature. Sections were incubated with PBS containing 10% baboon serum, 2% normal goat serum and 4% bovine serum albumin (BSA). Sections were incubated overnight with primary antibodies at 4°C and washed with PBS (and serum), followed by 90 min incubation with secondary antibodies. T cell infiltration analysis was performed with a rabbit anti-human CD3 (Dako, Glostrup, Denmark), followed by a FITC-labelled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch). CD4⁺ cells were analysed with a mouse anti-human CD4 (clone 13B8-2; Beckman Coulter) followed by an Alexa568-labelled goat anti-mouse IgG (H + L) antibody (Invitrogen). CD8⁺ cells were analysed with a PE-labelled mouse anti-human CD8 (clone B9-11; Beckman Coulter). Macrophage infiltration was detected using a mouse anti-human CD68 (clone PGM1; Beckman Coulter), followed by an Alexa 568-labelled goat anti-mouse IgG (Invitrogen). LAG-3⁺ cells were labelled with a mouse anti-human Lag3 (clone 11E3; Immutep) plus Alexa568-labelled goat anti-mouse IgG (H + L) antibody (Invitrogen). All slides were analysed using fluorescent microscopy and Axio-Vision imaging software (Carl Zeiss, Le Pecq, France). A

N. Poirier et al.

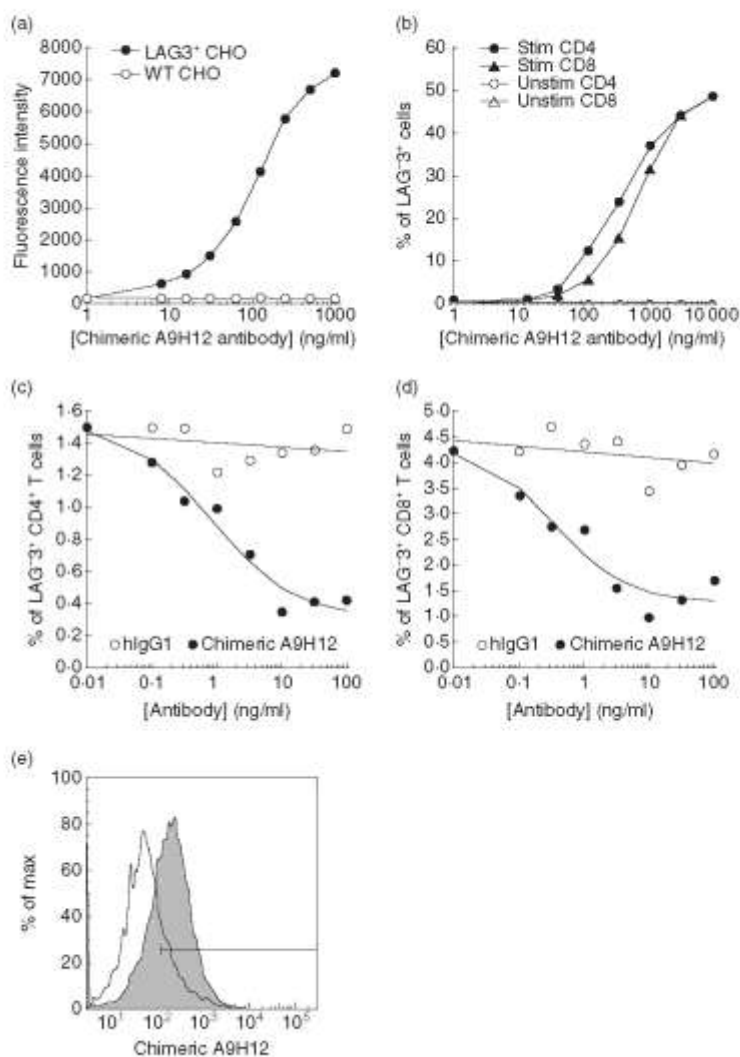


Fig. 1. *In vitro* characterization of the chimeric A9H12 monoclonal antibody (mAb). Binding of chimeric A9H12 mAb at indicated concentrations to control or lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3) Chinese hamster ovary (CHO) cells (a) and to *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB)-stimulated (Stim) or resting (Unstim) peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (b). A fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human immunoglobulin (Ig)G was used to reveal the chimeric A9H12 mAb bound to the cells. The results in (a) represent the median of fluorescence intensity as a function of antibody concentrations. The graph in (b) presents the percentage of LAG-3⁺ cells in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations. (c,d) An antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) assay was performed with PBMCs from a cytomegalovirus (CMV)-positive human donor stimulated with a CMV peptide pool for 5 days. Various concentrations of chimeric A9H12 mAb or human IgG1 were added for 4 h and the viability of activated CD4⁺ or CD8⁺ T cells was assessed by flow cytometry. Data shown are from one representative experiment of five. (e) Cross-reactivity of chimeric A9H12 with the baboon was assessed by flow cytometry. Target cells were concanavalin A-activated (shaded profiles) or resting (empty profiles) baboon PBMC.

grading system from 0 to 3 was used, representing no infiltration, moderate (< 10% of the surface), medium (> 10% and < 30% of the surface) and severe (> 30% of the surface) infiltration of the observed region, evaluated on 10 microscope fields chosen randomly on the preparation.

