

Université de Nantes
Faculté de Médecine

***IDENTIFICATION ET ETUDE DE NOUVEAUX MEDIATEURS
DE LA TOLERANCE A L'ALLOGREFFE***

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale : Biologie Santé
Discipline : Médecine
Spécialité : Immunologie

*Présentée
Et soutenue publiquement par*

Paméla THEBAULT

Le 25 Septembre 2009, devant le jury ci-dessous

Président M José COHEN, Directeur de Recherche, Paris

Rapporteurs Mme Dominique KAISERLIAN, Directeur de
Recherche, Lyon
M. Joost VAN MEERWIJK, Professeur, Toulouse

Directeurs de thèse Mme Maria Cristina CUTURI, Directeur de
Recherche, Nantes
Mlle Elise CHIFFOLEAU, Chargé de Recherche,
Nantes

Unité INSERM 643 – ITERT
Dirigée par le Dr Ignacio Anegón

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Sommaire..... | 2 |
| Liste des abréviations..... | 6 |
| Liste des figures..... | 8 |
| INTRODUCTION..... | 13 |
| A. Le rejet de greffe..... | 14 |
| I. Généralités | 14 |
| II. La présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes | 16 |
| 1. Les cellules dendritiques | 16 |
| 1.1. Les cellules dendritiques et l'immunité | 17 |
| 1.2. La maturation des cellules dendritiques | 18 |
| 1.3. Le rôle des cellules dendritiques | 18 |
| 2. La présentation allogénique..... | 20 |
| 2.1. La présentation directe..... | 22 |
| 2.2. La présentation indirecte..... | 23 |
| 2.3. La présentation semi-directe | 24 |
| 3. L'activation et la différenciation T..... | 24 |
| 3.1. Le signal de costimulation..... | 24 |
| 3.2. Différenciation et mécanismes effecteurs des cellules T CD4 ⁺ | 25 |
| 3.2.1. Th1 | 26 |
| 3.2.2. Th2..... | 26 |
| 3.2.3. Th17 | 27 |
| 3.2.4. Th9..... | 28 |
| 3.3. Différenciation et mécanismes effecteurs des cellules T CD8 ⁺ | 29 |
| B. La tolérance..... | 31 |
| I. La tolérance centrale | 31 |
| 1. La sélection positive | 31 |
| 2. La sélection négative..... | 32 |
| II. La tolérance périphérique | 33 |
| 1. La délétion..... | 33 |
| 2. L'anergie | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3. L'ignorance..... | 34 |
| 4. La suppression..... | 34 |
| III. Les cellules T régulatrices | 35 |
| 1. Les cellules T régulatrices naturelles..... | 35 |
| 1.1. Les cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 35 |
| 1.2. Les cellules T CD8 ⁺ CD45RC ^{low} | 37 |
| 2. Les cellules T régulatrices induites..... | 38 |
| 2.1. Les cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ | 38 |
| 2.2. Les cellules Tr1..... | 38 |
| 2.3. Les cellules Th3..... | 38 |
| 2.4. Les cellules T CD8 ⁺ CD28 ⁻ | 39 |
| 2.5. Les cellules T CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ | 39 |
| 2.6. Les cellules NKT | 40 |
| 3. Les mécanismes de suppression..... | 40 |
| 3.1. Les cytokines suppressives | 41 |
| 3.1.1. L'IL35 | 41 |
| 3.1.2. L'IL10 | 41 |
| 3.1.3. Le TGFβ..... | 42 |
| 3.2. La suppression par contact cellulaire | 43 |
| 3.3. La cytotoxicité des Treg | 43 |
| 3.4. La modulation des cellules dendritiques..... | 44 |
| IV. Les cellules dendritiques tolérogènes | 44 |
| 1. La terminologie des cellules dendritiques tolérogènes..... | 45 |
| 2. Les mécanismes d'actions des cellules dendritiques tolérogènes..... | 45 |
| 3. L'induction d'une fonction tolérogène | 46 |
| <i>C. Futurs protocoles cliniques d'induction de tolérance en transplantation ?.....</i> | 48 |
| RESULTATS..... | 50 |
| <i>A. Modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque par traitement avec le LF15-0195.....</i> | 51 |
| I. Induction de tolérance par traitement avec le LF15-0195 | 51 |
| 1. Le modèle de greffe..... | 51 |
| 2. Le LF15-0195..... | 52 |
| 2.1. Les propriétés immunosuppressives | 52 |
| 2.2. Les mécanismes moléculaires | 53 |
| 2.2.1. Interaction avec les protéines de choc thermique | 53 |
| 2.2.2. Induction de la voie des caspases | 53 |

| | |
|---|------------------|
| 2.2.3. Inhibition de la voie NF- κ B..... | 53 |
| 3. Résultats préalablement acquis et objectifs de l'étude..... | 54 |
| II. Etude du rôle d'IDO dans la tolérance et de son lien avec les cellules Treg | |
| CD4⁺CD25⁺..... | 57 |
| 1. Article 1 | 57 |
| 2. Conclusions et Discussion..... | 70 |
| III. Caractérisation du rôle de CLEC-1 dans la tolérance | 74 |
| 1. La molécule CLEC-1 | 74 |
| 2. Article 2 | 77 |
| 3. Discussion..... | 90 |
| 4. Perspectives..... | 93 |
| 4.1. Chez le rat | 93 |
| 4.2. Chez la souris | 94 |
| 4.3. Chez l'homme..... | 95 |
| IV. Schéma récapitulatif des mécanismes régulateurs dans le modèle de tolérance induite par le LF15-0195 | 96 |
| <i>B. Modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque par l'administration de cellules dendritiques immatures syngéniques et un traitement immunosuppresseur sous-optimal avec le LF15-0195</i> | <i>98</i> |
| I. Les avantages des stratégies basées sur l'administration de cellules dendritiques autologues | 98 |
| II. Résultats préalablement acquis et objectifs de l'étude | 99 |
| 1. Génération des BMDC | 99 |
| 2. Monothérapie avec les BMDC immatures syngéniques..... | 99 |
| 3. Bithérapie avec les BMDC en combinaison avec le LF15-0195..... | 100 |
| III. Résultats obtenus..... | 101 |
| 1. Détermination de la localisation des BMDC injectées | 101 |
| 2. Etude des médiateurs tolérogènes exprimés dans la rate des animaux tolérants | 102 |
| 2.1. Analyse au niveau de l'ARNm..... | 102 |
| 2.2. Analyse au niveau de la protéine | 103 |
| 3. Etude <i>in vivo</i> du rôle de l'IFN γ dans l'induction de tolérance | 104 |
| 4. Identification des cellules exprimant l'IFN γ | 105 |
| 5. Caractérisation des cellules T Double Négative..... | 106 |
| 5.1. Etude du nombre de cellules T régulatrices DN dans la rate..... | 106 |

| | |
|---|----------------|
| 5.2. Etude de la production d'IFN γ par les cellules T DN..... | 107 |
| 5.3. Caractérisation des mécanismes entraînant la production d'IFN γ par les cellules T DN | 108 |
| 5.3.1. Identification des cellules induisant cette production d'IFN γ | 108 |
| 5.3.2. Identification des médiateurs impliqués dans l'induction d'IFN γ | 109 |
| 6. Etude du rôle des leucocytes du donneur issus du greffon | 114 |
| 7. Etude de nouveaux immunosuppresseurs en combinaison avec les BMDC | 115 |
| IV. Perspectives | 118 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 121 |
| ANNEXES..... | 124 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 142 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------|--|
| ADCC | "Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity" |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| AICD | "Activation Induced Cell Death" |
| AIRE | "AutoImmune Regulator" |
| ARNm | Acide RiboNucléique messenger |
| BMDC | "Bone Marrow derived Dendritic Cells" |
| CD | Cluster de Différenciation |
| CMH | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CPA | Cellule Présentatrice d'Antigènes |
| CTL | "Cytotoxic T Lymphocyte" |
| CTLA-4 | " Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4" |
| DC | "Dendritic Cell" |
| DCIR | "Dendritic Cell immunoReceptor" |
| DN | Double Négative |
| DSG | Déoxyspergualine |
| EAE | Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale |
| EBI3 | "Epstein-Barr virus induced gene 3" |
| Foxp3 | "Forkhead box P3" |
| GITR | "Glucocorticoid-Induced TNF-related Receptor" |
| GM-CSF | "Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor" |
| GVHD | "Graft Versus Host Disease" |
| HLA | "Human Leucocyte Antigen" |
| HO-1 | Hème Oxygénase-1 |
| HPRT | Hypoxanthine Phosphoribosyl Transférase |
| IDO | Indoléamine 2,3- Dioxygénase |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL | Interleukine |
| iNOS | "inducible Nitric Oxide Synthase" |
| ITAM | Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif |
| ITIM | Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif |
| LEW | Lewis |
| LPS | Lipopolysaccharide |

| | |
|--------|---|
| MBP | "Myelin Basic Protein" |
| MLR | "Mixed Leucocyte Reaction" |
| NK | "Natural killer" |
| NOD | "Non-Obese Diabetic" |
| PBMC | "Peripheral Blood Mononuclear Cell" |
| pDC | plasmacytoid Dendritic Cell |
| RT-PCR | "Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction" |
| TCR | "T Cell receptor" |
| TGFb | "Transforming Growth Factor-beta" |
| Th | "T helper" |
| TLR | "Toll-Like Receptor" |
| TNF | "Tumor necrosis Factor" |
| Treg | Cellule T régulatrice |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 1 : Les cellules dendritiques matures et immatures ont des fonctions différentes.</i> | 20 |
| <i>Figure 2 : Les différentes voies de présentation allogénique.</i> | 21 |
| <i>Figure 3 : Différentes voies de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.....</i> | 26 |
| <i>Figure 4 : Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans le rejet aigu.....</i> | 29 |
| <i>Figure 5 : Mécanismes de la tolérance centrale.....</i> | 31 |
| <i>Figure 6 : Les mécanismes de tolérance périphérique.....</i> | 33 |
| <i>Figure 7 : Les différents mécanismes de suppression des Treg.</i> | 41 |
| <i>Figure 8 : Les différents mécanismes pouvant conférer des propriétés tolérogènes aux cellules dendritiques.....</i> | 47 |
| <i>Figure 9. Modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque par traitement avec le LF15-0195.....</i> | 52 |
| <i>Figure 10 : Expression de l'ARNm de CLEC-1 dans les allogreffes par puces à ADN et RT-PCR quantitative.</i> | 74 |
| <i>Figure 11 : Localisation chromosomique et structure du transcrit codant pour CLEC-1</i> | 75 |
| <i>Figure 12 : Composition du complexe de gènes des cellules NK.....</i> | 76 |
| <i>Figure 13 : Structure et signalisation des récepteurs de la superfamille des "C-type lectin receptor".....</i> | 76 |
| <i>Figure 14 : Schéma de la construction de la protéine de fusion.....</i> | 93 |
| <i>Figure 15 : Etude de l'expression de la protéine de fusion dans les clones stables et transitoires par Westen blot.....</i> | 94 |
| <i>Figure 16 : Expression de l'ARNm de CLEC-1 dans des BMDC de souris transfectées avec les siRNA CLEC-1 et le siRNA contrôle.....</i> | 95 |
| <i>Figure 17 : Expression de CLEC-1 dans le sang de rats greffés.....</i> | 95 |
| <i>Figure 18 : Schéma des mécanismes impliqués dans la tolérance induite par le traitement LF15-0195.....</i> | 97 |
| <i>Figure 19 : Acceptation définitive du greffon avec l'injection de BMDC immatures syngéniques, la veille de la greffe, en association avec le LF15-0195 en dose sous-optimale.</i> | 100 |
| <i>Tableau I : Effets du transfert des splénocytes des receveurs tolérants "BMDC-LF" sur la survie d'allogreffe.</i> | 101 |
| <i>Figure 20 : Localisation, cinq jours après la greffe, des BMDC injectées marquées à la PKH26.....</i> | 102 |
| <i>Figure 21 : Profil d'expression de l'ARNm de différentes cytokines dans la rate, cinq jours après la transplantation.</i> | 103 |

| | |
|--|------------|
| <i>Figure 22 : Profil d'expression protéique de l'IFNα dans la rate d'animaux en rejet et tolérants, cinq jours après la transplantation.....</i> | <i>104</i> |
| <i>Figure 23 : Effet de l'inhibition de l'IFNα sur l'induction de la tolérance.</i> | <i>104</i> |
| <i>Figure 24 : Identification des cellules IFNα⁺ dans la rate des animaux en rejet et tolérants.</i> | <i>106</i> |
| <i>Figure 25 : Nombre absolu de cellules T DN dans la rate, cinq jours après la transplantation.</i> | <i>107</i> |
| <i>Figure 26 : Expression de l'IFNγ dans les cellules T DN lors d'une MLR.</i> | <i>108</i> |
| <i>Figure 27 : Etude de l'expression de l'IFNγ dans les DNT lors d'une réaction lymphocytaire mixte en condition syngénique.</i> | <i>109</i> |
| <i>Figure 28 : Localisation des BMDC-PKH26⁺ injectées et des cellules T DN dans la rate d'animaux tolérants.</i> | <i>109</i> |
| <i>Figure 29 : Expression de l'ARNm de cytokines membres de la famille de l'IL12 dans les BMDC stimulées in vitro par des ligands de TLR.....</i> | <i>110</i> |
| <i>Figure 30 : Expression d'EBI3 et d'IL12p35 dans la rate d'animaux tolérants.</i> | <i>111</i> |
| <i>Figure 31 : Effet de l'inhibition d'EBI3 (anticorps polyclonal) sur la production d'IFNγ par les cellules T DN.....</i> | <i>112</i> |
| <i>Figure 32 : Expression d'EBI3 dans les BMDC après transfection avec les siRNA spécifiques d'EBI3 ou le siRNA contrôle</i> | <i>113</i> |
| <i>Figure 33 : Effet de l'inhibiteur d'EBI3 (siRNA) sur la production d'IFNγ par les cellules T DN.</i> | <i>113</i> |
| <i>Figure 34 : Effet des leucocytes du greffon sur la survie de l'allogreffe cardiaque dans le modèle de tolérance induite par les BMDC et le LF15-0195.....</i> | <i>114</i> |
| <i>Figure 35 : Survie d'allogreffe cardiaque avec la rapamycine et les BMDC immatures syngéniques.....</i> | <i>115</i> |
| <i>Figure 36 : Expression de l'ARNm de l'IFNγ dans la rate d'animaux greffés.....</i> | <i>116</i> |
| <i>Figure 37 : Localisation et quantification des leucocytes du donneur chez les receveurs traités avec les BMDC et la rapamycine.....</i> | <i>116</i> |
| <i>Figure 38 : Effet de l'injection de cellules spléniques d'haplotype du donneur sur la survie d'allogreffes cardiaques de receveurs traités avec les BMDC, la rapamycine.</i> | <i>117</i> |
| <i>Figure 39 : Effet de l'administration de la rapamycine de J3 à J13 avec les BMDC, injectées la veille de la greffe, sur la survie d'allogreffe cardiaque.....</i> | <i>118</i> |

Avant propos

La transplantation d'organes ou de tissus dans le but de remplacer des organes vitaux défaillants est actuellement un traitement de choix dans de nombreuses pathologies touchant différents organes tels que les reins, le cœur, les poumons, le foie, la cornée ou la moelle osseuse. Elle est devenue aujourd'hui un moyen thérapeutique commun.

C'est au début du XXème siècle que les médecins explorent pour la première fois la technique de la transplantation. En effet, en 1902, les Dr Carel et Ullman ont tenté la première greffe d'organes chez l'animal. Ils ont rapporté avoir transplanté le rein d'un chien au niveau de son cou. Toutefois, la greffe à un autre chien est un échec et pour eux, seule l'autogreffe est possible. En 1933, le russe Serguey Voronoy qui travaille sur la transplantation animale arrive à une conclusion majeure : le rejet de greffe est un évènement immunologique. Il tente alors la première "homotransplantation" qui aboutit à la mort du receveur quatre jours après la greffe, mais un nouveau pas dans la transplantation a été accompli. Il faudra attendre l'après guerre pour voir les premières greffes rénales. En effet, c'est en 1956 à Boston que la première greffe est réussie car réalisée entre deux jumeaux vrais (Merrill et al. 1956).

Dans les années 50, Gowans, Brent, Medawar et d'autres ont établi le concept de tolérance : leurs travaux ont montré que les lymphocytes étaient à la fois les cellules qui exprimaient les antigènes et qui répondaient à ces antigènes en développant un modèle *in vitro* "d'homogreffe" (appelé aujourd'hui allogreffe) (Brent and Medawar 1967; Gowans 1977). Ainsi, l'introduction d'alloantigènes dans un organisme, sous forme d'organe ou de tissu, provoque une réaction immunologique chez le receveur suite à une reconnaissance des alloantigènes reconnus comme étrangers. Ce rejet immunologique dépend de nombreux facteurs liés à l'hôte et à l'organe greffé : les différences entre les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur et du receveur et le statut immunologique du receveur (Hollander et al. 1999). A l'heure actuelle, l'inhibition non spécifique de l'ensemble du système immunitaire par l'intermédiaire des drogues immunosuppressives comme la cyclosporine A (un inhibiteur de la calcineurine inhibant des gènes impliqués dans l'activation et la prolifération des cellules T), la rapamycine (antibiotique qui inhibe les T effecteurs et les cellules dendritiques mais préserve les cellules T régulatrices) et bien d'autres, reste la seule façon de diminuer l'incidence du rejet de greffe. Le grand succès de ces traitements sur la survie des allogreffes se heurte pourtant à de graves problèmes. Outre leur toxicité propre, les drogues provoquent des effets secondaires tels que les infections opportunistes virales, bactériennes ou fongiques et surtout des cancers viro-induits dont l'incidence est

significativement augmentée après transplantation d'organe (Dantal and Souillou 2005). Ces effets sont directement liés à l'absence de spécificité de l'immunosuppression. De plus, les patients doivent garder une administration à vie de ces drogues car un arrêt ou une diminution trop brutale pourrait conduire le système immunitaire à rejeter la greffe. Par ailleurs, même si ces traitements immunosuppresseurs ont permis de maîtriser le rejet aigu des greffons, ils ne préviennent pas le développement du rejet chronique (Libby and Pober 2001). Le rejet chronique est un processus qui intervient des mois voire des années après la transplantation. C'est un phénomène lent qui entraîne la détérioration progressive de la fonction du greffon. Les causes impliquées sont multiples et peuvent être immunologiques (l'activation des cellules T effectrices, présence d'alloanticorps) ou non immunologiques (l'ischémie-reperfusion, l'hypertension artérielle ou l'acte chirurgical). Il se manifeste par une détérioration fonctionnelle et progressive du greffon.

En 2008, l'ensemble de ces avancées dans le domaine de la transplantation a permis de réaliser plus de 4600 greffes en France. Cependant, suite à la pénurie d'organes, 13700 personnes sont encore en attente d'une greffe, c'est pourquoi le don d'organe a été déclaré grande cause sanitaire en 2008. Dès lors, chaque organe devient très précieux, sa fonctionnalité et son acceptation par le receveur doivent être maintenues le plus longtemps possible.

Dans le but de trouver une alternative aux traitements immunosuppresseurs, l'étude des mécanismes associés à la tolérance reste un axe de recherche majeur en transplantation d'organe. La tolérance immunologique se définit comme l'acceptation à long terme du greffon, sans signe de rejet chronique et surtout, en l'absence de traitement immunosuppresseur. Aujourd'hui, certains protocoles expérimentaux animaux permettent d'obtenir une tolérance spécifique du donneur. Cependant, aucune méthode d'induction d'une tolérance systématique n'est encore applicable chez l'homme. Toutefois, la possibilité d'induire une tolérance chez l'homme est réelle, comme le prouve l'existence de cas (très rares en greffe rénale et plus fréquents en greffe de foie) (Ashton-Chess et al. 2007; Alexander et al. 2008; Scandling et al. 2008) où le receveur pour différentes raisons a arrêté son traitement immunosuppresseur sans que cela provoque le rejet de l'allogreffe.