Results

In vitro characterization of the anti-LAG-3 chimeric A9H12 mAb

The murine A9H12 mAb was selected because of its high binding affinity to LAG-3 and its potency at inducing complement-dependent cytotoxicity (CDC) and ADCC on LAG-3⁺ cells (not shown). A chimeric form of A9H12 was generated in CHO cells by fusing the VH and VL chain

regions of murine A9H12 to the constant regions of human IgG1. The ability of the resulting antibody to bind LAG-3 efficiently was tested on cells expressing an ectopic or a natural LAG-3 ligand (Fig. 1a,b, respectively). The analysis of real-time interaction performed using BIAcore surface plasmon resonance on a sensor chip coated with recombinant hLAG-Ig revealed good affinity of the antibody to its antigen (kD 5×10^{-10} M, K_{on} 2×10^5 M/s, K_{off} 1×10^{-3} s). The *in vitro* potency of the chimeric A9H12 mAb to induce cell-mediated cytotoxicity was studied using LAG-3⁺ primary T cells. To induce physiologically the expression of LAG-3 on T cells, PBMCs were stimulated with a CMV peptide pool. Stimulation induced the expression of the activation marker CD25 and LAG-3 on about $4.18 \pm 0.13\%$ of CD8⁺ T cells and $1.40 \pm 0.04\%$ of CD4⁺ T cells. The presence of the chimeric A9H12 mAb for 4 h dramatically reduced the

percentage of living activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells showing the killing of LAG-3⁺ cells induced by the antibody (Fig. 1c,d, respectively). A 70% reduction in the number of LAG-3⁺ cells was observed both in the CD4 and the CD8 subsets at a 10 ng/ml antibody concentration. The half-maximum effective concentration was found at the ng/ml level [1 ± 0.4 ng/ml for CD4⁺ T cells and 0.7 ± 0.4 ng/ml for CD8⁺ T cells, mean \pm standard deviation (s.d.) of five experiments]. The observed effect is not due to competition between the chimeric A9H12 mAb and the 17B4-FITC mAb used to reveal LAG-3, as the binding of 17B4-FITC is not inhibited by a threefold excess of the chimeric A9H12 mAb (not shown). A putative internalization of the membrane LAG-3 induced by the chimeric A9H12 was excluded because the disappearance of activated T cells was also observed with an anti-CD25 antibody (not shown). CDC and ADCC are probably the dominant mode of action of this antibody, as no agonist or antagonist effect could be evidenced in mixed lymphocyte reactions (data not shown). The chimeric A9H12 mAb cross-reacted with baboon LAG-3 because it bound to similar percentages of activated PBMC to that found for human cells, and did not bind to resting baboon PBMC (Fig. 1e).

Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of chimeric A9H12

According to a two-compartment model, after an intravenous bolus administration of 1 mg/kg of chimeric A9H12 ($n = 2$), the elimination half-life was 86.1 ± 31.3 h

(Fig. 2a). Three other animals received 0.1 mg/kg of chimeric A9H12. In that case, the elimination half-life was calculated as 23.8 ± 6.8 h (Fig. 2a). In order to evaluate whether chimeric A9H12 can deplete LAG-3⁺ target cells *in vivo*, inguinal lymph nodes were biopsied before, and on days 1 and 4 after treatment. The percentage of LAG-3⁺ cells was then evaluated by flow cytometry. We observed a reduction of both CD4⁺ and CD4⁺LAG3⁺CD3⁺ T lymphocytes after chimeric A9H12 administration (Fig. 2b). CD4⁺CD3⁺ T lymphocytes represent mainly CD8⁺ T cells, but can also contain a few NK T cells. This was not due to immunological masking, as the detecting fluorescent anti-LAG-3 antibody used did not compete with chimeric A9H12. As expected, administration of chimeric A9H12 induced no modification of lymphocyte count in the peripheral blood.

Chimeric A9H12 controls IDR to tuberculin

To test the efficacy of chimeric A9H12 *in vivo*, we established a DTH model in baboons after sensitization with BCG vaccine. That sensitized animals were indeed immunized was controlled after 1 month with an IFN- γ ELISPOT assay on PBMC. Of eight baboons vaccinated with BCG, all but one became immunized. Unsensitized animals presented a frequency of $1/61\ 845 \pm 1/13\ 329$ PBMC responding *in vitro* to tuberculin-PPD, and this rose to a frequency of $1/7\ 842 \pm 1/1578$ in sensitized animals. Two immunized baboons used as controls were challenged with tuberculin IDR three consecutive times over 5 months and demonstrated consistent

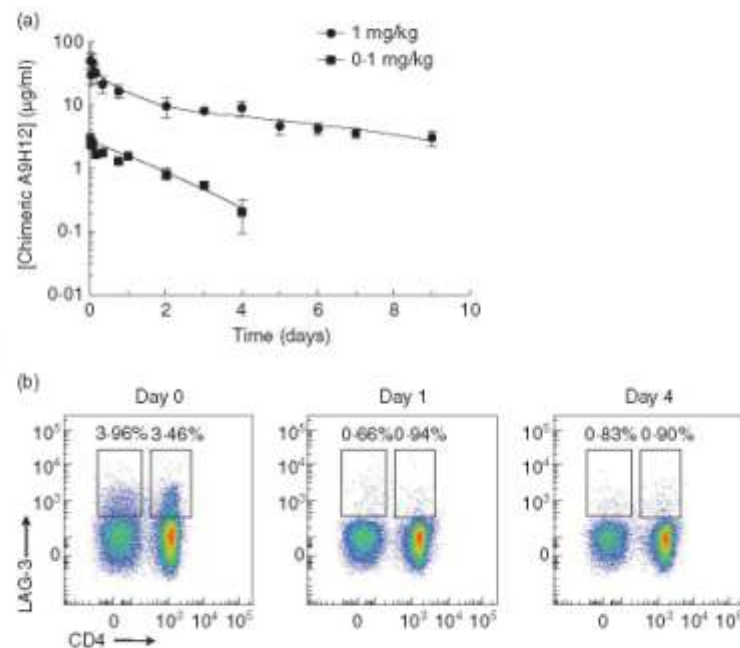


Fig. 2. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of chimeric A9H12. Blood samples were drawn at the indicated time-points from baboons treated intravenously (i.v.) with 1 or 0.1 mg/kg of chimeric A9H12 (a). Serum trough levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. (b) Representative fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes expressing lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3) after gating on CD3⁺ cells in lymph nodes at days 0, 1 and 4 after a 0.1 mg/kg i.v. injection of chimeric A9H12.

N. Poirier *et al.***Table 1.** Summary of intradermal reactions (IDR) responses after 40 UI tuberculin-purified protein derivative (PPD) intradermal injections.

| Animal | ch A9H12 dose | IDR no. 1 | IDR no. 2 + ch A9H12 or vehicle | IDR no. 3 | IDR no. 4 |
|-----------|---------------|-----------|---------------------------------|-----------|-----------|
| Control 1 | 0 mg/kg | + | + | + | + |
| Control 2 | 0 mg/kg | + | + | + | + |
| V888F | 1 mg/kg | + | - | n.d. | n.d. |
| VX20 | 1 mg/kg | + | - | + | n.d. |
| PA997C | 0.1 mg/kg | + | - | - | + |
| V936BB | 0.1 mg/kg | + | - | - | + |
| V987B | 0.1 mg/kg | + | - | - | n.d. |

Ch A9H12, chimeric A9H12; n.d., not determined.

and reproducible erythema after each IDR (Table 1). Two test animals challenged with an initial IDR showed a measurable erythema (minimal size of 4 mm) from days 3–6 or 8 after injection of 2000 or 40 UI PPD. After a 3-week washout period, the same animals were treated with 1 mg/kg chimeric A9H12 and were challenged the next day with a second IDR. They showed no cutaneous erythema with the 40 UI PPD dose and a milder reaction (diameter of the erythema and reaction time) with the 2000 UI PPD dose (Fig. 3a,b). One of these animals was challenged again for a third IDR 6 weeks later (a period of time sufficient to completely eliminate chimeric A9H12 from the blood representing up to 10 half-lives; data not shown) and showed a restored DTH reaction with an erythema similar to the first IDR (Fig. 3b).

In a second round of experiments, three other immunized animals were treated with 0.1 mg/kg on day 1 of the second IDR and showed a more pronounced inhibition of DTH reaction, as two of these animals did not develop any cutaneous erythema even with the 2000 UI PPD injection dose (Fig. 3d,e). The third animal developed no erythema with

the 40 UI PPD injection and a decreased erythema (diameter and reaction time) with the 2000 UI PPD injection dose (Fig. 3c). The inhibitory action of chimeric A9H12 injected at 0.1 mg/kg was long-lasting, because subsequent IDRs performed 3–6 weeks after injection were similar to the second IDR performed during treatment. A 3-month washout period was actually necessary to recover a positive reaction in two of these animals (Fig. 3d,e).

Skin biopsies were performed on day 3 after 40 UI PPD challenges on one duplicate IDR and processed for analysis by immunofluorescence. In accordance with the clinical DTH observations, these data revealed a reduction in T cell and macrophage infiltration after administration of chimeric A9H12 at 1 and 0.1 mg/kg (Table 2 and Fig. 4), an effect that persisted partially at the third IDR (in the absence of further administration of chimeric A9H12). Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were found reduced in the infiltrates after treatment. In agreement with our observations in lymph nodes (Fig. 2b), LAG-3⁺ cells in skin biopsies represented a minority of infiltrating T cells which, none the less, was also reduced after administration of chimeric A9H12.

Table 2. Quantification of skin biopsies infiltration by CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3⁺) and CD68⁺ cells after 40 UI tuberculin-purified protein derivative (PPD) intradermal injections.

| Animal no. | IDR no. and treatment | CD3 | CD4 | CD8 | LAG-3 | CD68 |
|------------|------------------------|-----|-----|-----|-------|------|
| V888F | 1, control | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 |
| | 2, 1 mg/kg Chi A9H12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| VX20 | 1, control | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 |
| | 2, 1 mg/kg Chi A9H12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| | 3, control | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| V987B | 1, control | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 |
| | 2, 0.1 mg/kg Chi A9H12 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 3, control | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| V936BB | 1, control | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 |
| | 2, 0.1 mg/kg Chi A9H12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| | 3, control | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 |
| | 4, control | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| PA997C | 1, control | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 |
| | 2, 0.1 mg/kg Chi A9H12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| | 3, control | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 |
| | 4, control | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |

0: infiltration not detectable; 1: moderate infiltration (< 10% of the surface); 2: medium infiltration (> 10% and < 30% of the surface); 3: severe infiltration (> 30% of the surface). IDR, intradermal reaction.