L'objectif de ma thèse a été d'identifier et d'analyser de nouveaux médiateurs associés à la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. En effet, la caractérisation de ces nouvelles molécules pourrait permettre de générer différents outils pour induire une tolérance et qui pourrait servir de marqueurs du rejet chronique ou de la tolérance. Pour cela, dans un premier temps, je vous exposerai les mécanismes de rejet d'allogreffe et

d'induction de tolérance chez l'animal. Dans un deuxième temps, je vous présenterai les résultats obtenus dans les différents modèles utilisés pour caractériser les mécanismes de tolérance. Enfin dans un troisième temps, une conclusion générale montrera l'intérêt scientifique de l'ensemble de mes travaux ainsi que les perspectives de recherches.

INTRODUCTION

A.Le rejet de greffe

I. Généralités

La transplantation d'organe, de cellule ou de tissu permet, à l'heure actuelle, de traiter de nombreuses pathologies en remplaçant l'organe vital défectueux (cœur, poumons, reins, moelle osseuse...). Suivant le contexte génétique du donneur et du receveur, le degré de la réponse immunitaire varie. Dans le cas d'une greffe syngénique, le donneur et le receveur sont génétiquement identiques, le système immunitaire du receveur ne reconnaîtra pas le greffon comme "étranger" et la greffe sera acceptée. Chez l'homme, cette situation existe sous 2 formes :

- les greffes autologues qui correspondent au transfert d'un tissu du receveur d'un point de l'organisme à un autre.
- les isogreffes qui correspondent à une greffe de tissu ou de cellules entre deux jumeaux génétiquement identiques.

Le type de greffe le plus fréquent chez l'homme est l'allogreffe qui correspond à une greffe entre deux individus différents mais de même espèce. En absence de traitement lors de ce type de greffes, le système immunitaire du receveur reconnaîtra le greffon comme "étranger" à l'organisme et s'emploiera à le détruire. Le dernier type de greffe est la xéno greffe qui correspond à une greffe entre individus d'espèces différentes (par exemple une greffe de tissu porcine chez un homme). Ce dernier type de greffe engendre une réponse très forte et immédiate du système immunitaire du receveur du fait de la grande disparité génétique entre le donneur et le receveur.

Un des rôles majeurs du système immunitaire est de distinguer "le soi" qui doit rester toléré, du "non-soi" qui doit être reconnu et éliminé (Janeway 1992). Dans le contexte d'une allogreffe, le donneur et le receveur diffèrent entre autres pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'importance de ces molécules dans le contexte de la transplantation a été largement décrite tout le long des découvertes sur l'immunologie du rejet de greffe. Le complexe majeur d'histocompatibilité (HLA, H-2 et RT-1 chez l'Homme, la souris et le rat respectivement) est composé de trois groupes. Les molécules du CMH de classe I sont exprimées de façon ubiquitaire à des degrés variés et présentent des peptides endogènes aux cellules lymphocytaires T CD8⁺. Les molécules du CMH de classe II ont, au contraire, une expression restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et présentent des peptides exogènes aux cellules T CD4⁺. Une troisième classe de CMH a été

identifiée et les molécules de cette classe présentent des fonctions immunologiques importantes (composants du système du complément, molécules impliquées dans l'inflammation...). Cependant, ces molécules n'interviennent pas dans la présentation des antigènes aux cellules T.

La réponse immune vis-à-vis de la greffe entraîne un rejet qui peut être de trois types : le rejet hyper aigu, aigu ou chronique.

Le rejet hyper aigu : il apparaît dans les minutes ou les heures qui suivent la transplantation et résulte de la présence d'anticorps préexistants dans le sérum de l'hôte dirigés contre les antigènes du sang ABO ou les antigènes du CMH du donneur. Ces anticorps se fixent très rapidement aux cellules endothéliales du greffon et induisent la lyse de ce dernier par l'intermédiaire de la voie du complément. Ce type de rejet a été totalement maîtrisé en allogreffe par les tests de cross-matching (optimisation de la compatibilité entre le donneur et le receveur), précédents la transplantation.

Le rejet aigu : il intervient dans les premiers jours suivant la greffe et résulte d'une réponse cellulaire principalement due aux lymphocytes T. Ils peuvent reconnaître les alloantigènes présentés par les CPA du donneur ou par celles du receveur. Ces différentes voies de présentation correspondent respectivement à la présentation directe et indirecte (Lechler and Batchelor 1982) que je détaillerai plus tard. Néanmoins, la composante humorale peut aussi être importante (Sayegh and Colvin 2003). En effet, il a été montré chez la souris que les anticorps spécifiques des antigènes du donneur pouvaient, comme le complément (Pratt et al. 2002) jouer un rôle dans le rejet d'allogreffe (Brandle et al. 1998). Bien que de nombreux types cellulaires (macrophages, cellules NK) participent à ce processus de rejet d'allogreffe, seules les cellules T sont absolument requises. Ainsi, des souris ou des rats dépourvus de cellules T ne peuvent pas rejeter leur greffe (Hall et al. 1978; Bolton et al. 1989).

Le rejet chronique : il ne se manifeste que des mois, voire des années, après la transplantation et consiste en une perte fonctionnelle progressive du greffon. Il est notamment associé à une artériosclérose des vaisseaux sanguins du greffon et une fibrose du parenchyme (Libby and Pober 2001; Vadivel et al. 2007). Le rejet chronique se caractérise par une perte progressive et lente de la fonction du greffon. Ce rejet est un phénomène multifactoriel. Les causes responsables de ce rejet peuvent être immunologiques ou non et sont encore mal définies (l'acte chirurgical en lui-même, l'ischémie-reperfusion, la présence de cellules alloréactives ou d'alloanticorps). Les

traitements immunosuppresseurs actuels sont capables de bloquer le rejet aigu mais pas le rejet chronique. Ce dernier est l'une des causes majeures de la perte du greffon 5 à 10 ans après la transplantation.

II. La présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes

La réponse immune menant au rejet de greffe est principalement due à l'existence chez les mammifères de gènes polymorphiques largement exprimés par les cellules de l'organisme (Krensky et al. 1990). Si le donneur et le receveur diffèrent par l'un de ces loci, la protéine codée par l'allèle différent sera reconnue comme étrangère, et une réponse T se développera. Les gènes polymorphiques les plus importants se trouvent dans le complexe majeur d'histocompatibilité. La compatibilité des molécules CMH représente l'un des facteurs les plus importants pour le succès de la greffe, même si cela ne suffit pas à prévenir complètement le rejet en raison de l'expression d'autres polymorphismes génétiques (antigènes mineurs d'histocompatibilité). La réponse immune est donc absente seulement si le donneur et le receveur sont des vrais jumeaux.

Les CPA, et plus particulièrement les cellules dendritiques, ont pour fonction la capture des antigènes, leur dégradation et leur chargement sur les molécules du CMH. Ces fonctions sont classiquement regroupées sous le terme de présentation antigénique.

1. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des leucocytes rares et constituent une population extrêmement hétérogène. Elles sont continuellement produites dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Malgré leur hétérogénéité, toutes les cellules dendritiques ont en commun un progéniteur hématopoïétique CD34⁺. A partir de ce progéniteur, les cellules dendritiques se différencient selon deux voies : la voie myéloïde et la voie lymphoïde, en réponse au GM-CSF et au TNF- α (Banchereau et al. 2000; Shortman and Liu 2002).

Parmi les cellules myéloïdes (ou conventionnelles), les cellules de Langerhans ont été les premières à être décrites. Elles se situent dans l'épiderme et l'épithélium des muqueuses et sont caractérisées par l'expression spécifique de la lectine langerine (CD207) à leur surface et des granules de Birbeck cytoplasmiques (Caux et al. 1996; Valladeau et al. 1999; Valladeau et al. 2000; Mc Dermott et al. 2002). Les autres DCs conventionnelles décrites sont les cellules dendritiques interstitielles qui sont situées dans la plupart des tissus ainsi qu'au niveau du derme (Caux et al. 1996).

La voie de différenciation lymphoïde permet de générer des cellules dendritiques dites plasmacytoïdes (pDCs). Leur morphologie est particulière, avec un cytoplasme abondant et un noyau excentré ressemblant aux plasmocytes, d'où leur nom plasmacytoïdes. Elles se situent dans la rate, les ganglions, le thymus et la moelle osseuse (Nakano et al. 2001; Ferrero et al. 2002; Nikolic et al. 2002). Elles sont caractérisées par la production de quantités importantes d'IFN de type I (α et β) suite à une infection virale (Cella et al. 1999; Siegal et al. 1999).

Les cellules dendritiques sont des régulateurs clés du devenir de la réponse immunitaire, capables à la fois d'induire ou d'inhiber les réponses T selon les circonstances. Cette caractéristique des cellules dendritiques est liée à leur aptitude à intégrer de nombreux signaux, et à diriger ensuite une réponse T appropriée. Le rôle des cellules dendritiques a été longtemps considéré uniquement du point de vue de l'activation du système immunitaire. Cependant, il apparaît dorénavant clairement que les cellules dendritiques peuvent également induire non pas l'immunité, mais la tolérance envers les antigènes qu'elles présentent.

1.1. Les cellules dendritiques et l'immunité

Les cellules dendritiques sont capables d'initier à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative (Banchereau et al. 2000; Lanzavecchia and Sallusto 2001; Mellman and Steinman 2001). Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes très puissantes, qui, en plus de leur aptitude à stimuler des réponses immunitaires secondaires, possèdent la capacité unique d'induire des réponses immunitaires primaires.

Les précurseurs immatures des cellules dendritiques présents dans la moelle osseuse circulent dans le sang pour atteindre les tissus cibles, et prennent résidence sur ces sites potentiels d'entrée de pathogènes. Dans les tissus, les cellules dendritiques sont présentes dans un état physiologique immature spécialisé pour la capture des antigènes (Steinman 1991). Après capture de l'antigène par phagocytose, macropinocytose, ou par endocytose (Sallusto et al. 1995; Albert et al. 1998; Guermonprez et al. 2002), les antigènes sont découpés en peptides et présentés sur les molécules du CMH.

Après avoir reçu des signaux de maturation, directement par des pathogènes ou par l'intermédiaire de stimuli inflammatoires, les cellules dendritiques modifient leur expression de récepteurs de chimiokines (en particulier, augmentation de l'expression de CCR7), ce qui leur permet de quitter les tissus périphériques pour migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (Randolph et al. 2008).

Une fois dans les zones T des organes lymphoïdes, les cellules dendritiques peuvent induire l'activation et la prolifération des cellules T CD8⁺ et CD4⁺, via la présentation des peptides sur les molécules du CMH de classe I et de classe II, respectivement. En plus de leur rôle dans la protection contre les pathogènes, les cellules dendritiques ont également un rôle majeur dans les réponses immunitaires anti-tumorales (dPalucka et al. 2007; Dhodapkar et al. 2008). En effet, des études réalisées chez des patients atteints de lymphomes (Hsu et al. 1996; Timmerman et al. 2002) ou de mélanomes métastatiques (Nestle et al. 1998; Thurner et al. 1999) ont montré que la vaccination avec des cellules dendritiques chargées avec des antigènes tumoraux pouvait entraîner une réponse immune spécifique et même, dans certains cas des réponses cliniques.

1.2. La maturation des cellules dendritiques

In vivo, la maturation des cellules dendritiques est étroitement liée à leur migration des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques drainants. Cette maturation est associée à de nombreux événements coordonnés incluant la perte des récepteurs d'endocytose et/ou de phagocytose, des changements dans l'expression des récepteurs de chimiokines, la sécrétion de cytokines polarisant la réponse T et l'augmentation de l'expression des molécules du CMH et de costimulation, telles que CD40, CD80 et CD86 (B7.1 et B7.2 respectivement).

Lors d'infections, la maturation des cellules dendritiques est induite généralement via les récepteurs "Toll-like" (TLR), les récepteurs "NOD-like" (NLR) ou bien certaines molécules de la famille des lectines de type-C. Les récepteurs TLR reconnaissent des motifs associés aux pathogènes, tels que les peptidoglycans (TLR2), l'ARN double brin (TLR3), le lipopolysaccharride (LPS) (TLR4), la flagelline (TLR5), l'ARN bactérien (TLR7/8) ou l'ADN bactérien (TLR9) (Medzhitov 2001) et certaines molécules endogènes sécrétées lors de l'inflammation (ADN, ARNm, Heat shock protein...) (Rifkin et al. 2005). L'activation des cellules dendritiques est aussi induite par des cytokines proinflammatoires, et en particulier par des membres de la superfamille du TNF, comme le TNF- α , CD40L ou Trance (Cella et al. 1996; Koch et al. 1996; Bachmann et al. 1999; Wong et al. 1999). Récemment, il a été montré que des signaux via les récepteurs de chimiokines pouvaient également induire la maturation des cellules dendritiques, tels que des ligands de CCR5 (Aliberti et al. 2000; Aliberti et al. 2003) ou de CCR7 (Marsland et al. 2005).

1.3. Le rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques matures et immatures ont des fonctions différentes. Il a longtemps été considéré que les cellules immatures induisaient la tolérance et les matures

induisaient l'immunité. Cependant, cette corrélation n'est pas totalement exacte. En effet, il a été montré, par exemple, que certaines cellules dendritiques matures exprimant l'enzyme IDO avaient des propriétés tolérogéniques (Mellor and Munn 2004). Dans le but de simplifier cette partie, je garderai dans cette partie la corrélation cellules immatures / fonction tolérogène et cellules matures / fonction immunogène.

Les cellules dendritiques des tissus testent continuellement leur environnement, captent des antigènes et migrent en petite quantité vers les ganglions lymphatiques drainants. En l'absence d'inflammation, les cellules dendritiques restent dans un état immature, et les antigènes sont présentés aux cellules T dans les ganglions en l'absence de costimulation, ce qui induit soit la délétion des cellules T, soit la génération de cellules T régulatrices (Treg) induites. Je détaillerai plus loin dans mon exposé les propriétés tolérogéniques de ces cellules (**Figure 1a**).

L'inflammation des tissus induit la maturation des cellules dendritiques et leur migration en grande quantité vers les ganglions lymphatiques drainants. Les cellules dendritiques matures expriment à leur surface des complexes CMH/peptide et des molécules de costimulation. Cela permet la stimulation des cellules T CD4⁺ auxiliaires et des cellules T CD8⁺ cytotoxiques (CTL), l'activation des cellules B et l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques se différencient des autres cellules présentatrices d'antigènes par leur capacité unique à activer un lymphocyte T naif (**Figure 1b**).

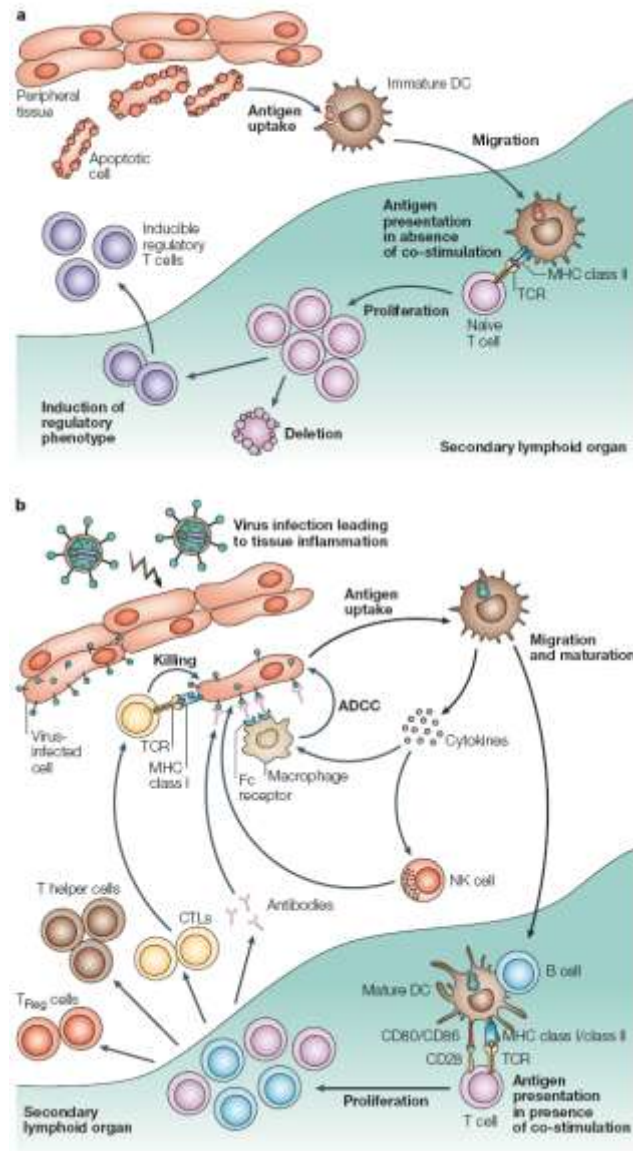


Figure 1 : Les cellules dendritiques matures et immatures ont des fonctions différentes.

D'après Banchereau et al. (Banchereau and Palucka 2005).

2. La présentation allogénique

La reconnaissance antigénique fait intervenir deux acteurs : la cellule présentatrice d'antigène et la cellule T. Au niveau moléculaire, cette reconnaissance est basée sur l'interaction entre le complexe formé par un peptide et une molécule du CMH à la surface des cellules présentatrices d'antigène avec le TCR. D'une manière générale, les peptides exogènes sont présentés sur les molécules du CMH de classe II aux cellules T CD4⁺, alors que les peptides endogènes sont présentés sur les molécules du CMH de classe I aux cellules T CD8⁺. Cependant, les molécules de CMH de classe II peuvent également présenter des peptides endogènes aux cellules T CD4⁺ (Weiss and Bogen 1991) et les

molécules de CMH de classe I peuvent présenter des peptides exogènes aux cellules T CD8⁺ (Jondal et al. 1996) : il s'agit de la "présentation croisée". Les mécanismes permettant à un peptide dérivé d'un antigène exogène d'être apprêté sur les molécules du CMH de classe I ne sont pas encore clairement définis. Il apparaîtrait que les cellules dendritiques et les macrophages (ayant la capacité de réaliser la présentation croisée) présenteraient la capacité d'amener les antigènes exogènes phagocytés dans le réticulum endoplasmique où ils pourront être digérés et chargés sur les molécules du CMH de classe I (Cresswell et al. 2005). Une étude récente propose un nouveau mécanisme impliquant le transfert direct des peptides entre le cytoplasme de deux cellules voisines par l'intermédiaire de jonctions membranaires "gap" (Neijssen et al. 2005; Afzali et al. 2007; Handel et al. 2007).

Dans le contexte d'une allogreffe, les lymphocytes T du receveur peuvent reconnaître directement les complexes allogéniques CMH/peptide présents à la surface des CPA allogéniques du greffon (présentation directe) (**Figure 2a**), mais aussi les peptides allogéniques présentés par les CPA du receveur (présentation indirecte) (**Figure 2b**). Un troisième type de présentation a récemment été décrit et correspond à la présentation de complexe CMH/ peptide du donneur par les CPA du receveur (présentation semi-directe) (**Figure 2c**). Je vais maintenant décrire plus en détail ces 3 voies de présentation allogénique.

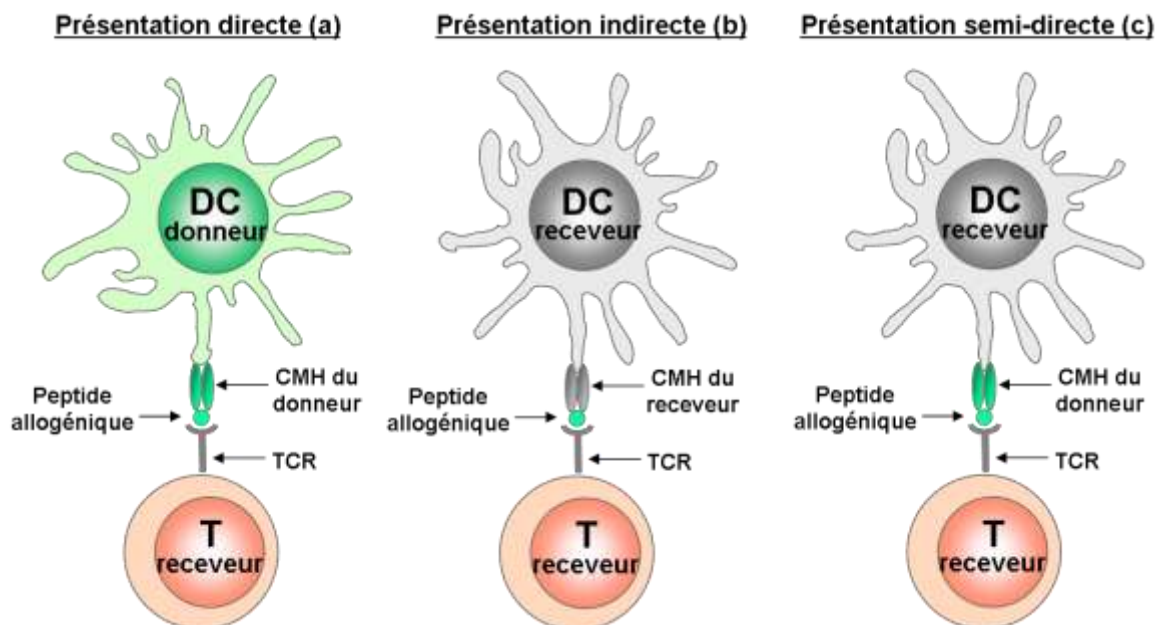


Figure 2 : Les différentes voies de présentation allogénique.