Anti-LAG-3 antibodies to deplete T cells

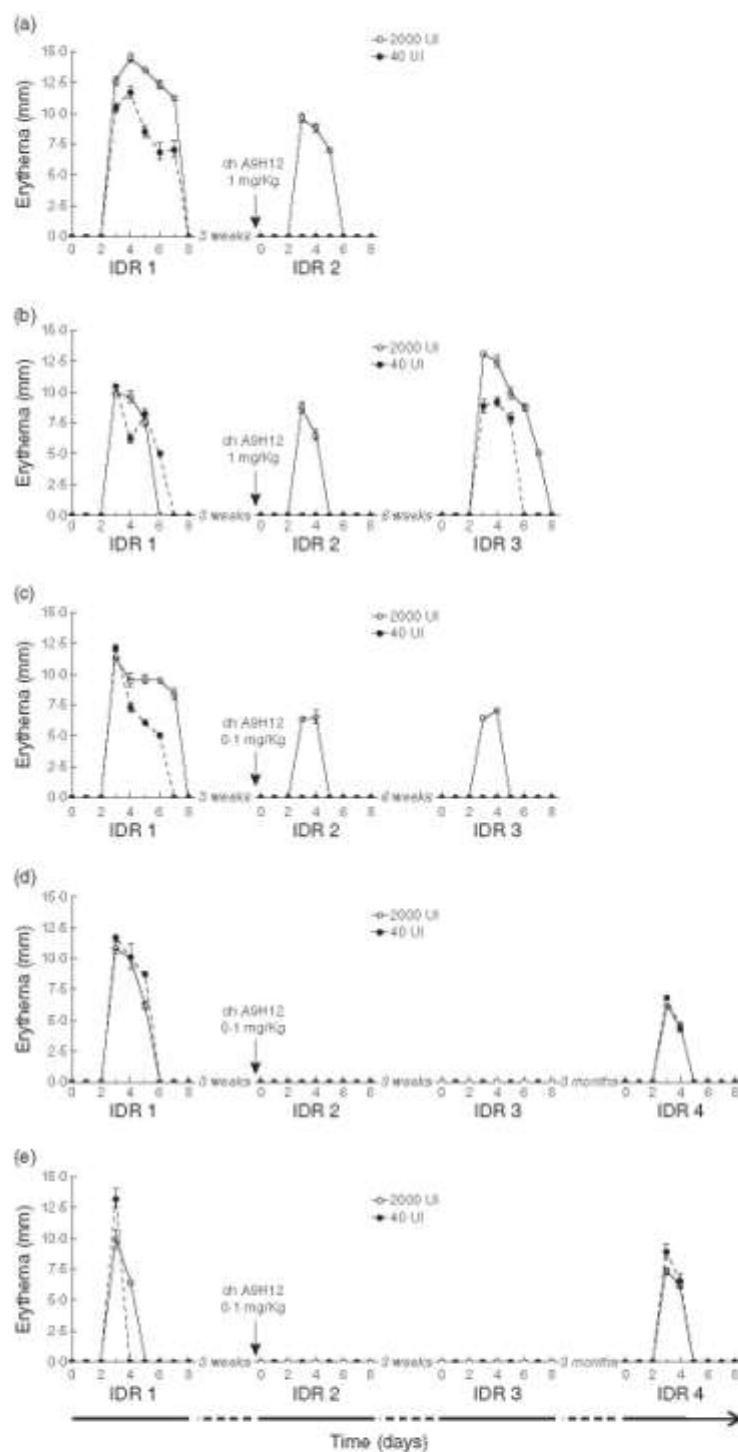


Fig. 5. Delayed-type hypersensitivity (DTH) responses of animals treated with chimeric A9H12. Cutaneous erythema diameter measured at the injection site after 40 UI or 2000 UI tuberculin-purified protein derivative (PPD) intradermal injections, repeated two to four times over a maximum of 18 weeks. (a,b) Two individual animals treated with 1 mg/kg chimeric A9H12. (c-e) Three individual animals treated with 0.1 mg/kg chimeric A9H12. Data are mean \pm standard deviation of the diameter of each erythema measured over 8 days following the antigenic challenge, performed in duplicate and by two observers.