2.1. La présentation directe

La cellule T CD8⁺ ou CD4⁺ du receveur peut reconnaître directement la molécule du CMH de classe I ou de classe II allogénique exprimée par une CPA du donneur (Lechler et al. 1990). Les cellules alloréactives peuvent ainsi constituer jusqu'à 20% du pool des lymphocytes T (Lindahl and Wilson 1977; Suchin et al. 2001). La reconnaissance par les lymphocytes T de peptides dans le contexte du CMH allogénique démontre que la restriction de reconnaissance des lymphocytes T dans le contexte du CMH du soi n'est pas exclusive. La reconnaissance directe joue un rôle primordial dans certains modèles d'allogreffe. Lechler et ses collaborateurs ont démontré chez le rat que la transplantation d'un greffon rénal toléré, et ainsi dépourvu de ses leucocytes, à un second receveur non-traité ne conduit pas au rejet de la greffe. La réinjection de cellules dendritiques du donneur induit le rejet ce qui démontre que, dans ce modèle, la réponse directe joue un rôle primordial dans le processus de rejet (Lechler and Batchelor 1982). De même, dans un autre modèle d'allogreffe rénale chez le rat, l'élimination des leucocytes passagers du greffon avant la transplantation permet de prolonger la survie de la greffe (McKenzie et al. 1984). D'autres travaux réalisés avec des donneurs d'organes déficients en molécules du CMH aboutissent aux mêmes conclusions : une allogreffe d'îlots de pancréas issus de souris dépourvues de molécules du CMH de classe I est définitivement acceptée (Markmann et al. 1992). De même, une allogreffe cardiaque provenant d'une souris déficiente en molécules du CMH de classe II n'est pas rejetée (Campos et al. 1995). Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris, avec des receveurs dépourvus de lymphocytes T (RAG-1^{-/-}) et de molécules du CMH de classe II, le transfert de lymphocytes T CD4⁺ de souris naïves a été décrit comme étant nécessaire et suffisant pour rejeter le greffon. La réponse indirecte étant inexistante, ces résultats démontrent bien que dans ce modèle, la réponse directe est suffisante pour rejeter la greffe (Pietra et al. 2000).

Matzinger et ses collaborateurs ont démontré que les complexes CMH allogénique/peptide possédant une structure similaire aux complexes CMH syngénique/peptide sont capables de déclencher l'activation des lymphocytes T par un mécanisme de mimétisme moléculaire (Matzinger and Bevan 1977). Mais les TCR peuvent également directement interagir avec les résidus polymorphes des molécules du CMH allogéniques indépendamment du peptide présenté. Ainsi la force de reconnaissance allogénique dépend des similarités et/ou des différences de séquences entre les molécules du CMH du donneur et celles du receveur au niveau du site de liaison avec le TCR. Lorsque, au niveau du site de liaison avec le TCR, la molécule du CMH allogénique est proche de celle syngénique, le lymphocyte T reconnaît et réagit surtout avec le peptide endogène présenté (liaison peptidique dominante). Par contre, lorsqu'il y a trop de différences entre les

molécules du CMH allogénique et syngénique, le lymphocyte T va surtout réagir avec le CMH allogénique, indépendamment du peptide présenté (liaison au CMH dominant) (Lechler et al. 1990).

La reconnaissance directe n'est cependant pas l'unique mécanisme qui peut entraîner le rejet d'allogreffe. En effet, la reconnaissance indirecte a été démontrée comme étant suffisante et/ou nécessaire pour initier un rejet dans différents modèles d'allogreffe.

2.2. La présentation indirecte

Les cellules T du receveur peuvent reconnaître les peptides issus des molécules du CMH du donneur présentés par les CPA du receveur (Benichou et al. 1992). Les alloantigènes du donneur sont internalisés et dégradés par les CPA du receveur puis présentés aux lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺ (présentation croisée) sous forme de peptides associés respectivement aux molécules du CMH de classe II et de classe I. La réponse indirecte permet ainsi la coopération des lymphocytes T CD4⁺ avec les lymphocytes B (Steele et al. 1996) et avec les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxique (Popov et al. 1995; Lee et al. 1998).

Dans certains modèles, des greffons dépourvus de molécules du CMH de classe II sont rejetés très rapidement. La présentation directe étant inexistante cela démontre que la présentation indirecte est suffisante pour induire le rejet de l'allogreffe (Auchincloss et al. 1993; Josien et al. 1998; Valujskikh et al. 1998; Yamada et al. 2003). Des travaux ont démontré que les lymphocytes T CD4⁺ sont suffisants pour induire le rejet d'une allogreffe dépourvue de molécules du CMH de classe I ou de classe II, donc par présentation indirecte (Dalloul et al. 1996).

D'autres travaux suggèrent que la réponse indirecte est responsable de l'installation du rejet chronique (Sayegh and Krensky 1996; Jiang et al. 2004). Valujskikh et al. ont démontré dans un modèle d'allogreffe de peau chez la souris que la reconnaissance d'un seul peptide allogénique présenté dans le contexte du CMH du soi (présentation indirecte) est suffisante pour induire le rejet dont les lésions sont caractéristiques du rejet chronique (Valujskikh et al. 1998). D'autre part, une étude a démontré que des patients possédant dans leur sang des cellules T activées par présentation indirecte développent de nombreux signes de rejet chronique (Ciobotariu et al. 1998). L'immunisation avec des peptides synthétiques de la chaîne $\alpha 1$ de la molécule du CMH de classe I accélère le rejet d'une allogreffe chez le porc, et est associée au développement d'une vasculopathie importante (atteinte des vaisseaux). Ces travaux démontrent un lien étroit entre la présentation indirecte des peptides du CMH de classe I et le développement de lésions caractéristiques du rejet chronique.

2.3. La présentation semi-directe

Par ailleurs, il a été décrit que la génération de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques avait besoin de lymphocytes T CD4⁺ activés par la même APC pour être efficace (Ridge et al. 1998). Plusieurs études ayant montré que des lymphocytes T CD4⁺ de spécificité indirecte pouvaient amplifier la réponse effectrice de lymphocytes T CD8⁺ de spécificité directe (Lee et al. 1994), l'hypothèse d'un troisième mode de présentation est apparu : la présentation semi-directe. En effet, il a été décrit récemment que les cellules dendritiques avaient la capacité d'acquérir des complexes CMH de classe I et II/peptide provenant d'autres cellules dendritiques ou de cellules endothéliales (Herrera et al. 2004) et d'activer efficacement des lymphocytes T (Thery et al. 2002). Le modèle de présentation semi-directe consiste donc en une présentation simultanée par les cellules dendritiques du donneur de complexes CMH de classe I/peptide à des lymphocytes T CD8⁺ de spécificité directe et de complexes CMH de classe II/peptide à des lymphocytes T CD4⁺ de spécificité indirecte (Jiang et al. 2004).

En résumé, l'implication des trois voies de présentation antigénique dans le rejet d'allogreffe semble dépendre du modèle allogénique utilisé et interviendrait de façon séquentielle. La présentation directe entraînerait une réponse immédiate et serait plus impliquée dans le rejet aigu alors que la présentation indirecte serait plus impliquée dans la mise en place du processus de rejet chronique (Liu et al. 1993; Jiang et al. 2004), ce qui concorde avec le fait que les cellules présentatrices d'antigènes du donneur disparaissent avec le temps ce qui décroît l'importance de la voie directe. Cependant, le rôle de la présentation semi-directe dans le processus de rejet reste, à l'heure actuelle, inconnu (Afzali et al. 2007). Le groupe de R. Lechler a récemment proposé que ce dernier mode de présentation puisse permettre le maintien de la réponse des lymphocytes T de spécificité directe après la disparition des APC du donneur (Gokmen et al. 2008).

3. L'activation et la différenciation T

3.1. Le signal de costimulation

La reconnaissance de l'antigène par le récepteur des cellules T (TCR) aboutit à l'activation des cellules T. Cependant, l'engagement du TCR avec le complexe CMH/peptide (signal 1) n'est pas suffisant pour initier la cascade de signalisation intracellulaire menant à l'activation de la cellule T. Les cellules dendritiques doivent fournir un second signal aux cellules T naïves, par l'intermédiaire des molécules de costimulation, présentes à leur surface, qui interagissent avec les récepteurs correspondants présents à la surface des cellules T (Janeway and Bottomly 1994).

Il existe de nombreuses molécules de costimulation (Frauwirth and Thompson 2002), mais les mieux caractérisées sont les molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) qui reconnaissent le CD28 (Linsley and Ledbetter 1993). Une fois activées, les cellules T expriment CTLA-4 (CD152) qui reconnaît les molécules B7 avec une affinité supérieure au CD28. CTLA-4 délivre un signal négatif à la cellule T activée, permettant une régulation de la réponse immune (Walunas et al. 1996; Lee et al. 1998). Une autre voie de stimulation importante est l'interaction CD40-CD40L (Cayabyab et al. 1994) : CD40L est induit sur les cellules T CD4⁺ activées et permet en retour une activation de la cellule dendritique exprimant CD40 (Grewal and Flavell 1996). L'activation complète des cellules T alloréactives mène à la production d'interleukine 2 (IL2) (considérée comme le signal 3) qui favorise leur prolifération et l'amplification du pool alloréactif.

3.2. Différenciation et mécanismes effecteurs des cellules T CD4⁺

Les cellules T CD4⁺, une fois activées par les cellules présentatrices d'antigène, jouent un rôle primordial en activant de nombreuses cellules effectrices par l'intermédiaire de leur production de cytokines. Les cytokines, responsables de la communication intercellulaire, sont avec les anticorps les médiateurs solubles impliqués dans le développement de la réponse immunitaire.

Selon le phénotype des cellules dendritiques, l'environnement cytokinique, et la reconnaissance TCR/CMH, les précurseurs alloréactifs CD4 (Th0) peuvent se différencier selon 4 voies : Th1, Th2, Th17 ou iTreg (lymphocytes T régulateurs induit incluant les cellules Tr1 ou Th3...) (Zhu and Paul 2008) (**Figure 3**). Cette dernière voie sera traitée un peu plus tard dans le chapitre "**Les cellules T régulatrices**". Cependant, la différenciation des cellules T naïves en cellules effectrices ne semble pas être un processus terminal. En effet, certaines études suggèrent qu'*in vitro* des cellules différenciées peuvent être reprogrammées en une autre population effectrice en fonction de l'environnement cytokinique (Th17 en Th1 ou des Treg en Th17) (Xu et al. 2007; Nurieva et al. 2009).

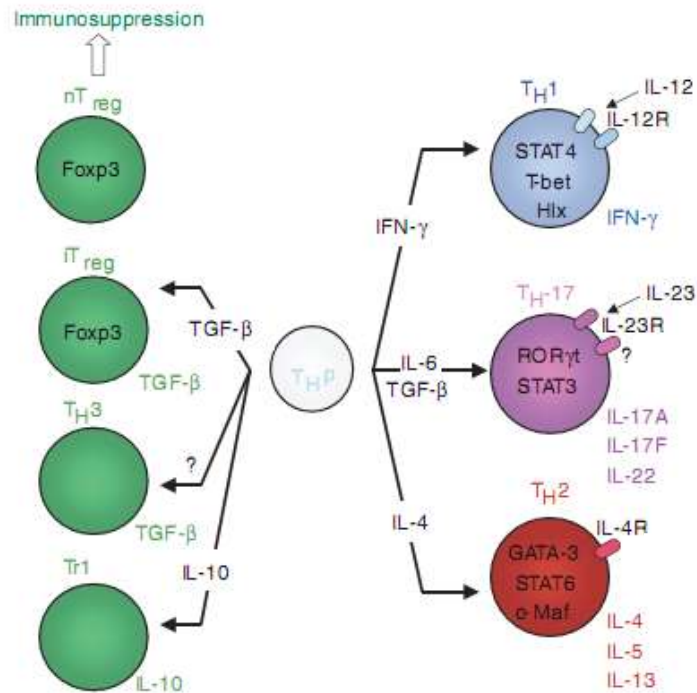


Figure 3 : Différentes voies de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.

D'après Bettelli et al. (Bettelli et al. 2006).

3.2.1. Th1

Dans l'initiation de la réponse Th1, les cellules dendritiques activées jouent un rôle primordial. En effet, ces cellules sont responsables d'une importante production d'IL12 qui va promouvoir la différenciation de type Th1 en jouant directement sur les cellules NK et les lymphocytes T CD4⁺. Les cellules NK activées vont produire l'interféron- γ (IFN γ) qui va engendrer avec l'IL12 la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers la voie Th1 (Murphy and Reiner 2002). Ces cellules de type Th1 activées vont alors sécréter d'importantes quantités d'IFN γ , d'IL2 et de lymphotoxine- α (LT- α). Les cellules CD4⁺ de type Th1 ont été largement décrites comme médiateurs de la réponse immune dirigée contre des pathogènes intracellulaires (Mosmann and Coffman 1989; Paul and Seder 1994).

3.2.2. Th2

La différenciation de type Th2 est induite principalement par deux cytokines : l'IL2 et l'IL4 (Le Gros et al. 1990; Swain et al. 1990). Les cellules T CD4⁺ de type Th2 activées vont alors sécréter de nombreuses cytokines dont l'IL4, l'IL5, l'IL9, l'IL10 et l'IL13. Ces cellules jouent un rôle majeur dans la réponse immune vis-à-vis de pathogènes extracellulaires, en agissant sur le "switch" isotypique des immunoglobulines produites par les lymphocytes B,

notamment par l'interaction CD40-CD40L (Lumsden et al. 2003), mais aussi en induisant l'activation des éosinophiles et des mastocytes.

Les deux sous-populations Th1 et Th2 sont capables de s'autoréguler. En effet, l'IFN γ produit par les cellules Th1 inhibe la prolifération et la sécrétion de cytokines des cellules Th2 alors que l'IL4 et l'IL10 produites par les Th2 inhibent la prolifération et la sécrétion des cytokines des cellules Th1.

3.2.3. Th17

La différenciation des cellules naïves T CD4⁺ en Th17 est induite par le TGF β en combinaison avec l'IL6, cytokine proinflammatoire (Veldhoen et al. 2006). Le rôle du TGF β dans la différenciation des Th17 est surprenant car cette cytokine est surtout connue pour induire l'expression de Foxp3 et le développement de cellules T régulatrices (Wing et al. 2006). Cependant, Bettelli et al. ont montré chez la souris que l'ajout d'IL6 recombinante inhibe l'induction de cellules Treg Foxp3⁺ dépendantes du TGF β (Bettelli et al. 2006). Suite à ces résultats, il a été proposé une relation réciproque entre les cellules pathogéniques Th17 et les cellules Treg Foxp3⁺. Dans cette relation, IL6, une protéine sécrétée pendant l'inflammation, joue le rôle de pivot dans la détermination du devenir de la réponse immunitaire (Th17 ou Treg).

Les cellules T CD4⁺ de type Th17 activées vont alors produire de l'IL21 et exprimer le récepteur de l'IL23 ainsi que le facteur de transcription ROR γ T (Mangan et al. 2006). L'IL21 est responsable de l'amplification de la différenciation Th17 mais peut aussi remplacer l'IL6 dans l'initiation de cette différenciation mais aussi dans l'inhibition de Foxp3 (Korn et al. 2007; Nurieva et al. 2007). Parce que les cellules Th17 sont la source majeure d'IL21, il a été suggéré l'existence d'une boucle d'amplification autocrine dans laquelle les cellules Th17 augmentent leur propre différenciation en sécrétant de l'IL21 (Nurieva et al. 2007). Finalement, l'IL23, qui avait été décrit initialement comme facteur de différenciation de ces cellules, joue un rôle dans le maintien de la survie et/ou de la fonction des Th17 différenciées (Veldhoen et al. 2006). L'IL23 peut aussi permettre la différenciation. Une fois différenciées, ces cellules produisent de l'IL17A, IL17F, IL22 et de l'IL21.

Alors que les cytokines décrites au-dessus régulent positivement la spécialisation des cellules Th17, d'autres cytokines régulent négativement cette différenciation. En effet, il a été montré *in vitro* que l'IFN γ et l'IL4 (produites respectivement par les cellules Th1 et Th2) empêchaient la différenciation de ces cellules (Lubberts et al. 2000; Harrington et al. 2005; Park et al. 2005). Outre ces cytokines, Laurence et al. ont montré que l'utilisation d'un anticorps bloquant pour l'IL2 induisait la différenciation des cellules T CD4⁺ en Th17

(Laurence et al. 2007). En plus de ces cytokines, il a aussi été décrit que l'IL27, membre de la famille de l'IL12 formé de l'IL27p28 et d'EBI3, ainsi que l'IL25 régulaient négativement la spécialisation en cellules Th17 (Batten et al. 2006; Stumhofer et al. 2006; Kleinschek et al. 2007).

Un rôle de ces cellules Th17 a été montrées dans de nombreuses maladies autoimmunes (Langrish et al. 2005; Park et al. 2005; Bettelli et al. 2006; Yen et al. 2006) et en transplantation. En effet, une augmentation de l'expression de l'IL17 a été observée dans la phase de rejet aigu d'allogreffe chez l'homme et dans un modèle expérimental d'allogreffe rénale (Loong et al. 2002; Vanaudenaerde et al. 2006). De plus, l'inhibition de l'IL17 (injection d'une molécule de fusion IL17R-immunoglobuline) dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, permet de retarder le développement du rejet aigu (Antonysamy et al. 1999).

3.2.4. Th9

Très récemment, une nouvelle population de lymphocytes T CD4⁺ a été décrite. En effet, les groupes de V. Kuchroo et B. Stockinger ont décrit une population de cellules T CD4⁺ de type Th9 caractérisées par leur forte production d'IL10 et d'IL9 (Dardalhon et al. 2008; Veldhoen et al. 2008). Ces cellules sont générées en présence de TGFβ et d'IL4, cette dernière cytokine bloquant la différenciation des Treg. Ces cellules ne présentent pas de capacités régulatrices *in vitro* et *in vivo*, malgré leur forte production d'IL10. En effet, l'injection de ces cellules à des souris RAG déficientes induit l'apparition de colite et de neurite montrant leur capacité à promouvoir l'inflammation (Dardalhon et al. 2008).

Après leur activation, leur différenciation et leur amplification dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules T CD4⁺ migrent vers le greffon et produisent des cytokines qui activent différents types cellulaires responsables de la destruction du greffon. (**Figure 4**). La sécrétion importante d'IFNγ par les cellules T CD4⁺ active les macrophages qui détruisent le greffon en libérant des cytokines proinflammatoires, des radicaux oxygénés et des facteurs procoagulants. L'IFNγ et le TNFβ augmentent l'expression des molécules du CMH de classe I et II sur les cellules du greffon. L'IL2 favorise la prolifération des cellules T et est impliquée dans la génération des cellules T CD8⁺ cytotoxiques, qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I du greffon et lysent la membrane des cellules cibles. Les cellules T CD4⁺ peuvent également exercer une activité cytotoxique par les systèmes perforine/granzyme ou Fas/FasL (Appay et al. 2002; van de Berg et al. 2008). Avec l'aide des cellules T CD4⁺, les cellules B s'activent et se différencient en plasmocytes producteurs d'alloanticorps. Les anticorps produits se fixent sur les cellules cibles et induisent leur lyse

suite à l'activation du complément, ou par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Les cellules NK, activées par l'IL2, participent également au rejet par des mécanismes d'ADCC.