N. Poirier et al.

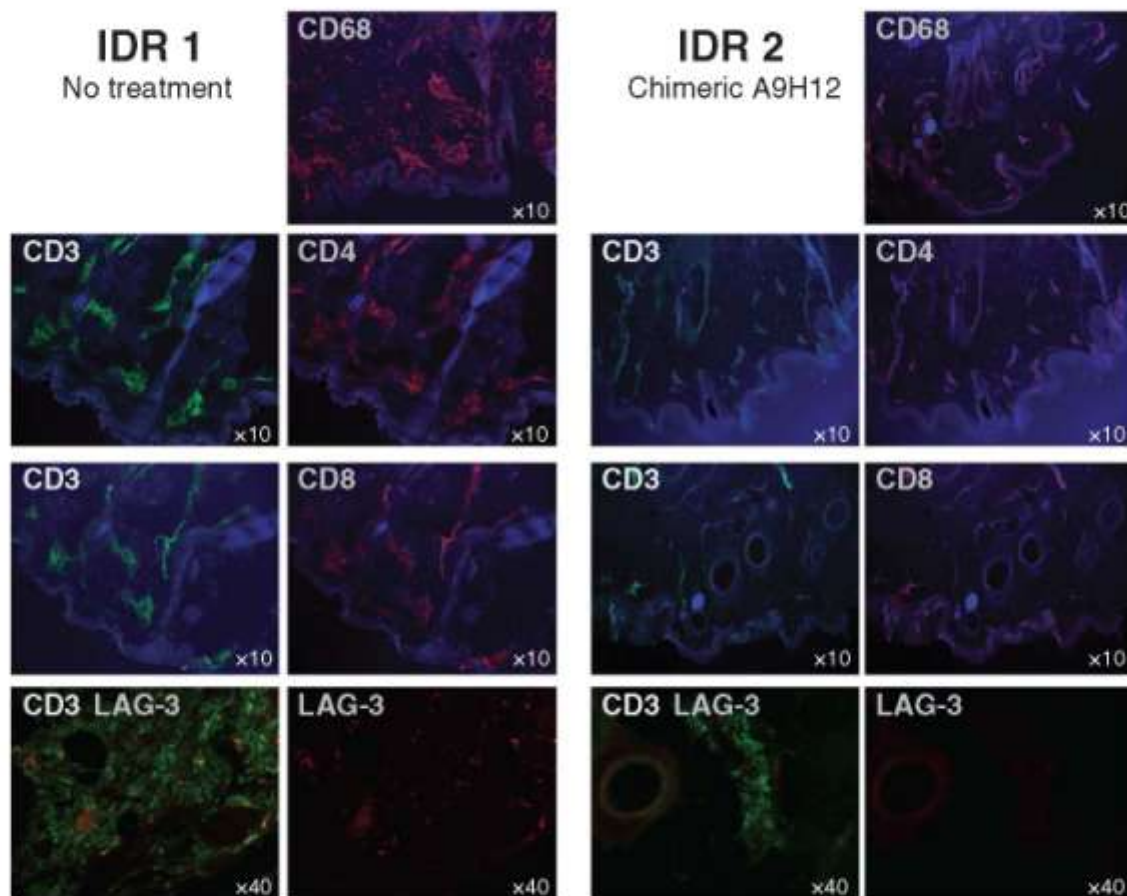


Fig. 4. T lymphocyte and macrophage skin infiltration. Skin infiltration by CD3⁺ (green staining) and CD4⁺, CD8⁺, LAG-3⁺ and CD68⁺ cells (red staining) of a representative animal at the site of injection of 40 UI of purified protein derivative (PPD) during the first untreated intradermal reactions (IDR; left panel) and during the second IDR treated intravenously (i.v.) with 0.1 mg/kg of chimeric A9H12 (right panel). CD3 and, respectively, CD4, CD8 and lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3) staining have been realized on consecutive slides. Autofluorescence with an ultraviolet filter (blue colour) was used to visualize tissue structure at $\times 10$ magnification. Lower pictures: CD3 and LAG-3 co-localization and LAG-3 alone (red) are shown (lower pictures). Magnification ($\times 10^2$) is indicated on each picture.

Discussion

In this study, we evaluated the biological effect of the depletion of LAG-3⁺ cells in a non-human primate model of delayed-type hypersensitivity. First, we demonstrated that the chimeric A9H12 anti-LAG-3 monoclonal antibody could deplete *in vitro* by ADCC and *in vivo* in lymph nodes CD4⁺ and CD8⁺ target cells expressing LAG-3⁺. *In vivo* chimeric A9H12 showed efficacy at reducing skin inflammation in a tuberculin-induced DTH model in the baboon, an effect that persisted after elimination of the antibody.

Using antibodies that specifically deplete activated T cells represents a promising therapeutic strategy to prevent and/or treat autoimmune diseases and transplant rejection. Anti-CD40L antibodies, for example, prolong allograft sur-

vival in monotherapy, and show potential to induce immune tolerance in association with other immunosuppressants [18,19]. More specifically, experiments with anti-CD40L antibodies sharing non-Fc effector function demonstrated the importance of the depleting cytotoxic activity in addition to co-stimulation inhibition [20,21]. However, the use of anti-CD40L antibodies in the clinic was compromised by thromboembolic complications due to the presence of CD40L on platelets [22]. Another example concerns anti-CD25 (IL-2R α) antibodies sharing partial depleting activity [23]. However, as CD25 is also expressed on natural T_H17 cells at very high levels this might interfere with the development of normal immune regulation by T_H17 [24]. Because LAG-3 is expressed by activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes residing in inflamed secondary lymphoid organs or tissues

(i.e. human tumours or rejected allograft [3,5,15]), is up-regulated strongly during inflammation [6] and is not expressed on unstimulated natural CD4⁺CD25⁺forkhead box P3 (FoxP3⁺) T_{reg} [13], it might represent an interesting therapeutic target with potential immunoregulatory properties. Of course, LAG-3 is expressed by activated T_{reg} [13] and potentially other T_{reg} types [14] and participates in the suppressive function of T_{reg} [15,25]. Therefore, depleting anti-LAG-3 antibodies might also oppose the development of immune regulation.