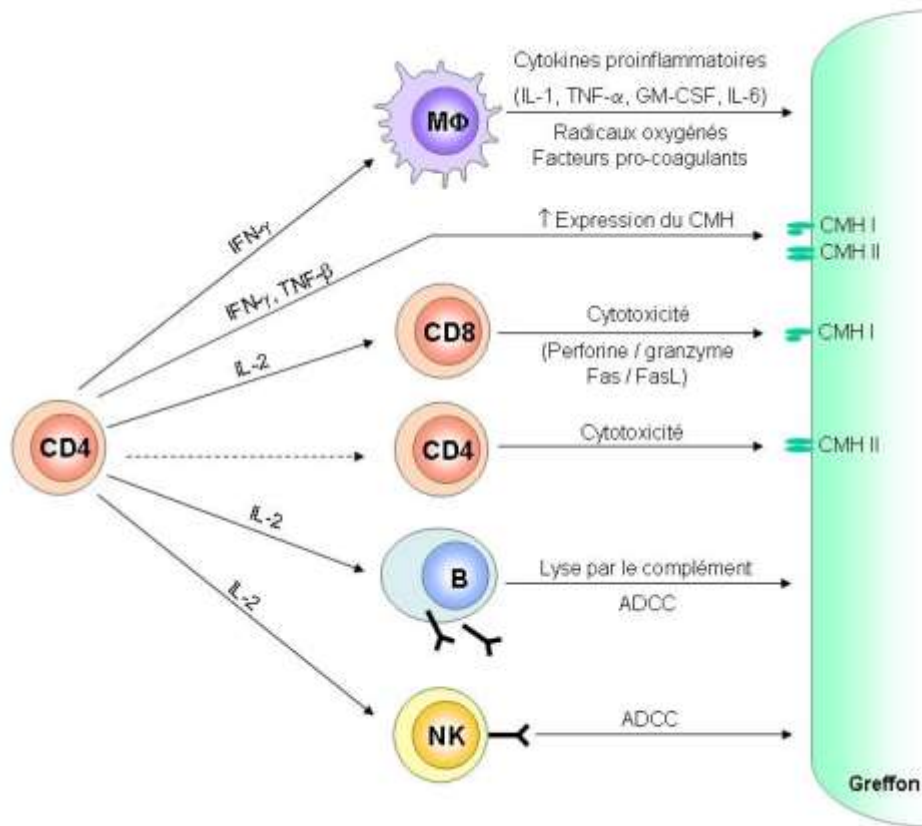


Figure 4 : Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans le rejet aigu.

3.3. Différenciation et mécanismes effecteurs des cellules T CD8⁺

La reconnaissance des alloantigènes présentés sur les molécules du CMH de classe I ainsi que l'IL2 produite par les cellules T CD4⁺ activées permettent la différenciation et l'activation des cellules T CD8⁺ en cellules cytotoxiques (Lafferty et al. 1980).

Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent tuer leurs cellules cibles par deux voies distinctes :

- La sécrétion de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes. La perforine provoque la formation de pores dans la membrane des cellules cibles permettant aux granzymes d'entrer dans la cellule et d'induire la lyse par apoptose des cellules cibles (Kagi et al. 1994; Trapani and Smyth 2002).
- La liaison de Fas porté par les cellules cibles avec son ligand (FasL) porté par les lymphocytes T CD8⁺ induit également la mort des cellules cibles par apoptose (Kagi et al. 1994).

Comme pour les cellules T CD4⁺, l'activation des cellules T CD8⁺ peut également mener à la différenciation en cellules régulatrices (**chapitre B.III. Les cellules T régulatrices**).

B. La tolérance

La tolérance immunologique est définie par une non-réponse du système immunitaire vis-à-vis d'un antigène. La tolérance envers les antigènes du soi est induite principalement par la sélection négative dans le thymus (tolérance centrale), mais elle est également maintenue par des mécanismes périphériques (tolérance périphérique). En transplantation, la tolérance à une allogreffe se définit par l'acceptation définitive du greffon, sans développement de rejet chronique à long terme, et ceci sans empêcher le système immunitaire de se défendre contre d'autres antigènes étrangers.

I. La tolérance centrale

Les lymphocytes T se développent dans le thymus à partir de précurseurs provenant de la moelle osseuse. Le réarrangement des gènes de leur TCR se produit lors de ce développement, puis le répertoire lymphocytaire est défini par l'intermédiaire de la sélection positive puis négative. Au cours de ce processus de sélection, plus de 90% des cellules T sont éliminées (**Figure 5**).

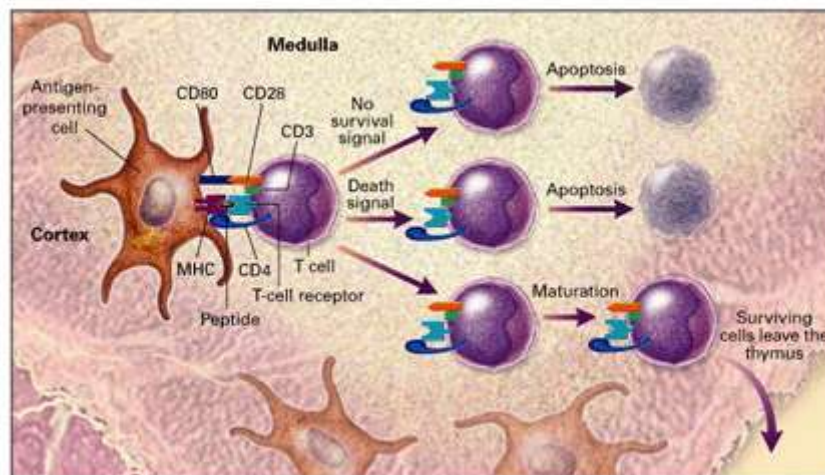


Figure 5 : Mécanismes de la tolérance centrale.

D'après Kamradt and Mitchison (Kamradt and Mitchison 2001).

1. La sélection positive

La sélection positive permet de conserver les thymocytes capables de reconnaître via leur TCR un peptide associé à une molécule du CMH du soi (Fink and Bevan 1978). Au

cours de ce processus, les cellules épithéliales du cortex thymique présentent aux cellules T des complexes CMH/peptide et fournissent un signal de survie aux cellules capables d'interagir avec les molécules du CMH du soi (Benoist and Mathis 1989). Les cellules T qui reconnaissent les molécules du CMH du soi de manière trop faible meurent par apoptose dans le cortex.

2. La sélection négative

Les cellules T subissent ensuite la sélection négative, qui permet d'éliminer les cellules dont les récepteurs se fixent fortement aux antigènes du soi. La sélection négative joue un rôle essentiel dans la tolérance au soi, en éliminant une grande majorité des cellules T autoréactives. Cette sélection peut être effectuée par les cellules épithéliales médullaires mais ce sont les cellules dendritiques présentes dans le thymus qui apparaissent comme les principaux acteurs de cette sélection (Anderson et al. 1998). Récemment, il a été montré que le répertoire des peptides du soi présentés dans le thymus est étonnamment large, c'est-à-dire incluant aussi des antigènes exclusivement exprimés dans certains tissus comme l'insuline, un antigène spécifique des îlots pancréatiques (Kyewski et al. 2002; Gotter et al. 2004). La présentation de peptides autologues aux cellules T par les cellules épithéliales médullaires est sous le contrôle de l'expression d'un gène régulateur de la transcription, AIRE (AutoImmune REgulator). Ainsi, AIRE entraîne l'expression de nombreuses protéines dans le thymus qui peuvent être rencontrées en périphérie (Gavanescu et al. 2007). L'expression de AIRE sur les cellules épithéliales médullaires permet donc d'établir un état de tolérance au soi par délétion clonale des thymocytes autoréactifs (Zuklys et al. 2000; Derbinski et al. 2005). En effet, des études ont montré que des souris déficientes pour ce gène présentent un défaut d'induction de la tolérance et développent des maladies autoimmunes (Anderson et al. 2002; Liston et al. 2003).

En transplantation, une tolérance centrale peut être obtenue suite au développement d'un chimérisme hématopoïétique. Ce chimérisme hématopoïétique correspond à la colonisation du thymus par des cellules d'origine hématopoïétique du donneur qui participent à la sélection du répertoire lymphocytaire T (Goldrath and Bevan 1999). Ainsi, les thymocytes capables de reconnaître les antigènes du donneur ou du receveur comme des éléments du soi meurent par apoptose suite à la sélection négative dans le thymus. L'établissement d'un chimérisme hématopoïétique conduit à la tolérance à l'allogreffe non seulement chez les rongeurs (Tomita et al. 1994; Wekerle et al. 1998) mais aussi chez les primates (Kawai et al. 1995; Huang et al. 2000) et chez l'homme (Buhler et al. 2002).

Les thymocytes réactifs au soi ne sont cependant pas tous éliminés après la déplétion négative dans le thymus (Bouneaud et al. 2000). Les mécanismes périphériques du maintien de la tolérance sont donc également essentiels et peuvent constituer des approches pour l'induction de tolérance aux alloantigènes.

II. La tolérance périphérique

Quatre mécanismes principaux de tolérance périphérique, mutuellement non exclusifs, ont été décrits : la délétion, l'anergie, l'ignorance immunologique et la suppression (Figure 6).

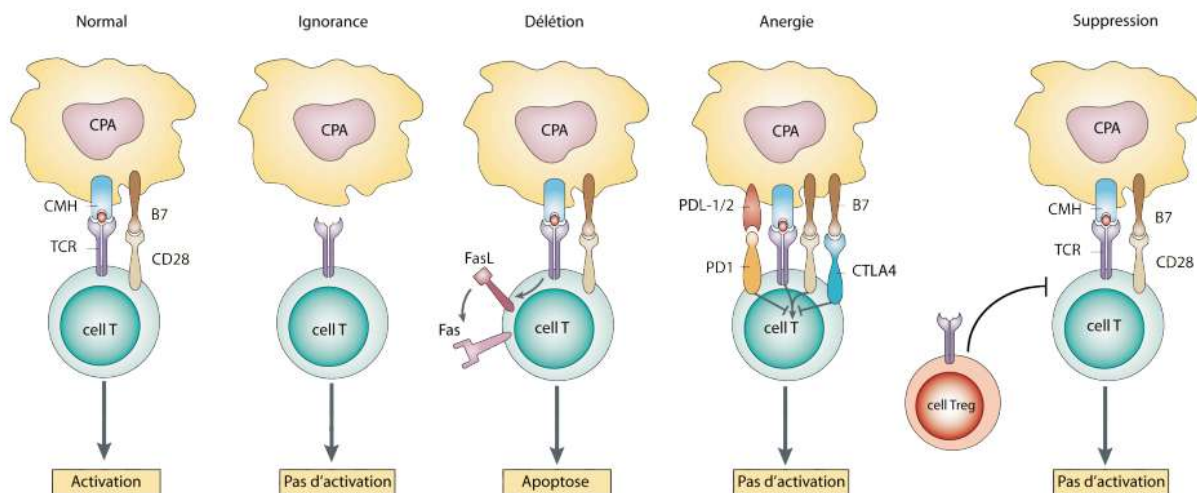


Figure 6 : Les mécanismes de tolérance périphérique.

D'après Walker et al. (Walker and Abbas 2002)

1. La délétion

Nous avons vu que les mécanismes de tolérance centrale permettent d'éliminer les cellules autoréactives dans le thymus, avant leur maturation. La délétion des cellules T peut également avoir lieu à la périphérie, lorsque celles-ci rencontrent l'antigène dans des conditions particulières (Kabelitz et al. 1993). Deux situations peuvent aboutir à la mort des cellules T : soit un défaut de signaux de survie, par exemple en l'absence de facteurs de croissance comme l'IL2 (Steller 1995), soit une activation trop importante. Ce deuxième mécanisme est nommé "mort cellulaire induite par l'activation" (AICD) et fait intervenir principalement le système Fas/FasL (Brunner et al. 1995).

2. L'anergie

L'anergie est un état d'inactivation fonctionnelle de la cellule T, qui devient réfractaire à toute restimulation par l'antigène (Lechler et al. 2001; Schwartz 2003). Elle peut être induite *in vitro* par la stimulation des cellules T via leur TCR en l'absence de second signal de costimulation. L'état anergique se caractérise par une incapacité des cellules T à proliférer et à produire de l'IL2 et peut être levé par l'addition d'IL2 (Essery et al. 1988). En transplantation, le rôle fondamental des molécules de costimulation dans la réponse allogénique a été largement prouvé (Turka et al. 1992). En effet, le blocage de l'interaction B7/CD28 par la molécule de fusion CTLA4-Ig qui se lie fortement à B7 et empêche le contact avec CD28, permet d'induire une prolongation de la survie de l'allogreffe (Levisetti et al. 1997; Olthoff et al. 1998; Guillonnet et al. 2007). Une équipe du laboratoire a aussi montré que l'utilisation d'un anticorps anti-CD28 permettait l'établissement d'une tolérance dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat (Haspot et al. 2005).

3. L'ignorance

Le terme d'ignorance s'applique à une situation dans laquelle des cellules T potentiellement réactives ne répondent pas à une stimulation antigénique. Ces cellules ne sont pas inactivées, ce qui les différencie des cellules anergiques, mais elles ignorent l'antigène (Miller et al. 1990). Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de ce phénomène d'ignorance. Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris en absence d'organes lymphoïdes secondaires, la rencontre entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques ne se fait pas, ce qui conduit à l'établissement d'une ignorance immunologique et favorise la tolérance de l'allogreffe (Lakkis et al. 2000). De plus, l'ignorance peut résulter de la séquestration de l'antigène dans des sites dits "privilegiés", non accessibles aux cellules T réactives, tels que l'oeil ou le système nerveux central (Barker and Billingham 1977) ou d'une absence de présentation par les CPA. Elle peut aussi être due à une faible concentration des antigènes, qui les rend invisibles aux cellules T (Kurts et al. 1999).

4. La suppression

Contrairement aux autres mécanismes de tolérance centrale et périphérique, il s'agit d'un processus actif dans lequel une population de cellules contrôle ou régule l'activité d'une autre population. En 1985, le groupe de Hall a montré que l'état de tolérance allogénique pouvait être transféré à des receveurs naïfs par l'injection de cellules T CD4⁺ dérivant d'animaux tolérants (Hall et al. 1985), fournissant ainsi la première démonstration du caractère actif de la suppression.

La suppression est réalisée par des cellules régulatrices. De nombreuses populations de cellules régulatrices ont été décrites, certaines présentes de façon naturelle dans l'organisme et d'autres pouvant être induites dans des conditions de stimulations particulières. Les principales cellules régulatrices décrites sont des cellules T CD4⁺, mais les cellules régulatrices ont également été décrites dans la population T CD8⁺ et dans d'autres types cellulaires, comme les cellules NKT et les cellules T double négatives (Zhang et al. 2000; Jameson et al. 2003; Van Kaer 2004). De plus, les cellules dendritiques sont fortement impliquées dans la tolérance et dans l'induction de ces cellules régulatrices.

III. Les cellules T régulatrices

Le concept de cellules T régulatrices (Treg), capables d'inhiber une réponse immunitaire, est apparu dans les années 1970. Le groupe de Gershon et Kondo a, en effet, montré que certains lymphocytes T, différents des lymphocytes "helpers", pouvaient diminuer l'intensité de la réponse immune (Gershon and Kondo 1970; Gershon and Kondo 1971). De plus, le concept a été renforcé par des études montrant que le transfert de cellules T autologues issues de souris naïves, était capable de prévenir le développement de maladies auto-immunes, telles que la thyroïdite (Penhale et al. 1976), l'oophorite (Sakaguchi et al. 1982) ou le diabète (Boitard et al. 1989). 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, et la contestation de l'existence de cellules T suppressives (Green and Webb 1993).

Dans le milieu des années 90, les travaux de Sakaguchi et de ses collaborateurs ont donné un regain d'intérêt à ce concept, en décrivant 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'IL2 (CD25), qui étaient cruciales pour le contrôle des cellules T *in vivo* (Sakaguchi et al. 1995; Asano et al. 1996).

1. Les cellules T régulatrices naturelles

Les cellules Treg naturelles sont présentes de façon naturelle chez les individus sains.

1.1. Les cellules T CD4⁺CD25⁺

Les cellules T régulatrices naturelles CD4⁺CD25⁺ sont produites dans le thymus lors de la sélection thymique. En effet, il a été montré que l'ablation du thymus chez une

souris âgée de 3 jours induit l'élimination des cellules T CD25⁺ de la périphérie et provoque le développement de maladies auto-immunes variées pouvant être prévenues par le co-transfert de cellules T CD25⁺ de la rate (Suri-Payer et al. 1998).

En plus du CD25 (aussi exprimé par les lymphocytes T activés mais à un moindre niveau), ces cellules expriment constitutivement le CD152 (CTLA-4) (Takahashi et al. 2000), GITR (Shimizu et al. 2002), CD103 ($\alpha\beta$ integrine) (Curotto de Lafaille and Lafaille 2002), CD62L (Szanya et al. 2002) ou CD223 (LAG3) (Huang et al. 2004). Cependant, le seul marqueur à être spécifiquement exprimé par les Treg CD4⁺CD25⁺ chez le rat et la souris, reste le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3). Des études récentes ont montré que les lymphocytes activés humains pouvaient aussi exprimer Foxp3 (Morgan et al. 2005; Ziegler 2007). Chez l'homme, le récepteur à l'IL-7, CD127, permet de discriminer au sein des cellules T CD4⁺CD25⁺, les cellules activées (CD127^{hi}) des cellules régulatrices (CD127^{lo}) (Liu et al. 2006). Foxp3 est un nouveau membre de la famille des régulateurs transcriptionnels forkhead/winged helix qui a été récemment identifié comme un gène majeur pour le contrôle du développement et de la fonction des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). Le rôle spécifique de Foxp3 a été révélé chez la souris Scurfy qui développe une maladie auto-immune lymphoproliférative médiée par les lymphocytes T CD4⁺, suite à une mutation du gène Foxp3 conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée (Brunkow et al. 2001). Des mutations du gène Foxp3 chez l'homme ont été identifiées chez des patients atteints de syndrome fatal sévère auto-immun allergique, appelé IPEX (Bennett et al. 2001; Wildin et al. 2001). De plus, des études ont montré que l'expression ectopique de Foxp3 dans les cellules CD4⁺CD25⁻ leur confère un phénotype et une activité suppressive. En effet, les cellules CD25⁻ transduites avec un rétrovirus contenant Foxp3 prolifèrent peu en réponse à une stimulation du TCR, produisent peu de cytokines et expriment plus de GITR, CTLA-4 et CD103 (Hori et al. 2003).

Elles existent naturellement en périphérie, où elles représentent 5 à 10% des cellules T CD4⁺. Leur rôle principal semble être le contrôle de l'activation et/ou de l'expansion de cellules T autoréactives ayant échappées à la sélection thymique, et potentiellement responsables du développement de maladies auto-immunes. Ces cellules sont présentes principalement dans les ganglions lymphatiques empêchant le développement de réponses auto-immunes (Samy et al. 2005). Elles ont la capacité de migrer dans les sites d'inflammation (Belkaid et al. 2002). L'IL2 est essentielle à la prolifération physiologique des cellules CD4⁺CD25⁺ en périphérie. Elle est également requise pour leur activation *in vivo* et *in vitro*, et pour le maintien de l'expression de CD25 et de Foxp3 (Furtado et al. 2002; Thornton et al. 2004). Ces cellules peuvent produire du TGF β et

leur capacité suppressive est dépendante de cette cytokine (Du et al. 2006; Oida et al. 2006). Une fois activées par leur TCR, elles sont capables d'inhiber la prolifération et la production de cytokines des cellules T effectrices (Thornton and Shevach 2000).

Depuis quelques années, des études ont décrit une relation réciproque entre la différenciation en cellules pathogéniques Th17 et cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. En effet, il a été montré *in vitro* que les cellules Treg étaient une source de TGFβ pour le développement des Th17 (Veldhoen et al. 2006). Récemment, deux équipes ont montré que l'IL6 induit les cellules Treg naturelles à devenir des cellules Th17 de façon TGFβ dépendante alors que les cellules Treg induites sont résistantes à la conversion en Th17 par l'IL6 (Xu et al. 2007; Zheng et al. 2008). Cette nouvelle notion de "plasticité" des cellules Treg suggère que selon l'environnement cytokinique, les cellules Treg peuvent exprimer le facteur de transcription Foxp3 et sécréter de l'IL17. Cette conversion des cellules Treg en Th17 pourrait entraîner des conséquences néfastes en clinique. En effet, le traitement de maladies autoimmunes par l'administration de cellules Treg peut, par leur conversion en cellules productrices d'IL17, aboutir à l'augmentation plutôt qu'à la diminution de l'inflammation. Cependant, cela ne semble pas être le cas dans une étude récente montrant que les cellules Treg peuvent empêcher l'apparition d'une colite induite par le transfert de cellules naïves CD4⁺CD45RB^{hi} (Uhlir et al. 2006).

1.2. Les cellules T CD8⁺CD45RC^{low}

Très récemment, les travaux de Saoudi et al. ont démontré chez le rat pour la première fois, l'existence d'une sous-population de lymphocytes T CD8⁺ avec des capacités régulatrices (Xystrakis et al. 2004). L'expression de CD45RC a permis de distinguer 2 types de sous-population chez le rat: CD45RC^{hi} et CD45RC^{lo}. Ils ont démontré que les cellules T CD8⁺CD45RC^{lo} fraîchement isolées ont des propriétés régulatrices, ne sont pas cytotoxiques, produisent des cytokines de type Th2 (IL4, IL10 et IL13), expriment sélectivement Foxp3 et CTLA-4 et inhibent les réponses immunitaires alloréactives à la fois *in vivo* et *in vitro*. Les fonctions régulatrices et les mécanismes d'action de ces cellules sont liés à une inhibition de l'expansion des cellules effectrices CD4⁺ Th1. De plus, cette régulation requiert des contacts cellulaires et non une action dépendante des cytokines (Xystrakis et al. 2004). L'activité régulatrice de ces cellules a été confirmée *in vivo* dans un modèle de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Xystrakis et al. 2004) mais aussi dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Guillonnet et al. 2007).

En 2003, Cosmi et al. ont caractérisé une population de thymocytes CD8⁺CD25⁺ présente chez l'homme. Ces cellules ont un phénotype, des caractéristiques fonctionnelles et un mécanisme d'action équivalent aux Treg CD4⁺CD25⁺ (Cosmi et al. 2003).

2. Les cellules T régulatrices induites

Par opposition aux cellules Treg naturelles, des cellules T dont l'activité régulatrice est induite, ou acquise, ont été identifiées. Ces cellules, appelées Treg induites, sont générées après stimulation en périphérie par un antigène du non-soi.

2.1. Les cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Il a été démontré que des cellules régulatrices ayant le même phénotype et les mêmes propriétés que les Treg CD4⁺CD25⁺ naturelles pouvaient être générées en périphérie par différents mécanismes (Shevach 2006). De nombreuses études ont montré que le TGFβ pouvaient induire la conversion de cellules T CD4⁺CD25⁻ en cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ *in vitro* et *in vivo* (Yamagiwa et al. 2001; Fantini et al. 2004). Des études ont aussi suggéré que certains protocoles d'induction de tolérance à une allogreffe *in vivo* pouvaient induire des cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (induction dépendante du TGFβ) (Cobbold et al. 2004; Ochando et al. 2006).

2.2. Les cellules Tr1

Les cellules Tr1 ont été décrites par le groupe de M.G. Roncarolo. En effet, ils ont montré que des cellules T CD4⁺ murines activées en présence d'IL10 se différencient en cellules régulatrices produisant de forts taux d'IL10, capables d'inhiber la colite autoimmune (Groux et al. 1997). Les cellules Tr1 sont caractérisées par un profil de sécrétion de cytokines particulier, différent des profils Th1 et Th2 : les cellules Tr1 produisent de grandes quantités d'IL10, d'IL5, du TGFβ, de l'IFNγ, et de faibles quantités d'IL4 et d'IL2 (Groux et al. 1997). Il est également possible de générer ces cellules à partir de cellules T CD4⁺ humaines, en utilisant de l'IFNα en combinaison avec de l'IL10 (Levings et al. 2001). L'IL10 est une cytokine cruciale pour les cellules Tr1, à la fois pour leur génération et pour leur fonction. L'ajout d'anticorps anti-IL10 bloque l'activité suppressive de ces cellules (Groux et al. 1997).

2.3. Les cellules Th3

Les cellules Treg induites Th3 ont été découvertes chez des souris protégées du développement de l'EAE (Encéphalite Allergique Expérimentale) par administration orale de

la protéine basique de la myéline (MBP) (Chen et al. 1994). Elles sont caractérisées par leur forte production de TGF β , leur faible production d'IL10 et d'IL4 et leur absence de sécrétion d'IFN γ et d'IL2 (Chen et al. 1994; Fukaura et al. 1996). La différenciation des cellules Th3 est favorisée *in vitro* en présence d'IL4, IL10 et TGF β et est inhibée par l'IL12 (Weiner 2001). Les cellules Th3 sont capables *in vitro* de réguler les cellules Th1 et Th2 de manière non spécifique de l'antigène via la sécrétion de TGF β et favorisent la production d'IgA par les cellules B (Weiner 2001). Plus récemment, le groupe de Weiner a démontré que ces cellules avaient la capacité d'induire la différenciation de cellules T en cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Carrier et al. 2007).

2.4. Les cellules T CD8⁺CD28⁻

Une population de cellules Treg CD8⁺CD28⁻ spécifiques d'antigène a été décrite chez l'homme par le groupe de N. Suci-Foca. Ces cellules peuvent être générées *in vitro* à partir de cellules du sang (PBMC) stimulées de façon répétée par des cellules présentatrices d'antigène allogéniques (Liu et al. 1998), xénogéniques (Ciubotariu et al. 1998; Colovai et al. 2000), ou syngéniques pulsées avec des peptides synthétiques (Jiang et al. 1998). Ces cellules sont capables d'induire la surexpression des récepteurs inhibiteurs ILT-3 et ILT-4 dans des monocytes, des cellules endothéliales et dendritiques, rendant ces CPA tolérogènes et incapables de stimuler des cellules T CD4⁺ alloréactives (Manavalan et al. 2004). Des cellules CD8⁺CD28⁻ ont été retrouvées en grandes proportions chez des patients greffés rénaux, hépatiques ou cardiaques, ne présentant pas de signe de rejet, par comparaison avec des individus sains (Cortesini et al. 2002; Colovai et al. 2003). Contrairement aux cellules Tr1 et Th3, pour lesquelles l'activité suppressive est fortement dépendante de la production de cytokines suppressives, les cellules T CD8⁺CD28⁻ agissent principalement par contact cellulaire avec la cellule présentatrice d'antigène. Ces cellules ont été décrites comme prévenant le rejet aigu mais pas chronique du greffon dans un modèle de greffe de foie chez le rat (Liu et al. 2007).

2.5. Les cellules T CD3⁺CD4⁻CD8⁻

Les cellules T régulatrices double négative TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺NK1.1⁻CD4⁻CD8⁻ (DN) matures représentent 1 à 5% des lymphocytes T périphériques chez l'homme (Fischer et al. 2005) et 1 à 3% chez les rongeurs (Zhang et al. 2000). Elles n'expriment pas de CD4, de CD8 ou de CD28 (Zhang et al. 2000) mais expriment des marqueurs d'activation tels que le CD25, CD69 ou Foxp3 (Chen et al. 2004). Ces cellules sont caractérisées par leur forte production d'IFN γ et de TNF α et leur absence de sécrétion d'IL4, IL10, IL13 et IL2 (Zhang et al. 2000). Afin d'exercer leurs propriétés régulatrices, les cellules T DN ont besoin d'une

stimulation par le TCR, un contact direct avec les cellules cibles (Young et al. 2003), ainsi que la présence de cytokines telles que l'IL2 et l'IL4 (Zhang et al. 2000). Il a été décrit que les cellules T DN exercent une inhibition spécifique de l'antigène suite à l'expression en surface des complexes CMH-peptides des CPA par un mécanisme d'échange de fragments de membrane plasmique lors de la synapse immunologique, appelé trogocytose (Ford McIntyre et al. 2008). Il a été montré que les cellules T DN peuvent tuer les cellules T CD8⁺ et CD4⁺ par l'interaction Fas/FasL (Ford et al. 2002) ou par inhibition de leur production IL2 (Chen et al. 2003b; Chen et al. 2005) De plus, il a été décrit que ces cellules étaient plus résistantes à l'apoptose par la diminution de l'expression du récepteur Fas ainsi que par la surexpression de gènes de survie tels que Bcl-xL et Bcl-2 (Khan et al. 1999).

In vivo, il a été montré que les cellules T DN contribuaient au maintien de la tolérance immunologique (Priatel et al. 2001), de la prévention du rejet de greffe (Zhang et al. 2000) et de la GVHD (Young et al. 2003) dans de nombreux modèles animaux. En transplantation, les cellules T DN prolongent la survie d'allogreffe de peau (Zhang et al. 2000) et de cœur (Chen et al. 2003b) ainsi que la survie de xénogreffe (Chen et al. 2003a).

2.6. Les cellules NKT

Les cellules NKT sont une population de cellules avec un répertoire restreint exprimant à la fois les récepteurs de cellules NK, comme le CD161 ou NKR1p et le TCR $\alpha\beta$. Les cellules NKT reconnaissent et tuent les cellules tumorales exprimant des antigènes lipidiques sur les molécules du CMH de classe Ib CD1d (Bendelac et al. 1997). Elles possèdent donc une activité cytotoxique et sécrètent de grandes quantités de cytokines, dont l'IL4, l'IFN γ , le TGF β et l'IL10 (Bendelac et al. 1997). Les cellules NKT ont été montrées comme étant impliquées dans la régulation de maladies autoimmunes telles que le diabète (Frey and Rao 1999) et dans l'acceptation d'allogreffe dans différents modèles de greffe cardiaque (Seino et al. 2001; Higuchi et al. 2002).

3. Les mécanismes de suppression

Le ou les mécanismes moléculaires précis par lequel les cellules régulatrices inhibent l'activation et la prolifération d'autres cellules T sont souvent controversés et sont actuellement en cours d'investigation. Plusieurs mécanismes ont, à l'heure actuelle, été décrits : la suppression par l'intermédiaire de cytokines, la suppression par interaction directe entre la cellule régulatrice et les cellules effectrices, la lyse des cellules effectrices et enfin la modulation des CPA (**Figure 7**) (Vignali et al. 2008).

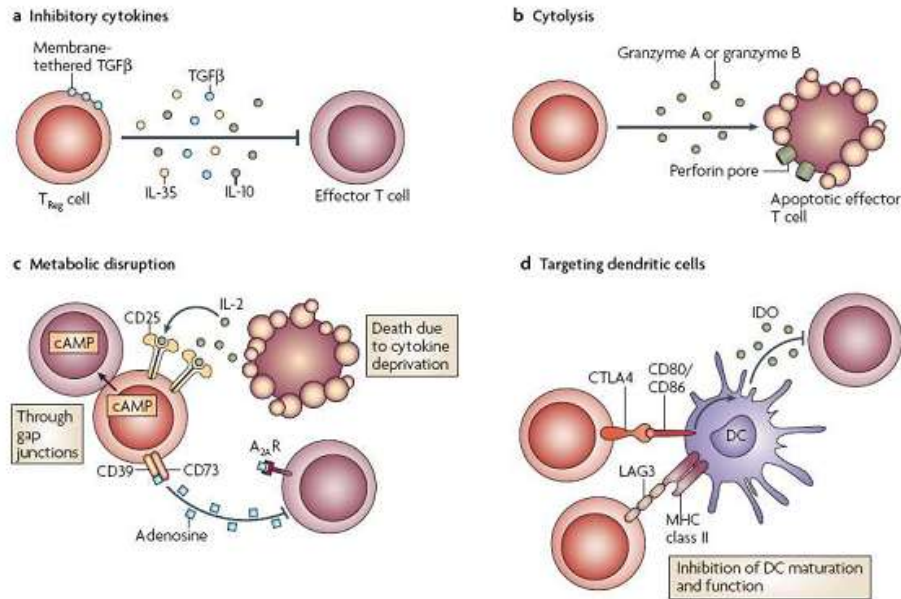


Figure 7 : Les différents mécanismes de suppression des Treg.

D'après Vignali et al. (Vignali et al. 2008).

3.1. Les cytokines suppressives

Les deux cytokines principales décrites comme ayant des propriétés immunosuppressives sont l'IL10 et le TGF β (**Figure 7a**) (Vignali et al. 2008). Cependant, récemment une autre cytokine a été découverte ayant les mêmes capacités régulatrices : IL35.

3.1.1. L'IL35

IL35 est une cytokine de la famille de l'IL12 qui est formée de 2 sous chaînes, l'EBI3 et l'IL12p35. L'IL35 a été montrée comme étant nécessaire aux cellules T régulatrices pour avoir une activité suppressive maximale. De plus, l'IL35 est suffisante pour supprimer la prolifération des lymphocytes T effecteurs *in vitro* (Collison et al. 2007). De façon intéressante, l'IL35 inhibe la différenciation des cellules T CD4⁺ de type Th17 et atténue la sévérité de l'arthrite dans un modèle murin en diminuant la production d'IL17 (Niedbala et al. 2007). Contrairement aux résultats obtenus chez la souris, une récente étude a montré que les cellules Treg humaines n'exprimeraient pas l'IL35 de façon constitutive (Bardel et al. 2008).

3.1.2. L'IL10

Le rôle de l'IL10, sécrétée par les cellules Treg, a été montrée dans de nombreux modèles de tolérance à une allogreffe ou dans différents types de maladies autoimmunes (Asseman et al. 1999; Suri-Payer and Cantor 2001). A contrario, une étude récente a montré que la délétion spécifique de la production d'IL10 par les cellules Treg ne provoquait pas l'apparition de maladies autoimmunes systémique (Malleo et al. 2008). Cependant, cette délétion pouvait entraîner des pathologies du colon et du poumon plus importantes chez la souris. Ces résultats récents suggèrent que l'IL10 sécrétée par les cellules Treg aurait un rôle plus important dans le contrôle des réponses inflammatoires vis-à-vis de pathogènes extracellulaires (Rubtsov et al. 2008). Cependant, cette cytokine a un rôle crucial dans la génération et la fonction des cellules T régulatrices de type Tr1 (Roncarolo et al. 2001). Son rôle dans la suppression médiée par les cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reste encore très controversé.

3.1.3. Le TGFβ

Tout comme pour l'IL10, la contribution du TGFβ à la suppression par les cellules Treg est controversée. Le rôle du TGFβ dans le contrôle de la colite chez la souris a été fermement établi. En effet, le contrôle de la colite par les cellules CD4⁺CD45RC^{lo} ou CD4⁺CD25⁺ est totalement abrogé lorsque les souris sont traitées avec un anticorps anti-TGFβ (Powrie et al. 1996; Liu et al. 2003). De plus, dans le modèle de protection du diabète chez la souris NOD par traitement avec un anti-CD3, l'administration d'un anticorps anti-TGFβ abroge la protection (Belghith et al. 2003). Cependant, ces études ne permettent pas de déterminer si la signalisation par le TGFβ implique les cellules Treg ou les cellules répondeuses.

Certaines études ont suggéré que les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ activées exprimaient à leur surface une forme membranaire du TGFβ, et qu'elles pourraient ainsi délivrer du TGFβ aux cellules répondeuses directement par contact cellulaire (Nakamura et al. 2001). A l'inverse, Piccirillo et al. ont montré que le TGFβ n'était pas requis pour la fonction suppressive *in vitro*. En effet, ni la neutralisation du TGFβ par un anticorps monoclonal ou une forme soluble du récepteur au TGFβ (TGF-βRII-Fc), ni l'utilisation de cellules répondeuses insensibles au TGFβ (déficientes pour Smad3 ou exprimant un récepteur au TGFβ de type II dominant négatif) ne bloque la fonction suppressive des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ *in vitro* (Piccirillo et al. 2002).

Cependant, *in vivo*, la signalisation par le TGFβ dans les cellules répondeuses semble être essentielle à leur contrôle par les cellules Treg. Dans un modèle de diabète de type 1 médié par les cellules T CD8⁺ chez la souris, l'expression d'un récepteur au TGFβ

fonctionnel sur les cellules T CD8⁺ anti-îlots est essentielle au contrôle par les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ (Green et al. 2003). De même, l'équipe de Powrie a montré récemment dans un modèle de colite, que les cellules effectrices CD45RC^{hi} insensibles au TGFβ échappent au contrôle par les Treg CD4⁺CD25⁺ *in vivo* (Fahlen et al. 2005). Dans cette étude, les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ issues de souris déficientes pour le TGFβ sont capables de contrôler la colite, mais la suppression est inhibée par un anticorps anti-TGFβ. Pris collectivement, ces résultats suggèrent que la production de TGFβ par des cellules autres que les Treg (par exemple les CPA ou les cellules T) semble être impliquée dans la régulation.

En résumé, l'importance de l'IL10 et le TGFβ a été démontré dans la suppression exercée par les cellules Tr1 et Th3 respectivement (Roncarolo et al. 2001; Weiner 2001). Les cellules Treg naturelles ont depuis longtemps été décrits comme exerçant leur fonction suppressive par contact cellulaire et non par l'intermédiaire de cytokines (Takahashi et al. 1998; Thornton and Shevach 1998). Cependant, un rôle de ces cytokines ne peut être totalement exclu (Vignali et al. 2008).

3.2. La suppression par contact cellulaire

Certaines études suggèrent que la suppression pourrait être exercée par une interaction directe entre la cellule Treg et la cellule T effectrice (**Figure 7c**), notamment par l'intermédiaire de CTLA-4.

La molécule CTLA-4 est connue pour être un important régulateur négatif de la fonction T, mais il a également été impliqué dans les mécanismes d'action des cellules régulatrices. Contrairement aux cellules T naïves, les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ expriment constitutivement la molécule CTLA-4. Le blocage de CTLA-4 par l'administration d'un anticorps anti-CTLA-4 bloquant induit chez la souris naïves des maladies auto-immunes similaires à celles produites lors de la déplétion des cellules T CD4⁺CD25⁺ et ce sans réduire leur nombre (Takahashi et al. 2000). Les ligands de CTLA-4 sont les molécules B7, connues pour être exprimées par les cellules présentatrices d'antigène, mais également par les cellules T activées. Ces molécules sont essentielles pour la suppression exercée par les Treg, car leur absence sur les cellules T effectrices réduit leur susceptibilité à être contrôlées par les cellules T CD4⁺CD25⁺ (Paust et al. 2004).

3.3. La cytotoxicité des Treg

Des données récentes suggèrent que l'un des mécanismes d'actions des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ pourrait être la lyse des cellules cibles par cytotoxicité (**Figure 7b**). En effet, une activité cytotoxique importante a été constatée dans des modèles d'induction de

tolérance, ce qui démontre qu'elle n'est pas toujours associée au rejet (Armstrong et al. 1987; Bugeon et al. 1993; Heslan et al. 2006). De plus, des animaux déficients pour les perforines ou pour Fas sont capables de rejeter une allogreffe (Selvaggi et al. 1996), ce qui montre que l'activité cytotoxique n'est pas forcément associée et nécessaire au rejet de greffe.

Plusieurs mécanismes de cytotoxicité ont été impliqués : la voie Fas/FasL (Watanabe et al. 2002) ou la voie granzyme/perforine. Certaines études montrent un rôle pour granzyme-A et la perforine (Grossman et al. 2004a; Grossman et al. 2004b) et d'autres sont en faveur d'un mécanisme dépendant de granzyme-B, et indépendant de la perforine (Gondek et al. 2005). La voie Fas/FasL est aussi utilisée par les cellules T régulatrices double négative (Ford et al. 2002). En revanche, ni les cellules Treg $CD8^+CD45RC^{lo}$, ni les cellules $CD8^+CD28^-$ ne semblent utiliser la cytotoxicité pour exercer leur activité régulatrice (Liu et al. 1998; Xystrakis et al. 2004).

3.4. La modulation des cellules dendritiques

En plus de l'effet direct des cellules Treg sur la fonction des cellules T effectrices, ces cellules peuvent aussi interagir et moduler la maturation des cellules dendritiques (**Figure 7d**) (Tadokoro et al. 2006). Une telle modulation de la cellule dendritique peut impliquer divers mécanismes, tels que la diminution de l'expression des molécules du CMH et de costimulation (Cederbom et al. 2000) ou encore l'induction de molécules inhibitrices telles que B7-H4 (Kryczek et al. 2006). Nous avons vu précédemment que l'interaction CTLA-4/B7 a été impliquée dans un mécanisme de suppression par contact direct avec les cellules T effectrices. CTLA-4 peut également se lier aux molécules B7 sur les cellules dendritiques. Il a été montré que cette interaction induisait l'expression, dans les cellules dendritiques, de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), une molécule régulatrice intervenant dans le métabolisme du tryptophane (Fallarino et al. 2003; Mellor and Munn 2004). L'interaction de LAG-3 (exprimé par les Treg) avec les molécules du CMH de classe II (présents sur les DCs) a récemment été montrée comme induisant le blocage de la maturation des DCs (Liang et al. 2008).