The data presented here indicate that the depletion of LAG-3⁺ cells has an inhibitory action on T helper type 1 (Th1)-mediated immune responses into the skin after antigen challenge. The most straightforward explanation supporting our observations is the physical elimination of a significant part of presumably antigen-specific activated T cells into the draining lymph nodes that therefore have reduced capacities to migrate back into the skin and to induce inflammation. However, it has been demonstrated that skin-activated T_{reg} cells, presumably expressing LAG-3, migrate to the lymph nodes during cutaneous immune responses where they inhibit immune responses [26]. Therefore, we could speculate that eliminating LAG-3-positive cells during an intradermal reaction has two opposite actions: on one hand, it could indeed eliminate effector T cells and block inflammation, and on the other hand it could prevent T_{reg} cells from inhibiting immune responses in the draining lymph node. The net result would still be a reduction of the inflammation, due to the absence of effector cells. We found that administration of chimeric A9H12 at doses of 1 or 0.1 mg/kg both inhibited erythema after skin challenge. However, only the low dose induced a situation where animals were hyporesponsive or non-responsive to subsequent skin challenges, several weeks or months after treatment, when chimeric A9H12 antibody has been eliminated. The recovery of a normal response 6 weeks after initial treatment with 1 mg/kg chimeric A9H12 indicated that antigen-specific T cells had not all been depleted. Thus, it is conceivable that the low dose also did not completely eliminate antigen-specific T cells. However, low doses were as efficient and induced prolonged suppression. It is possible that this prolonged suppression was due to T_{reg} cells, which might be eliminated with high doses of chimeric A9H12 but not, or to a lesser extent, with low doses. That anti-LAG-3 antibodies can eliminate T_{reg} cells was demonstrated previously in a transplantation model, where very high doses could prevent tolerance induction and even break an established tolerance [15].

The DTH response has been well characterized in immunized animals, including rhesus monkeys [27,28], and humans as an antigen-specific reaction resulting in erythema and induration (within 24–72 h) at the site of injection. It is characterized as a type IV hypersensitivity reaction involving cell-mediated immunity initiated by CD4 and CD8 T cells. The exposure to *Mycobacterium tuberculosis* that we used

here drives a cytokine-induced differentiation of naive CD4 Th cells to Th1 [29], and therefore can be considered as a surrogate *in vivo* assay for psoriasis inflammation.

In conclusion, we demonstrated that selectively targeting activated T cells with a LAG-3 cytotoxic antibody prevents T cell-driven skin inflammation in a preclinical DTH model in non-human primates. Our data suggest that depleting pathogen-specific activated LAG-3⁺ T cells might represent a promising new therapeutic approach in diseases where self-antigens (or alloantigens in the case of transplantation) and activated T cells (e.g. multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, different forms of thyroiditis, diabetes type 1) are involved.

Acknowledgements

This work was supported in part by the 'Progreffe' foundation, by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche no. ANR-06-RIB-010-01 and by a research grant from Immutep SA. The authors thank R. Bredoux for assistance in project management and C. Mary and A. Carriot for advice in pharmacokinetic evaluation.

Disclosure

T. H., E. T. and B. V. are inventors of the WO2008132601(A1) patent application on anti-LAG-3 antibodies.

References

- 1 Salvaia EM, Salata RA. Infectious complications associated with monoclonal antibodies and related small molecules. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**:274–90.
- 2 Thomas-Vaslin V, Bellier B, Cohen JL *et al*. Prolonged allograft survival through conditional and specific ablation of alloreactive T cells expressing a suicide gene. *Transplantation* 2000; **69**:2154–61.
- 3 Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E *et al*. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 1990; **171**:1393–405.
- 4 Triebel F. LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination. *Trends Immunol* 2003; **24**:619–22.
- 5 Huard B, Mastrangeli R, Prigent P *et al*. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:5744–9.
- 6 Avicé MN, Sarfati M, Triebel F, Delespesse G, Demeure CE. Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 1999; **162**:2748–53.
- 7 Andrea S, Piras F, Bardin N, Triebel F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol* 2002; **168**:3874–80.
- 8 Workman CJ, Wang Y, El Kasmí KC *et al*. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol* 2009; **182**:1885–91.
- 9 Huard B, Gaulard P, Faure F, Hercend T, Triebel F. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immunogenetics* 1994; **39**:213–17.