IV. Les cellules dendritiques tolérogènes

Les cellules dendritiques sont des régulateurs clés du devenir de la réponse immunitaire, capables à la fois d'induire ou d'inhiber les réponses T selon les circonstances. L'état de maturation des cellules dendritiques n'est pas le seul critère déterminant la réponse

immunitaire. En effet, la décision d'induire l'immunité ou la tolérance résulte de l'intégration complexe de différents signaux par les cellules dendritiques.

1. La terminologie des cellules dendritiques tolérogènes

Il a été montré à de nombreuses reprises que les cellules dendritiques immatures auraient des propriétés tolérogènes. Elles pourraient aussi permettre le contrôle, en périphérie, des lymphocytes T autoréactifs qui ont échappés à la sélection négative lors de leur développement dans le thymus (Steinman and Nussenzweig 2002; Steinman et al. 2003). Un nouveau concept est alors apparu, la fonction des cellules dendritiques serait dépendante de leur état de maturation. En effet, le groupe de Nussenzweig et Steinman a démontré que des protéines de fusion ciblées vers les cellules dendritiques immatures menaient à l'induction de tolérance spécifique d'antigène (Bonifaz et al. 2002). Cependant, la maturation des cellules dendritiques ainsi que la forte expression des molécules de costimulation ont été montrés comme nécessaires pour l'induction de la tolérance dans certains modèles (Albert et al. 2001; Menges et al. 2002). Il a donc été proposé un état de maturation intermédiaire "semi-mature" pouvant être induit par différents stimuli comme le TNF α (Lutz and Schuler 2002; Menges et al. 2002). Cependant, les cellules dendritiques matures peuvent également induire la tolérance périphérique en induisant l'expansion clonale des cellules Treg naturelles (Yamazaki et al. 2003). A l'heure actuelle, les marqueurs de la maturation ne permettent donc pas de différencier la fonction des cellules dendritiques et leurs fonctions restent donc le seul moyen de les différencier (Reis e Sousa 2006).

2. Les mécanismes d'actions des cellules dendritiques tolérogènes

De nombreuses études suggèrent qu'en l'absence de maturation, les cellules dendritiques capturent des antigènes et migrent des tissus vers les ganglions sous la forme de cellules dendritiques immatures ou semi-mature. Elles vont alors induire la tolérance envers ces antigènes en entraînant l'anergie ou la délétion clonale des lymphocytes T réactifs (Steinman et al. 2003). De plus, une étude a montré que l'apport ciblé d'antigènes (grâce à une protéine, couplée à un anticorps anti-CD205, un récepteur d'endocytose) aux cellules dendritiques, en absence de danger, induit la prolifération des cellules T qui sont ensuite déléetées. Les souris traitées avec cette protéine couplée à l'anticorps sont incapables de répondre à une restimulation. Par ailleurs, ils ont montré que la maturation des cellules dendritiques par le CD40 dans les mêmes conditions induisait une forte prolifération des cellules T ainsi que la production d'IL2 et d'IFN γ (Bonifaz et al. 2002).

Les cellules dendritiques peuvent aussi induire la tolérance en entraînant la conversion de cellules T naïves ou le maintien et/ou la prolifération de cellules Treg. Les

cellules dendritiques immatures ont été décrites comme pouvant induire des cellules T régulatrices spécifiques de peptides exogènes (Dhodapkar et al. 2001; Dhodapkar and Steinman 2002) ou des cellules Treg CD4⁺ spécifiques d'alloantigènes (Jonuleit et al. 2000; Levings et al. 2005). Un sous-type spécifique de cellules dendritiques chez la souris a été identifiée comme ayant la capacité d'induire des cellules Tr1 (Wakkach et al. 2003). Dans cette étude, Wakkach et al. ont montré qu'il était possible de générer à partir de la moelle osseuse des cellules dendritiques CD11c^{lo}CD45RB⁺, en présence d'IL10 et de TNF α induisant la différenciation de cellules T naïves en lymphocytes Tr1. Les mêmes capacités d'induction de cellules Treg productrices d'IL10 ont été décrites pour les cellules dendritiques matures (Verhasselt et al. 2004; Lundqvist et al. 2005). De plus, Yamazaki et al., ainsi que d'autres groupes, ont montré que les cellules dendritiques matures avaient la capacité d'expandre les cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Yamazaki et al. 2003; Kretschmer et al. 2005; Banerjee et al. 2006). Plus récemment, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) ont été décrites comme possédant la capacité d'induire des cellules Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Ochando et al. 2006). Dans cette étude, Ochando et al. ont montré, dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris, que les cellules dendritiques plasmacytoïdes du receveur capturent et apprêtent les alloantigènes dans le greffon et migrent ensuite dans les ganglions lymphatiques périphériques. Dans les ganglions lymphatiques, ces pDC présentent les alloantigènes aux cellules T et induisent la génération de cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ spécifiques des alloantigènes. De plus, une équipe de notre laboratoire a montré, chez le rat, que les pDC matures sont les seules cellules dendritiques matures à pouvoir expandre *in vitro* les cellules Treg CD4⁺CD25⁺. Ils ont montré que cette expansion nécessite un contact cellulaire entre les pDC et les Treg et est indépendante de l'IL2 (Ouabed et al. 2008). En 2008, Goubier et al. ont montré que les pDC induisent une tolérance orale en inhibant l'activation orale des cellules T. En effet, ils ont montré que les pDC semblent induire l'anergie ou la délétion des cellules T spécifiques d'antigènes dans le foie (Goubier et al. 2008).

Les cellules dendritiques ont aussi été montrées comme induisant la tolérance via l'expression de l'enzymeIDO (Munn et al. 2002; Mellor and Munn 2004).IDO est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane et a été décrite comme ayant la capacité d'inhiber la réponse des cellules T (Munn et al. 1998). Plus récemment, un nouveau mécanisme d'induction de tolérance périphérique par les cellules dendritiques a été décrit et implique l'induction de l'expression de CD5 par les lymphocytes T (Hawiger et al. 2004). Le CD5 conduit à une absence de prolifération des cellules T en réponse à une restimulation antigénique

3. L'induction d'une fonction tolérogène

De nombreux mécanismes peuvent conférer des propriétés tolérogènes aux cellules dendritiques (**Figure 8**). L'interaction des cellules dendritiques avec les lymphocytes Treg conduit à l'engagement du CTLA-4 porté par les cellules Treg avec les molécules B7 sur les cellules dendritiques. Cette liaison induit l'expression d'IDO qui confère aux cellules dendritiques des propriétés tolérogènes (Fallarino et al. 2003; Mellor et al. 2003). De plus, les cellules Treg $CD8^+CD28^-$ inhibent l'expression de molécules de costimulation (B7.1, B7.2 et CD40) et augmentent l'expression de récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 (Immunoglobulin Like Transcript) sur les cellules dendritiques (Chang et al. 2002). Ainsi, les cellules dendritiques $ILT3^{hi}$ et $ILT4^{hi}$ devenues tolérogènes induisent l'anergie des cellules T helper et stimulent la génération de nouvelles cellules Treg spécifiques des alloantigènes (Manavalan et al. 2003; Manavalan et al. 2004). Enfin, les cellules dendritiques peuvent acquérir des propriétés tolérogènes après culture *in vitro* en présence de facteurs tolérogènes tels que l'IL10, $TGF\beta$, vitamines D3 ou des corticostéroïdes (O'Neill et al. 2004).

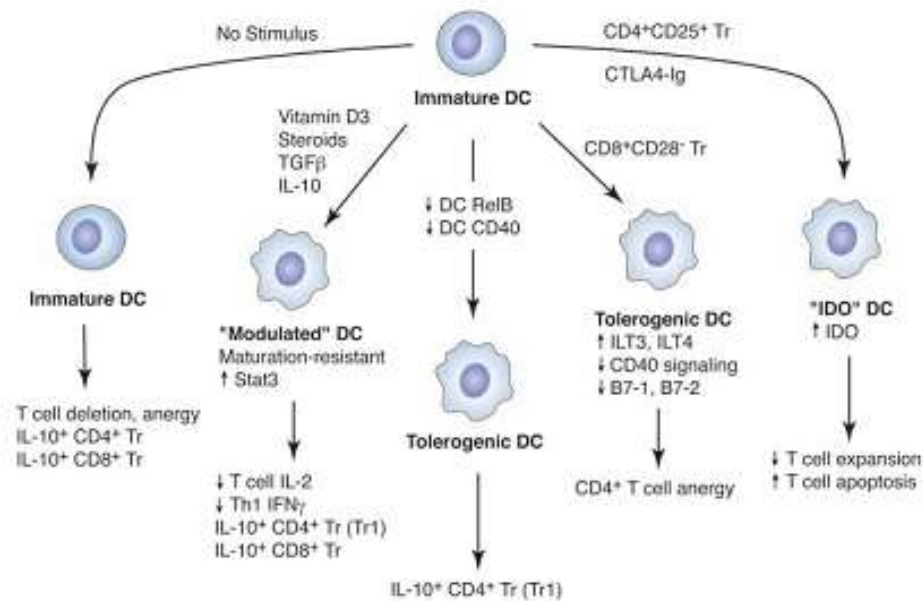


Figure 8 : Les différents mécanismes pouvant conférer des propriétés tolérogènes aux cellules dendritiques.

D'après O'Neill et al (O'Neill et al. 2004).

C. Futurs protocoles cliniques d'induction de tolérance en transplantation ?

A l'heure actuelle, les traitements immunosuppresseurs permettent d'améliorer le taux de réussite des greffes sans toutefois prévenir du développement du rejet chronique. Les recherches en transplantation ont donc pour but de développer de nouveaux protocoles permettant d'induire une tolérance à l'allogreffe. Parmi ces protocoles, la mise en place de traitement par thérapie cellulaire "tolérogène" est de plus en plus envisagée, basée sur deux populations leucocytaires, les cellules dendritiques et les cellules T régulatrices. En effet, nous avons vu que ces deux populations cellulaires pouvaient acquérir des propriétés tolérogènes.

Il a été montré chez la souris que le transfert de cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺, expandues *in vitro*, permettent d'induire une prolongation de survie d'allogreffe (Xia et al. 2008) et de prévenir de la GVHD (Trenado et al. 2006). Cependant, nous avons vu que selon l'environnement cytokinique, ces cellules Treg pouvaient se convertir en cellules effectrices Th17 (Xu et al. 2007). L'injection de ces cellules en association avec un immunosuppresseur permettraient de contrôler l'environnement cytokinique inflammatoire et ainsi empêcher leur conversion en Th17. Il a été montré que la rapamycine et l'anti-thymocyte globulin (ATG) permettent la suppression des cellules T effectrices sans interférer avec la fonction des cellules Treg. De plus, ces drogues permettent même *in vitro* d'induire et d'expandre les cellules Treg chez l'homme et la souris (Battaglia et al. 2006; Coenen et al. 2007; Ruzek et al. 2008). Par contre, des études, *in vivo et in vitro*, ont montré que la cyclosporine A, un inhibiteur de la calcineurine, qui est depuis longtemps utilisée en clinique, a des effets néfastes sur la génération et fonction des cellules Treg (Baan et al. 2005; Zeiser et al. 2006; Coenen et al. 2007). Ces résultats suggèrent que la cyclosporine A n'est peut être pas l'immunosuppresseur le plus adapté pour l'établissement d'une tolérance par ce type de thérapie cellulaire.

Les cellules dendritiques sont des cellules clés de la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative et ont été montré comme possédant des propriétés tolérogènes, c'est pourquoi ces cellules ont intéressées de nombreuses équipes pour la mise en place de protocoles de thérapie cellulaire. En effet, il a été montré chez le rongeur que l'injection, plusieurs jours avant la transplantation, de cellules dendritiques immatures tolérogènes permettait de prolonger significativement la survie d'allogreffe (Fu et al. 1997; Lu et al. 1997; Garrovillo et al. 2001). De plus, une étude chez l'homme a montré que l'injection

de cellules dendritiques immatures à des volontaires sains permettait d'inhiber la réponse immunitaire prouvant le pouvoir thérapeutique de ces cellules (Dhodapkar et al. 2001). Cependant, les cellules dendritiques, une fois injectées, risquent de murer en réponse aux signaux de danger ou à d'autres facteurs proinflammatoires. L'association des cellules dendritiques avec un traitement immunosuppresseur, par exemple la rapamycine, pourrait permettre de contrôler l'environnement inflammatoire mais aussi la maturation des cellules. En effet, la rapamycine a été décrite comme inhibant la maturation des cellules dendritiques chez la souris (Hackstein et al. 2003).

L'injection de ces deux types de cellules seules en association avec un traitement immunosuppresseur pourrait avoir des effets bénéfiques. Cependant, l'administration combinée des cellules Treg et des cellules dendritiques pourrait être encore plus avantageux en permettant la diminution du temps de traitement immunosuppresseur. En effet, les cellules dendritiques pourraient être maintenues dans un état tolérogène par l'immunosuppresseur, permettant ainsi l'induction de cellules Treg qui en retour pourraient être impliquées dans le maintien des propriétés tolérogènes des cellules dendritiques. Une telle boucle de régulation entre les cellules dendritiques tolérogènes et les cellules treg a été décrite dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris (Min et al. 2003a). Les auteurs ont montré d'une part que les cellules T naïves, cultivées *in vitro* avec des cellules dendritiques tolérogènes issues des souris tolérantes, possèdent un pourcentage augmenté de cellules T CD4⁺CD25⁺ et sont capables d'inhiber une MLR naïve. D'autre part, ils ont aussi montré que les cellules dendritiques naïves générées *in vitro* en présence de cellules T CD4⁺ issues de souris tolérantes, possèdent un phénotype immature ainsi qu'une faible capacité stimulatrice.

Ce travail de thèse a donc contribué à l'étude des mécanismes régulateurs ainsi qu'à la caractérisation de nouveaux médiateurs de la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. Dans un futur prochain, ces nouvelles molécules pourraient être utilisées comme outils diagnostics mais aussi dans des protocoles de thérapie cellulaire en clinique dans le domaine de la transplantation, mais aussi dans les domaines de l'autoimmunité et de la cancérologie.

RESULTATS

A. Modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque par traitement avec le LF15-0195

I. Induction de tolérance par traitement avec le LF15-0195

L'induction d'une tolérance demeure un objectif primordial en transplantation. Les traitements immunosuppresseurs utilisés sont généralement administrés à vie. Ces traitements ont pour effet de déprimer à long terme le système immunitaire du receveur et entraînent des complications chez les patients (infections chroniques, tumeurs...). Il est donc nécessaire d'identifier de nouveaux médiateurs de la tolérance qui pourraient servir d'outils thérapeutiques pour induire la tolérance.

1. Le modèle de greffe

Le modèle animal d'allogreffe cardiaque étudié dans ce travail utilise des souches de rats congéniques de fond génétique Lewis. Le donneur d'organe est d'haplotype RT1u (souche LEW.1W) et le receveur d'haplotype RT1a (souche LEW.1A). RT1 est le système du CMH chez le rat (Gill et al. 1987). Du fait que le donneur et le receveur partagent le même fond génétique Lewis, les mécanismes immunologiques mis en jeu dans cette combinaison sont donc entièrement dépendants de l'histocompatibilité du CMH de classe I et II.

Ce système constitue un modèle de rejet d'allogreffe lorsque les animaux receveurs ne sont pas traités. Dans cette combinaison LEW.1W sur LEW.1A, l'allogreffe cardiaque est rejetée en $6 \pm 0,6$ jours (**Figure 9**) (Souillou et al. 1984). Les donneurs et les receveurs sont toujours des mâles âgés de 8 à 12 semaines. La greffe de cœur est réalisée selon la technique décrite par Ono et Lindsey (Ono and Lyndsey 1968). Le greffon est placé chez le receveur en position hétérotopique intra-abdominale et transversale en dessous des pédicules rénaux. La durée de la greffe est d'environ 30 à 40 minutes. La position du greffon permet de surveiller son fonctionnement par palpation à travers la paroi abdominale. Une échelle arbitraire de battements est utilisée (0 à +++) et le rejet est défini par la cessation de battements.

L'équipe a montré, pour la première fois, qu'un court traitement quotidien pendant 20 jours à partir du jour de la greffe avec le LF15-0195, un analogue de la déoxyspergualine, injecté par voie intrapéritonéale à une dose de 3mg/kg, permet d'induire une tolérance à long terme dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Chiffolleau et al. 2002a) (**Figure 9**).

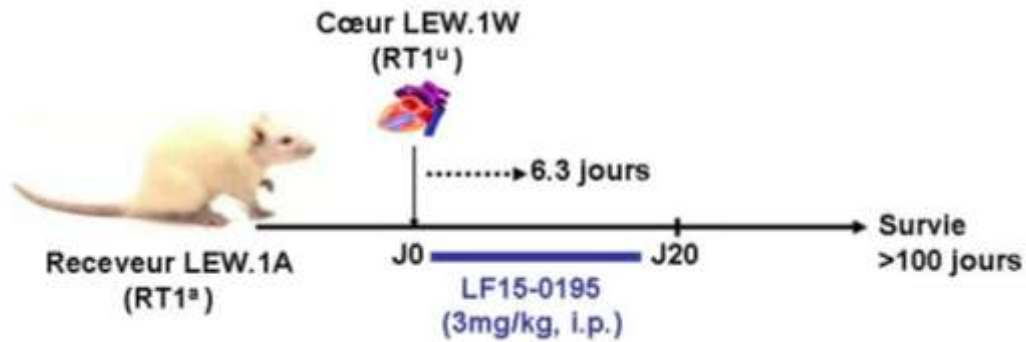


Figure 9. Modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque par traitement avec le LF15-0195.

Les receveurs LEW.1A reçoivent un cœur allogénique LEW.1W qui est sans traitement rejeté en 6,3 jours en moyenne. L'injection, par voie intrapéritonéale, d'un analogue de la déoxyspergualine, le LF15-0195, pendant 10 jours à partir du jour de la greffe à une dose de 3 mg/kg permet une survie à long terme du greffon sans signe de rejet chronique.

2. Le LF15-0195

Le LF15-0195 est un immunosuppresseur analogue à la déoxyspergualine (DSG), développé par les laboratoires Fournier (Daix, France), qui est plus stable que la DSG.

2.1. Les propriétés immunosuppressives

Avant l'utilisation du LF15-0195, la DSG a été utilisée dans de nombreux protocoles expérimentaux chez le rongeur. En effet, la DSG permettait d'induire une prolongation de survie d'allogreffe d'îlots du pancréas (Dickneite et al. 1986), de rein (Dickneite et al. 1986; Takeuchi et al. 1998), de cœur (Dickneite et al. 1986), mais aussi de peau (Nemoto et al. 1987). Elle a aussi prouvé son efficacité chez des animaux atteints de leucémies (Ito et al. 1986).

Les propriétés immunosuppressives du LF15-0195 ont quant à elles été tout d'abord caractérisées dans la prévention de la GVHD chez la souris (Lebreton et al. 1999). Après quoi, le LF15-0195 a prouvé son efficacité dans de nombreux modèles expérimentaux chez le rongeur : l'allotransplantation (Chiffolleau et al. 2002a; Min et al. 2003b; Zhou et al. 2003), la xénotransplantation (Wang et al. 2003), l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Duplan et al. 2006) et le syndrome néphrotique idiopathique (Le Berre et al. 2009). Après ces résultats encourageants chez le rongeur, le LF15-0195 a été testé dans un modèle préclinique chez le primate. Dans ce modèle, il a permis d'induire une prolongation de survie d'allogreffe rénale (Yang et al. 2003a).

2.2. Les mécanismes moléculaires

2.2.1. Interaction avec les protéines de choc thermique

Tout comme la DSG (Nadler et al. 1992), le LF15-0195 interagit avec Hsc70, le membre constitutif de la famille des protéines de choc thermique de 70kD (Komesli et al. 1999). Cette interaction avec Hsc70 pourrait représenter la première étape du mécanisme d'action du LF15-0195. Les protéines de choc thermique possèdent de nombreuses fonctions en plus de leur capacité à se lier à une grande variété de protéines et de peptides. Elles peuvent modifier la conformation de diverses protéines et peptides et faciliter leur translocation aux travers des organelles cellulaires (Rothman 1989; Gething and Sambrook 1992). Plusieurs études suggèrent que les protéines de choc thermique pourraient jouer un rôle dans la présentation antigénique par les molécules du CMH (Vanbuskirk et al. 1989; Srivastava et al. 1994).

2.2.2. Induction de la voie des caspases

Il a été montré que le LF15-0195 pouvait jouer un rôle dans la mort cellulaire des cellules T, en les sensibilisant à la mort cellulaire induite par l'activation (AICD) (Ducoroy et al. 2003). Les cellules T périphériques matures peuvent subir une apoptose "passive" si elles ne sont pas suffisamment stimulées par des facteurs de croissance. Elles peuvent également subir une forme unique de mort cellulaire appelée AICD, qui survient après des stimulations antigéniques répétées (Krammer 2000).

Le LF15-0195 ne semble pas avoir d'effet sur l'apoptose passive, mais il est capable de sensibiliser des cellules T à l'AICD par un mécanisme dépendant de Fas, et ce non seulement sur des lignées T humaines (Jurkat), mais également sur des cellules T périphériques humaines (Ducoroy et al. 2003).

Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans le modèle de GVHD. En effet, après greffe de moelle osseuse, il a été montré que le LF15-0195 induit l'apoptose des cellules T du donneur, par un mécanisme dépendant de Fas (Ducoroy et al. 2003). Ainsi, le LF15-0195 pourrait protéger contre la GVHD en inhibant l'expansion des cellules T allogéniques anti-receveur.

2.2.3. Inhibition de la voie NF- κ B

Tout comme pour la DSG (Tepper et al. 1995), le LF15-0195 inhibe la signalisation du facteur de transcription NF- κ B (Yang et al. 2003b). En effet, l'activité de NF- κ B est fortement régulée par des protéines inhibitrices spécifiques, les I κ B. Dans une cellule au repos, ces protéines se lient à NF- κ B et masquent la séquence de translocation nucléaire, entraînant ainsi la séquestration de NF- κ B dans le cytoplasme. L'activation de la cellule mène à la phosphorylation des protéines kinases des I κ B, les IKK, qui phosphorylent I κ B. Une fois phosphorylée, I κ B est rapidement ubiquitinylée et dégradée dans le protéasome, permettant ainsi la libération de NF- κ B, qui peut alors être transloqué dans le noyau. Une fois dans le noyau, NF- κ B interagit avec les sites KB situés dans les régions régulatrices de nombreux gènes et peut ainsi contrôler leur expression (Denk et al. 2000). L'action du LF15-0195 sur la voie de signalisation de NF- κ B se situe au niveau des protéines kinases I κ B : il inhibe leur phosphorylation par les I κ B kinases, bloquant ainsi l'activation et la translocation nucléaire de NF- κ B (Yang et al. 2003b). Il a été décrit chez la souris, que le LF15-0195 permettait l'induction de cellules dendritiques tolérogènes *in vitro* et *in vivo* en bloquant spécifiquement la voie de signalisation de NF- κ B (Min et al. 2003b).

3. Résultats préalablement acquis et objectifs de l'étude

L'équipe a montré que la tolérance à l'allogreffe cardiaque induite par le LF15-0195 est durable et spécifique. En effet, la greffe tolérée ne développe aucun signe de rejet chronique, même plus de 100 jours après la transplantation (Chiffolleau et al. 2002a). Lors d'une seconde greffe cardiaque, les receveurs tolérants acceptent une greffe cardiaque de même haplotype que la première greffe, mais rejettent une greffe de tierce partie. Ceci démontre que la tolérance induite par le LF15-0195 est spécifique du donneur (Chiffolleau et al. 2002a).

L'équipe a aussi observé que les animaux sous traitement sont fortement immunodéprimés. En effet, sous traitement, la réponse anticorps anti-donneur est totalement inhibée (Chiffolleau et al. 2002a) tandis qu'elle est partiellement restaurée 100 jours après la transplantation, avec une production préférentielle des IgG1 (Th2) au dépend des IgG2b (Th1) (Chiffolleau et al. 2002b). De plus, les animaux sous traitement présentent peu de cellules infiltrant la greffe (Chiffolleau et al. 2002a) alors que 100 jours après la greffe, un infiltrat important composé de macrophages et de lymphocytes a été observé (Heslan et al. 2006).

Ils ont aussi montré que les cellules T allospécifiques prolifèrent fortement contre les antigènes du donneur 5 jours après la greffe. Cependant, ces cellules T produisent moins

d'IFN γ tandis que la production d'IL10 et TGF β n'est pas modifiée (Chiffolleau et al. 2002a), ce qui démontre que la phase d'induction de la tolérance est caractérisée par une inhibition de la différenciation Th1. Au contraire, chez les animaux tolérants à long terme, les cellules T CD4 $^+$ de la rate prolifèrent peu contre les alloantigènes (Chiffolleau et al. 2002b), suggérant la déletion des cellules alloréactives par AICD et/ou l'induction de cellules Treg.

La présence de cellules T régulatrices a été mise en évidence par des expériences de transfert de tolérance à des receveurs irradiés. Ces cellules sont retrouvées parmi les cellules T CD4 $^+$ de la rate (Chiffolleau et al. 2002b) et les cellules infiltrant la greffe tolérée (Heslan et al. 2005). Une augmentation du pourcentage de cellules T CD4 $^+$ CD25 $^+$ dans la rate des animaux tolérants a été observée par comparaison à des receveurs non traités (Chiffolleau et al. 2002b). Ces cellules ont aussi été retrouvées en proportion importante dans les greffes tolérées (Heslan et al. 2005). Ils ont ensuite montré que ces cellules T CD4 $^+$ CD25 $^+$ exprimaient fortement l'ARNm du facteur de transcription Foxp3, à des niveaux comparables à ceux retrouvés dans les cellules Treg naturelles CD4 $^+$ CD25 $^+$ de rats naïfs (Heslan et al. 2005). Les cellules Treg induite par le LF15-0195 prolifèrent peu contre les antigènes du donneur et produisent peu de cytokines, comme l'IFN γ et l'IL10 et pas du tout d'IL2. De plus, ils ont montré que ces cellules Treg étaient spécifiques d'antigène. En effet, le transfert de 200x10 6 splénocytes de receveurs tolérants à des receveurs préalablement irradiés prévient le rejet d'une greffe de même haplotype que le rejet, mais n'empêche pas le rejet d'une greffe de tierce partie (Chiffolleau et al. 2002b). Les cellules T CD4 $^+$ CD25 $^+$ de la rate spécifiques d'antigènes sont plus puissantes que les cellules Treg naturelles, car le transfert de quantités équivalentes de cellules T CD4 $^+$ CD25 $^+$ d'un rat naïf (5x10 6) ne permet pas de prévenir le rejet de greffe (Chiffolleau et al. 2002b). De plus, nous avons pu transférer la tolérance avec 5x10 6 cellules T CD4 $^+$ CD25 $^+$ de la rate des receveurs tolérants, et avec seulement 0.75x10 6 cellules infiltrant la greffe (Heslan et al. 2005), ce qui montre que ces dernières sont plus efficaces. Ce résultat peut être interprété de deux façons : soit les cellules Treg présentes dans la greffe possèdent une activité suppressive plus puissante, soit elles contiennent plus de cellules Treg allospécifiques que les cellules spléniques.

Afin de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans la tolérance, l'équipe a appliqué la technique des puces à ADN (Applied Biosystems) sur des greffons 100 jours après la transplantation. Ces puces contiennent plus de 27000 gènes. L'équipe a comparé des allogreffes tolérées, induites par le LF15-0195 avec des allogreffes non rejetées mais présentant des signes de rejet chronique induites soit par des transfusions de sang du donneur (Souillou et al. 1984; Heslan et al. 2006), soit par l'injection d'un adénovirus codant pour le CD40lg (Guillonnet et al. 2007) et avec des greffons syngéniques. De façon intéressante, elle a observé peu de molécules surexprimées dans les allogreffes tolérées par

rapport aux allogreffes ayant du rejet chroniques et aux greffes syngéniques. Parmi ces gènes, l'équipe a identifié des molécules liées à la cytoprotection des cellules endothéliales (iNOS, HO-1, IDO), des molécules liées aux cellules T régulatrices (LAG-3, CCR4) et à l'infiltrat (IFN γ et des membres de la famille des chemokines). Ces résultats sont en accord avec l'infiltrat important mais aussi avec l'accumulation de cellules T régulatrices observés dans les greffons tolérés, 100 jours après la transplantation (Chiffolleau et al. 2002b; Heslan et al. 2006). De manière surprenante, la surexpression de molécules cytotoxiques (Granzyme A, B, perforine) a aussi été constatée dans les allogreffes tolérées. Cependant, ces molécules cytotoxiques pourraient, dans notre modèle, être exprimées par les cellules effectrices mais aussi par les nombreuses cellules T régulatrices accumulées dans les allogreffes tolérées. En effet, il a été décrit que les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ pouvaient exercer leur activité suppressive par cytotoxicité (Grossman et al. 2004a; Grossman et al. 2004b). La surexpression de toutes ces molécules dans les allogreffes tolérées suggère la présence d'une tolérance active dans notre modèle, où les cellules T régulatrices réguleraient localement les cellules effectrices mais aussi une protection des cellules endothéliales contre le système immunitaire. C'est pourquoi, nous avons donc voulu étudier la coopération possible entre les cellules endothéliales exprimant des molécules cytoprotectrices et les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ accumulées dans les allogreffes tolérées.

Nous nous sommes donc tout d'abord intéressé au rôle de certaines de ces molécules dont IDO et nous avons montré l'importance de cette molécule dans notre modèle de tolérance. Ce travail a abouti à une publication en 2007 dans l'"American Journal of Transplantation" (article 1). Nous avons aussi étudié une autre molécule, CLEC-1 (un récepteur lectine de type C) identifiée par les puces à ADN comme étant surexprimée dans les allogreffes tolérées dont la fonction est inconnue. Ce travail a permis une publication en 2009 dans "The Journal of Immunology" (article 2).

II. Etude du rôle d'IDO dans la tolérance et de son lien avec les cellules Treg CD4⁺CD25⁺

1. Article 1

“Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells”

Paméla Thebault, Thomas Condamine, Michèle Heslan, Marcelo hill, Isabelle Bernard, Abdelhadi Saoudi, Régis Josien, Ignacio Anegon, Maria Cristina Cuturi et Elise Chiffolleau.

Publié dans "The American Journal of Transplantation" (2007 Nov;7(11):2472-82)

Résumé de l'article 1

Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, l'équipe avait préalablement montré qu'un traitement court de vingt jours avec le LF15-0195, un analogue de la déoxyspergualine, induit la survie à long terme de l'allogreffe sans signe de rejet chronique (Chiffolleau et al. 2002a). De plus, l'équipe avait aussi démontré l'accumulation de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans la rate et le greffon des animaux tolérants qui étaient capables de transférer la tolérance à un second receveur irradié (Chiffolleau et al. 2002b; Heslan et al. 2005).

Dans cette étude, nous avons confirmé par cytométrie de flux, l'accumulation de cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans la rate et le greffon des animaux tolérants, mais nous avons aussi constaté la présence de nombreuses cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻. Ces cellules pourraient être des cellules T effectrices ou d'autres types de cellules T régulatrices. Nous avons aussi montré que les molécules liées à la cytoprotection surexprimées dans les allogreffes tolérées (IDO, iNOS et HO-1) étaient spécifiquement exprimées par les cellules endothéliales des vaisseaux du greffon. Suite au transfert de cellules T CD4⁺ issues de la rate d'animaux tolérants, nous avons observé une accumulation de nouvelles cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ et CD4⁺CD25⁺foxp3⁻ dans le greffon ainsi qu'une forte expression d'IDO dans les cellules endothéliales du greffon. Par ailleurs, nous avons démontré *in vitro* et *in vivo* que les cellules T CD4⁺CD25⁺ d'animaux tolérants et non celles d'animaux naïfs induisaient une expression forte d'IDO dans les cellules endothéliales allogéniques par un mécanisme dépendant de l'IFN γ . De plus, nous avons observé *in vivo* que le transfert de tolérance pouvait être aboli en bloquant l'IFN γ et IDO ce qui démontre un rôle important de ces deux molécules dans la tolérance. Nous avons aussi observé que l'inhibition de l'IFN γ *in vitro* réduisait la survie et/ou l'expansion des cellules T régulatrices CD4⁺Foxp3⁺.

L'ensemble de ces résultats ont ainsi démontré une coopération entre les cellules endothéliales du greffon et les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ dans la mise en place d'un privilège immun local et un rôle clé de l'IFN γ et IDO dans les mécanismes de tolérance.

Role of IFN γ in Allograft Tolerance Mediated by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by Induction of IDO in Endothelial Cells

P. Thebault^a, T. Condamine^a, M. Heslan^a,
 M. Hill^a, I. Bernard^b, A. Saoudi^b, R. Josien^a,
 I. Anegon^a, M. C. Cuturi^a and E. Chiffoleau^{a,*}

^aINSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITER, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France

^bINSERM U563, Toulouse, France

* Corresponding author: Elise Chiffoleau,
 Elise.Chiffoleau@univ-nantes.fr

Regulatory T cells have been described to specifically accumulate at the site of regulation together with effector T cells and antigen-presenting cells, establishing a state of local immune privilege. However the mechanisms of this interplay remain to be defined. We previously demonstrated, in a fully MHC mismatched rat cardiac allograft combination, that a short-term treatment with a deoxyspergualine analogue, LF15-0195, induces long-term allograft tolerance with a specific expansion of regulatory CD4⁺CD25⁺T cells that accumulate within the graft. In this study, we show that following transfer of regulatory CD4⁺T cells to a secondary irradiated recipient, regulatory CD25⁺ Foxp3⁺ and CD25⁺ Foxp3⁻ CD4⁺T cells accumulate at the graft site and induce graft endothelial cell expression of Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) by an IFN γ -dependent mechanism. Moreover, *in vivo* transfer of tolerance can be abrogated by blocking IFN γ or IDO, and anti-IFN γ reduces the survival/expansion of alloantigen-induced regulatory Foxp3⁺CD4⁺T cells. Together, our results demonstrate interrelated mechanisms between regulatory CD4⁺CD25⁺T cells and the graft endothelial cells in this local immune privilege, and a key role for IFN γ and IDO in this process.

Key words: Endothelial cells, Foxp3, IFN γ , rat, regulatory T cells, tolerance

Received 06 March 2007, revised 24 July 2007 and accepted for publication 26 July 2007

Introduction

Functionally specialized subsets of regulatory CD4⁺T cells have been shown to play an important role in the regulation

of both T-cell-mediated and innate immune responses (1). In particular, the CD4⁺CD25⁺ subpopulation of T cells has been shown to be crucial in self-tolerance and also to prevent allograft rejection (2–4). It was recently reported that most human and mouse regulatory CD4⁺CD25⁺T cells express forkhead box protein 3 (Foxp3), a specific transcription factor that controls both their development and function (5–7). As CD25 is not uniquely expressed by regulatory T cells, but can also be expressed by activated effector cells, the identification of Foxp3 has provided an opportunity to specifically identify regulatory T cells and to track them *in vivo* so as to better define the mechanisms involved in their regulation of immune responses (8,9).

In models of allograft tolerance in rodents, alloantigen-specific and highly suppressive regulatory CD4⁺CD25⁺T cells have been shown to preferentially accumulate within the graft, where they hold effector cells in check by exertion of regulatory mechanisms (10,11). These findings suggest an interplay between regulatory T cells, effector cells and antigen-presenting cells (APC) within the graft itself, leading to local immune privilege and long-term tolerance. The comprehension of the active suppressive mechanisms involved in this phenomenon of local immune privilege may help to generate new therapies in the clinical setting.

We previously demonstrated in a fully MHC mismatched rat cardiac allograft combination, that a short-term treatment with a deoxyspergualine analogue, LF15-0195, induces allograft tolerance with no signs of chronic rejection at long-term and is characterized by a specific expansion of CD4⁺CD25⁺T cells that accumulate in the spleen and graft (12–14). Moreover, we observed an accumulation of transcripts coding for numerous cytoprotective molecules in long-term tolerated allografts, such as Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), Nitric Oxide synthase (NOS) and Heme-Oxygenase-1 (HO-1) (15). These data suggested that in our model, long-term tolerance is maintained locally by interrelated mechanisms involving regulatory T cells and the graft itself, to regulate local effector cells and to prevent graft damage.

We previously showed that CD4⁺T cells from the spleen or from the graft are able to transfer tolerance to a subsequent sublethally irradiated host, demonstrating the presence of powerful regulatory T cells (13,14). However, the

Role of IFN γ in Allograft Tolerance

involvement of Foxp3⁺ regulatory T cells and the mechanisms of action of tolerance transfer remained to be defined. Here, we demonstrate that following transfer of regulatory CD4⁺T cells to a secondary recipient, regulatory CD25⁺Foxp3⁺ and CD25⁺Foxp3⁻ CD4⁺T cells accumulate in the graft and induce the expression of IDO by graft endothelial cells (EC). This induction is strictly dependent on IFN γ , a molecule that plays a crucial role in allograft tolerance in our model. This study thus reveals a key role for IFN γ in the induction of local immune privilege by regulatory CD4⁺CD25⁺T cells.

Materials and Methods

Animals and transplantation

Rats were purchased from the 'Centre d'Élevage Janvier' (Genest-Saint-Isle-France) and maintained in an animal facility under standard conditions according to our institutional guidelines. LEW.1W (RT1^u) or LEW.1A (RT1^a) rats served as heart donors and LEW.1A as recipients. Heterotopic cardiac allografts were performed as previously described (16). LF15-0195 (Fournier Laboratories) was administered to recipients by i.p. injection at 3 mg/kg/day for 20 days (12). The model of chronic rejection was induced by two donor blood transfusions (DST) prior to transplantation (15,17). The graft function was assessed daily by scoring heart pulsations through the abdominal wall.

Antibodies

Some anti-rat monoclonal antibodies (Abs) (European collection of Cell Culture (Salisbury, UK)) were labeled with FITC, Allophycocyanin-Cyanin7 (APC-Cy7), PE, AlexaFluor-647 or 488 (BiotAtlantic, Nantes, France). Commercial Abs: anti-rat CD3, Foxp3 (Clinisciences, Montrouge, France), CD31 (Serotec, Oxford, UK); Rabbit polyclonal anti-rat iNOS (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France), IDO (Neosystems, Strasbourg, France) and HO-1 (Stressgen Biotechnologies, Canada). Biotin-anti-mouse IgG, AlexaFluor-568 anti-mouse, FITC anti-rabbit, HRP-streptavidin and PE-streptavidin purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA). HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (from Pierce, Rockford, IL). The hybridomas producing anti-rat CD28 antibody was kindly provided by T. Hüning (University of Würzburg, Germany) and anti-rat IFN γ (IDB-1) by P.H. Van der Meide (Rijswijk, The Netherlands).

Western blot

Total lysate from naïve hearts or from syngeneic, chronically rejected or tolerant allografts (day 100 or from transferred recipients [day 35]) were prepared. Nitrocellulose membrane blocked with TBS (Tween-20-Tris buffered saline)-5% milk, were incubated with rabbit anti-IDO, anti-HO-1 or mouse anti-tubulin (1 μ g/mL) diluted in TBS-5% milk (overnight) and then with HRP-goat anti-rabbit (1:6000) or anti-mouse IgG (1:3000). Bands were revealed by enhanced chemiluminescence (Amersham, Little Chalfont, UK), exposed to Kodak film and quantified with Kodak Digital Science Image Analysis 1D Software.

Immunohistology

Cardiac tissue was snap-frozen in liquid nitrogen after embedding in OCT compound (Tissue Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN). Cryostat sections (7 μ m) fixed in acetone were incubated overnight with anti-IDO, iNOS or HO-1 Abs (1.5 μ g/mL), followed by a FITC-anti-rabbit, by anti-rat CD31 or class II MHC (5 μ g/mL) and by AlexaFluor-568 anti-mouse Abs, and DAPI and mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), and observed by fluorescence microscopy (Axioskop2 plus, Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany). Images were visualized (x400) and processed using the AxonVision Viewer program (Carl Zeiss Inc.).