N. Poirier *et al.*

- 10 Hanner S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F. CD3/TCR complex-associated LAG-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol* 1998; **161**:4058–65.
- 11 Workman CJ, Vignali DA. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. *Eur J Immunol* 2003; **33**:970–9.
- 12 Macon-Lemaître L, Triebel F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology* 2005; **115**:170–8.
- 13 Huang CT, Workman CJ, Flies D *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; **21**:503–13.
- 14 Okamura T, Fujio K, Shibuya M *et al.* CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**:13974–9.
- 15 Haudebourg T, Dugast AS, Coulon F *et al.* Depletion of LAG-3 positive cells in cardiac allograft reveals their role in rejection and tolerance. *Transplantation* 2007; **84**:1500–6.
- 16 Black CA. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol Online J* 1999; **5**:7.
- 17 Coll JM. Injection of physiological saline facilitates recovery of ascitic fluids for monoclonal antibody production. *J Immunol Methods* 1987; **104**:219–22.
- 18 Kirk A, Harlan D, Armstrong N *et al.* CTLA4Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:8789–94.
- 19 Guillonnet C, Seveno C, Dugast AS *et al.* Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40lg-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 2007; **179**:8164–71.
- 20 Monk NJ, Hargreaves RE, Marsh JE *et al.* Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat Med* 2003; **9**:1275–80.
- 21 Ferrant JL, Benjamin CD, Cutler AH *et al.* The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge. *Int Immunol* 2004; **16**:1583–94.
- 22 Mirabet M, Barrabes JA, Quiroga A, Garcia-Dorado D. Platelet pro-aggregatory effects of CD40L monoclonal antibody. *Mol Immunol* 2008; **45**:937–44.
- 23 Strom TB, Kelley VR, Woodworth TG, Murphy JR. Interleukin-2 receptor-directed immunosuppressive therapies: antibody- or cytokine-based targeting molecules. *Immunol Rev* 1992; **129**:131–63.
- 24 Benghiet FS, Graca L, Braun MY *et al.* Critical influence of natural regulatory CD25⁺ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression. *Transplantation* 2005; **79**:648–54.
- 25 Camisaschi C, Casati C, Rini F *et al.* LAG-3 expression defines a subset of CD4⁺CD25^(high)Foxp3⁺ regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol* 2010; **184**:6545–51.
- 26 Tomura M, Honda T, Tanizaki H *et al.* Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* 2010; **120**:883–93.
- 27 Maddison SE, Hicklin MD, Conway BP, Kagan IG. Transfer factor: delayed hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* and tuberculin in *Macaca mulatta*. *Science* 1972; **178**:757–9.
- 28 Cordoba F, Wiczorek G, Preussing E, Bigaud M. Modeling of delayed type hypersensitivity (DTH) in the non-human primate (NHP). *Drug Discov Today* 2008; **5**:63–71.
- 29 Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech* 2001; **53**:241–5.

IV- Publications & Communications

Publications :

- **Dilek N**, et al. « Selective CD28 antagonist stabilizes Treg-APC immune synapse by CTLA-4 dependent mechanisms. » (*article en préparation*)
- **Dilek N**, et al. « Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5. » (*article en révision*)
- Poirier N, Haudebourg T, Brignone C, **Dilek N**, et al. « Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3(+))-activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates. » *Clin Exp Immunol.* 2011 May;164(2):265-74.
- **Dilek N**, et al. « Myeloid-derived suppressor cells in transplantation. » *Curr Opin Organ Transplant.* 2010, 15:000-000.
- Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, **Dilek N**, et al. « Inducing CTLA-4-dependent Immune Regulation by Selective CD28 blockade Promotes Regulatory T cells in Organ Transplantation. » *Sci. Transl. Med.* 2010, Feb 3; 2:17ra10.

Communications orales :

- **Dilek N**, et al. *FOCIS Centers of Excellence Trainee Satellite Symposium* « Opposite effect of selective CD28-blockade on effector and regulatory T cell contacts with antigen-presenting cells. » Washington (US), June 2011.
- **Dilek N**, et al. *XII TTS Basic Science Symposium (BSS)* « Selective CD28 antagonist stabilizes Treg-APC immune synapse by CTLA-4 dependent mechanisms. » Cape Cod (Boston, US), June 2011.
- **Dilek N**, et al. *1st International Conference on Immune Tolerance.* « Difference between CD28 blockade and B7 blockade on T cell activity controlled by CTLA-4 dependent mechanisms. » Boston (US), October 2009.
- **Dilek N**, et al. *European society of transplantation (ESOT-ETCO).* « Selective CD28 costimulation blockade synergizes with regulatory T cell activity in a CTLA-4 dependent manner. » Paris (FR), August 2009.
- Poirier N, **Dilek N**, et al. *Congress of the Federation Of Clinical Immunology Societies (FOCIS).* « CD28 antagonist monovalent antibodies induce Tregs in baboon kidney. » San-Francisco (US), June 2009.

- Poirier N, **Dilek N**, et al. *FOCIS Centers of Excellence Trainee Satellite Symposium* « CD28 antagonist monovalent antibodies and Tregs in transplantation. » San-Francisco (US), June 2009.
- Poirier N, **Dilek N**, et al. *American Transplant Congress (ATC)* « Induction of Tregs by monovalent non-agonist CD28 antibodies in baboon kidney allotransplantation. » Boston (US), May 2009.

Posters scientifiques :

- **Dilek N**, et al. *Congress of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS)* « Opposite effect of selective CD28-blockade on effector and regulatory T cell contacts with antigen-presenting cells. » Washington (US), June 2011.
- **Dilek N**, et al. *Basic Science Symposium (BSS)* « Control by CCL5 of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization. » Cape Cod (Boston, US), June 2011.
- Poirier N, **Dilek N**, et al. *Basic Science Symposium (BSS)* « Preclinical efficacy & safety of FR104: a selective CD28 antagonist. » Cape Cod (Boston, US), June 2011.
- **Dilek N**, et al. *American Transplant Congress (ATC)* « Control by CCL5 of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization. » Philadelphia (US), June 2011.
- Poirier N, **Dilek N**, et al. *FOCIS Centers of Excellence Trainee Satellite Symposium*. « CD28 antagonist monovalent antibodies induce Tregs in baboon kidney. » San-Francisco (US), June 2009.

Prix

- **Travel award** of the FOCIS (*Federation of Clinical Immunology Societes*), Washington DC (US), June 2011.

Inhibition sélective de la costimulation CD28/CD80-86 en transplantation : mécanismes d'action des cellules régulatrices.

La transplantation est actuellement un des seuls recours pour palier à une dysfonction chronique d'un organe. Cependant, elle implique obligatoirement un traitement immunosuppresseur à vie ayant d'importants effets secondaires (cancer, infection, néphrotoxicité,...). L'établissement d'une tolérance spécifique au donneur demeure donc un objectif majeur en transplantation, car elle seule permettrait de renoncer à l'immunosuppression chronique. C'est dans cette démarche, que le travail de cette thèse a porté sur le blocage sélectif de la voie de costimulation CD28/CD80-86, et non CTLA-4/CD80-86, promouvant l'induction de mécanismes régulateurs voire tolérogènes en transplantation, en bloquant la voie activatrice tout en maintenant intacte la voie inhibitrice. Ainsi, l'objectif de notre travail a été d'étudier, dans un premier temps, les mécanismes mis en place dans un modèle de tolérance dû au blocage de CD28 en allotransplantation rénale chez le rat, associé à une accumulation de cellules myéloïdes suppressives dans le sang. L'analyse du transcriptome de ces cellules nous a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de la chemokine CCL5 dans ces cellules, mais également dans le sang des animaux tolérants. Par ailleurs, la formation d'un gradient de CCL5 en faveur des greffons chez les animaux tolérants induirait le recrutement de lymphocytes T régulateurs CCR5⁺ au niveau des greffons, favorisant ainsi l'établissement d'une tolérance. Dans un second temps, cette thèse a eu pour but d'explorer les effets de FR104, un antagoniste monovalent non activateur de CD28, sur la synapse immunologique chez l'homme. Ainsi, seul le blocage sélectif de CD28 permet d'empêcher la formation de synapse immunologique stable entre le lymphocyte T effecteur et la cellule présentatrice d'antigène (CPA), alors qu'au contraire il augmente le temps de contact entre le lymphocyte T régulateur et la CPA, ces mécanismes étant dépendants de CTLA-4. Ces recherches ont contribué à apporter des éléments nouveaux quant aux rôles et mécanismes d'une nouvelle stratégie thérapeutique immunorégulatrice.

Mots clés : transplantation, costimulation, CD28, CTLA-4, cellules régulatrices, tolérance, CCL5, synapse immunologique

Selective inhibition of CD28/CD80-86 costimulation in transplantation: mechanisms of action of regulatory cells.

Transplantation is currently used for treatment of end-stage organ diseases. However, solid-organ transplantation requires a heavy treatment for the patients who are subjected to chronic immunosuppression which has several secondary effects, such as infections, cancers, nephrotoxicity. Therefore the establishment of a donor-specific tolerance remains a major goal in transplantation. Thus, this PhD work focused on the selective blockade of the CD28/CD80-86 costimulatory pathway, without impairing CTLA-4/CD80-86, thereby promoting the induction of tolerogenic or regulatory mechanisms in transplantation by blocking the activating interaction while preserving the inhibitory pathway. The first objective of our work was to study those mechanisms involved in a tolerance model in renal allotransplantation in rats, where an accumulation of myeloid suppressor in the blood was found. Transcriptome analysis of these cells allowed us to observe a decreased expression of CCL5 chemokine in these cells, but also in the blood of tolerant animals. The formation of a CCL5 graft-to-periphery gradient in tolerant animals induces the recruitment of CCR5⁺ regulatory T cells in the grafts, thus promoting tolerance establishment. In a second part, this work aimed at exploring the effects of FR104, a monovalent antagonistic CD28 antibody, on the immunological synapse in humans. Only the CD28 selective blockade prevented formation of stable immunological synapses between T effector cells and antigen-presenting cell (APC), whereas on the contrary it increased the contact time between regulatory T cells and APC, these mechanisms being CTLA-4 dependent. Thus, these researches illustrate new elements regarding the roles and mechanisms of a new specific immunoregulatory therapeutic strategy.

Key words: transplantation, costimulation, CD28, CTLA-4, regulatory cells, tolerance, CCL5, immunological synapse

DILEK Nahzli
INSERM UMR643
30, Bd Jean Monnet
44 093 NANTES Cedex 01