Cell purification

Graft-infiltrating cells (GIC): GIC from tolerant recipients (day 100) or from recipients that had received cell transfers (day 5 or day 35) were recovered, pressed through a stainless steel mesh and isolated by density gradient centrifugation on Ficol-Paque (Amersham, Biosciences, Sweden) and then stained with mAbs and analyzed with a FACS LSR-II flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

T-cell purification: Spleen-derived CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells from naïve rats or from tolerant recipients were purified by positive selection using a FACSARIA flow cytometer (Becton Dickinson). Splenocytes were stained with R7-3-FITC, Ox35-Cy7, Ox8-PE or Ox39-APC Alexa-647 for CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ T-cell purification. Purity was >99%.

Endothelial cell-T-cell coculture

EC of LEW.1W or LEW.1A origin were isolated as previously described (18) and plated into 6 well plates (NUNC™ Merck, Eurolab, France) (1 \times 10⁶ cells/well) in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 5 \times 10⁻⁵ M-2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 10% heat-inactivated FCS [GIBCO]). After overnight culture (37°C, 5% CO₂), highly purified CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ T cells from naïve rats or from tolerant recipients were added (5 \times 10⁶ cells/well) to the EC cultures (with irrelevant mAb [3G8] or anti-IFN γ at 5 μ g/mL). Twenty-four h later, the lymphocytes were discarded and the adherent EC were washed several times and lysed with Trizol (Invitrogen) for RT/PCR analysis of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) and IDO expression.

RNA extraction and real-time quantitative RT/PCR

RNA extraction and real-time quantitative RT/PCR was performed as previously described in an Applied Biosystems-GenAmp 7700 Sequence Detection System using SYBR-Green PCR Core Reagents (19). The oligonucleotides used were: rHPRT (Up-CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC, Lo-TTC-GCTGATGACACAACATGA), iIDO (Up-ATCCAGACACCTTTTCCACG, Lo-CAGCAGATCCTTCAACCAACG) and rIFN γ (Up-TGGATGCTATGGAAGG-AAAGA, Lo-GATTCTGGTGACAGCTGGTG). HPRT was used as an endogenous control gene to normalize for varying starting amounts of RNA, data were expressed in arbitrary units (AU).

Stimulation assays

Anti-CD3/CD28: CD4⁺T cells from naïve rats or from rejecting or tolerant recipients (5 \times 10⁴ cells/well) were stimulated in 96 well flat-bottom plates (NUNC™) coated with anti-CD3 (0.75 μ g/mL) and with addition of soluble anti-CD28 (0.6 μ g/mL) in a final volume of 200 μ L of complete medium.

Mixed Leukocyte Reaction (MLR): APC-enriched cell populations from donor-type isolated by a Nycopenz gradient served as stimulator cells. Responder (CD4⁺T cells) (2 \times 10⁶) were labeled with CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester) (Molecular Probes, Eugene, OR) as previously described (20) and plated with stimulator cells (5 \times 10⁴) in 96 well round-bottomed plates in 200 μ L of complete medium. For intracellular cytokine staining, CD4⁺T cells were cultured in the presence of brefeldin A (5 μ g/mL, last 4 h). Cells were stained with anti-TCR $\alpha\beta$ and CD4 mAbs, fixed in 2% paraformaldehyde, incubated with PBS/0.2% FCS/0.5% saponin (15 min) and then with anti-IFN γ or anti-Foxp3-APC (5 μ g/mL) for 1 h, washed and analyzed using a FACS LSR II after gating on the CD4⁺T-cell population.

In vivo transfer experiments and IFN γ and IDO neutralization

A total of 20 \times 10⁶ CD4⁺T cells from tolerant recipients or from naïve rats (in some cases stained with CFSE) were injected i.v. (in 500 μ L of PBS)

Thebault et al.

on the day of cardiac transplantation into secondary syngeneic irradiated recipients (4 Gy, whole body irradiation (IFR 26, Nantes, France) 1 day before transplantation). A neutralizing anti-rat IFN γ mAb was injected i.p. (2.5 mg/kg) every day. 1-Methyl-DL-Tryptophan (Sigma) neutralizing IDO enzymatic activity (competitive inhibitor) was prepared by dilution in NaOH, adjusted to pH 9 with HCl, diluted in water, and administered orally at 0.2 mg/kg twice daily as previously described (21).

Statistical analysis

The Kaplan–Meier method was used to establish survival curves. Survival was analyzed with a log-rank test, and differences were considered significant when p-values were <0.05. Statistical evaluation was performed using the Student's t-test for unpaired data and results were considered significant if p-values were <0.05. Data were expressed as mean \pm SEM.

Results

Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells accumulate in the spleen and graft of tolerant recipients

We previously demonstrated an accumulation of CD4⁺CD25⁺T cells expressing high levels of Foxp3 mRNA transcripts in the spleen and graft of long-term tolerant recipients and that Foxp3 could be considered as a marker of regulatory CD4⁺CD25⁺T cells in rats (13,14). Here we studied the expression of Foxp3 at the protein level in CD4⁺T cells from tolerant recipients. We found a significant increase in the percentage of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells in the spleen of tolerant recipients (8.6%) compared to naïve rats (3.9%), long-term syngeneic recipients (4.4%) and recipients that had rejected their allografts (3.6%) (n = 4, *p < 0.05, **p < 0.01, Figure 1A[a]; representative dot plot Figure 1B). We also observed numerous CD4⁺CD25⁺T cells that did not express Foxp3 in the spleen of tolerant recipients (16.9%) compared to naïve rats (4.6%), long-term syngeneic recipients (8%) and recipients that had rejected their allografts (7%) (n = 4, **p < 0.01, Figure 1A[a]; representative dot plot Figure 1B). The same results were observed in absolute number (n = 4, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, Figure 1A[b]). Moreover, up to 40% of the CD4⁺T cells expressed CD25 within the graft-infiltrating cells of tolerant recipients, with about half of them expressing Foxp3 (n = 4, Figure 1A[a]; representative dot plot Figure 1B).

These data demonstrate a specific accumulation of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells in the spleen and graft of tolerant recipients, and also the presence of numerous Foxp3⁻CD4⁺CD25⁺T cells.

Endothelial cells from long-term-tolerated allografts express IDO, iNOS and HO-1

We previously demonstrated a high expression of transcripts coding for IDO, iNOS and HO-1 in long-term-tolerated allografts compared to allografts that had developed chronic rejection and syngeneic grafts (15). In order to determine which cells express these molecules, we performed immunofluorescence on allografts. Interestingly, only EC (CD31⁺) from tolerated allografts expressed

HO-1, iNOS or IDO (Figures 2A[b], [c] and [d], respectively). Staining was attributed mostly to medium-sized vessels for iNOS and HO-1, and to small vessels for IDO. In long-term allografts that had developed chronic rejection or in syngeneic grafts, no staining for HO-1 or iNOS was detectable by immunofluorescence and staining for IDO was observed in only a few EC. The higher expression of IDO in tolerated allografts compared to syngeneic grafts and of HO-1 compared to allografts displaying signs of chronic rejection was confirmed at the protein level by Western blot (Figure 2B, n = 3, *p < 0.05). These results demonstrate a high and specific expression of HO-1, iNOS and IDO by EC in long-term-tolerated allografts.

Following transfer, CD4⁺ T cells from tolerant recipients induce accumulation of regulatory Foxp3⁺ CD25⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺ T cells and the production of IDO by donor graft EC

The accumulation of regulatory T cells within the tolerated allografts and the high expression of cytoprotective molecules by graft EC suggested an interplay between these cells. To test this hypothesis, we transferred CFSE-labeled spleen-derived CD4⁺T cells from tolerant recipients or from naïve rats to secondary, sub lethally irradiated heart allograft recipients and analyzed their proliferation, homing and phenotype. Five days after transfer of CFSE-labeled CD4⁺T cells from naïve rats or tolerant recipients, some CFSE⁺CD4⁺T cells were detected in the new allograft and were proliferating (3%, n = 4), but none of them were Foxp3⁺ (Figure 3A[a] and [b]). However, interestingly, a higher percentage of CFSE⁻CD4⁺Foxp3⁺ was observed in the allografts following transfer of CD4⁺T cells from tolerant recipients compared with transfer of CD4⁺T cells from naïve rats (16% vs. 10%, n = 4, Figure 3A[a] and [b]). These data demonstrate a specific accumulation of Foxp3⁺CD4⁺T cells in the allografts following transfer with CD4⁺T cells from tolerant recipients that seem to be newly induced regulatory T cells from host origin. Moreover, similar to the observations in long-term-tolerant recipients, 35 days after transfer of CD4⁺T cells from tolerant recipients, numerous Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ and Foxp3⁻CD4⁺CD25⁺T cells accumulated in the spleen (9% and 13%, respectively) and within the graft (14% and 27%, respectively) compared to the spleen of recipients that have been transferred with naïve CD4⁺T cells and that received a syngeneic graft (6% and 3%, respectively) (n = 3 or 4, Figure 3B[a] and [b], **p < 0.01, ***p < 0.001). Interestingly, in the allografts, the Foxp3⁻CD4⁺CD25⁺T cells contained numerous IFN γ ⁺-producing cells (11%; n = 3, Figure 3B[b]). These data demonstrate that following transfer with regulatory CD4⁺T cells from tolerant recipients, newly induced Foxp3⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺CD25⁺T cells accumulated in the allografts.

Moreover, allografts from recipients that had received CD4⁺T cells from tolerant recipients expressed higher levels of protein for IDO than syngeneic grafts from recipients

Role of IFN γ in Allograft Tolerance

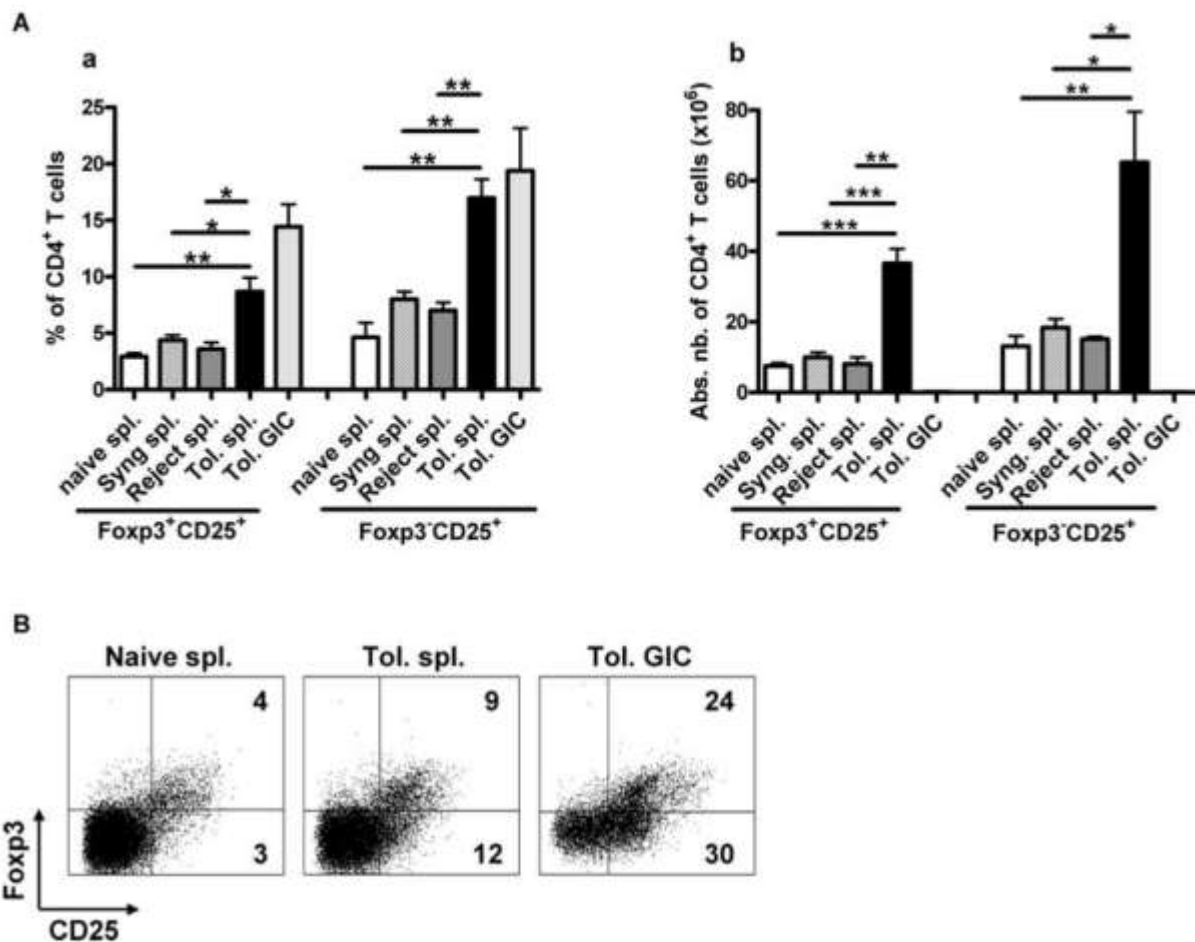


Figure 1: High percentage and absolute number of Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ and Foxp3⁻ CD4⁺ CD25⁺ T cells in the spleen and allograft of long-term tolerant recipients. (A) (a) Percentage, (b) Absolute number and (B) representative dot plots of Foxp3⁺CD25⁺ and Foxp3⁻CD25⁺ in spleen-derived CD4⁺T cells from naïve rats, from long-term recipients with syngeneic grafts, from long-term recipients that had rejected their allografts (untreated), from long-term tolerant allograft recipients (day 100 posttransplantation), and graft infiltrating CD4⁺T cells from long-term tolerant recipients (day 100 posttransplantation). Cells were stained with anti-TCR, anti-CD4 and anti-CD25, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Foxp3 mAb as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on CD4⁺T cells and results are expressed as percentage and absolute number of CD4⁺T cells (n = 4), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

that had received CD4⁺T cells from naïve rats (day 35, n = 3, **p < 0.01, Figure 4A[a]). By immunohistology, IDO was found to be expressed exclusively by EC of small-size vessels (CD31⁺) and not by any MHC Class II⁺ leukocytes (Figure 4A[b]). However, HO-1 was not expressed by EC but by other leukocytes, and no expression of iNOS protein was detected in the allografts (data not shown). These data suggested that CD4⁺T cells from recipients that had received cell transfers were able to induce graft EC to produce IDO. To test this hypothesis *in vitro*, we cocultured highly purified CD4⁺CD25⁺ or CD25⁻T cells from tolerant recipients or from naïve rats with allogeneic (donor origin) or syngeneic adherent EC and assessed expression of IDO. As shown in Figure 4B, only the CD25⁺ subpopulation of

CD4⁺T cells from tolerant recipients was able to induce significant expression of IDO transcripts in allogeneic EC (n = 3, **p < 0.01). This induction was moderate compared to that obtained with a high dose of IFN γ . Moreover, the induction was donor-specific and strictly dependent on IFN γ . These data demonstrate that CD4⁺CD25⁺T cells from tolerant recipients directly induce donor-type EC to rapidly express IDO through an IFN γ -dependent mechanism.

In vivo transfer of tolerance is dependent on IFN γ and IDO

In order to determine whether IDO or IFN γ , which is a potent inducer of IDO expression (22), play a role in the mechanisms of transfer of tolerance, we used neutralizing

Thebault et al.

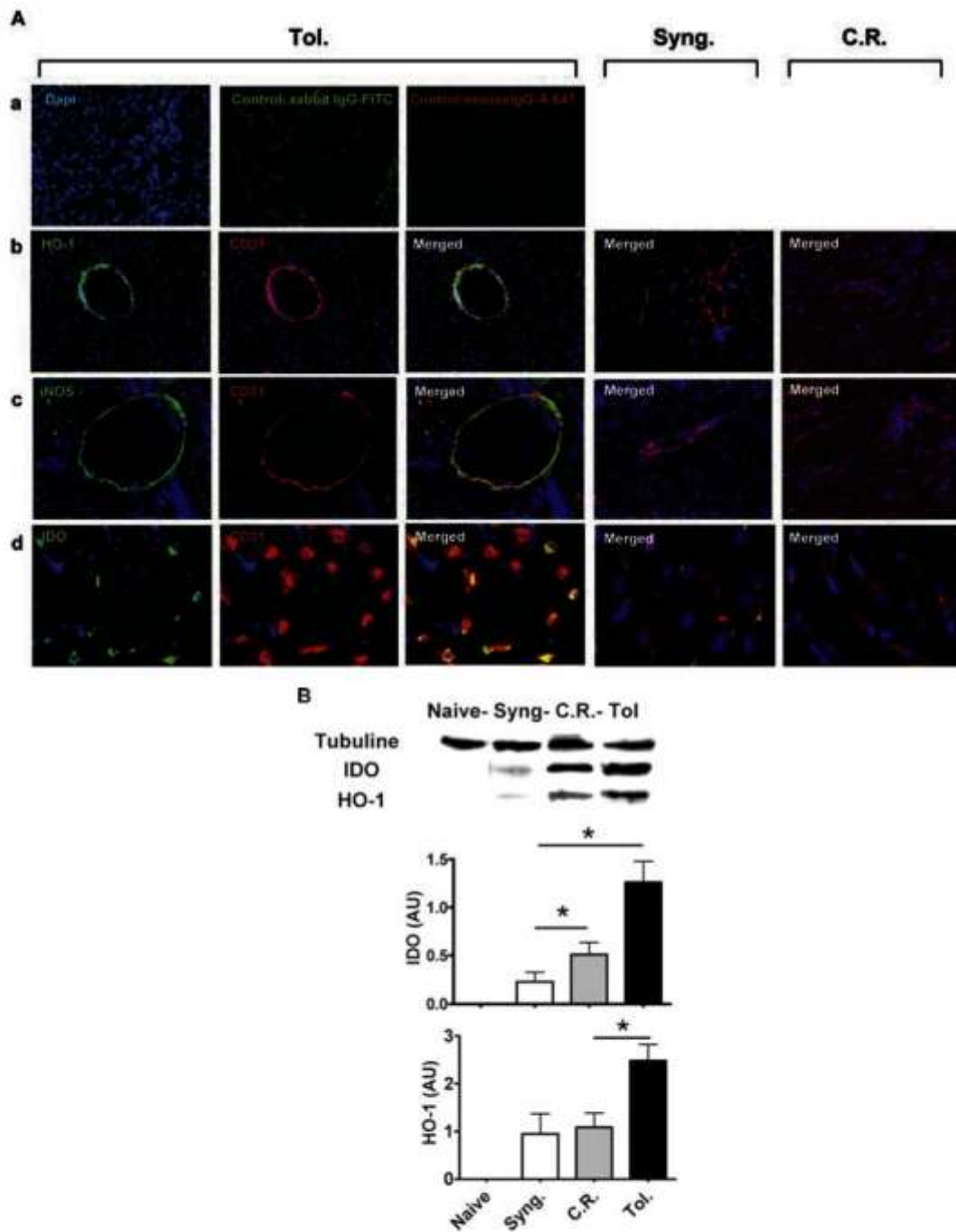


Figure 2: Endothelial cells from long-term-tolerated allografts express high levels of HO-1, iNOS and IDO. (A) Representative pictures of immunofluorescence analysis of long-term-tolerated allografts (Tol.), syngeneic grafts (Syng.) or chronically rejected allografts (C.R.) (day 100 posttransplantation) as described in Material and Methods for (a) Dapi (blue) and isotypic controls rabbit IgG-anti-rabbit FITC (green) and mouse IgG-anti-mouse Alexa 647 (red), respectively (b) HO-1, (c) iNOS and (d) IDO (green) with Dapi (blue) and CD31 (red) staining and merged. Original magnification : $\times 400$ for HO-1 and iNOS and $\times 600$ for IDO. (B) Representative Western Blot analysis of IDO and HO-1 expression in naive hearts (Naive), long-term syngeneic grafts (Syng.), chronically rejected allografts (C.R.) or tolerated allografts (Tol.) (day 100 posttransplantation). The histogram represents IDO/Tubulin and HO-1/Tubulin signal quantification in three samples for each group * $p < 0.05$.

2476

American Journal of Transplantation 2007; 7: 2472-2482

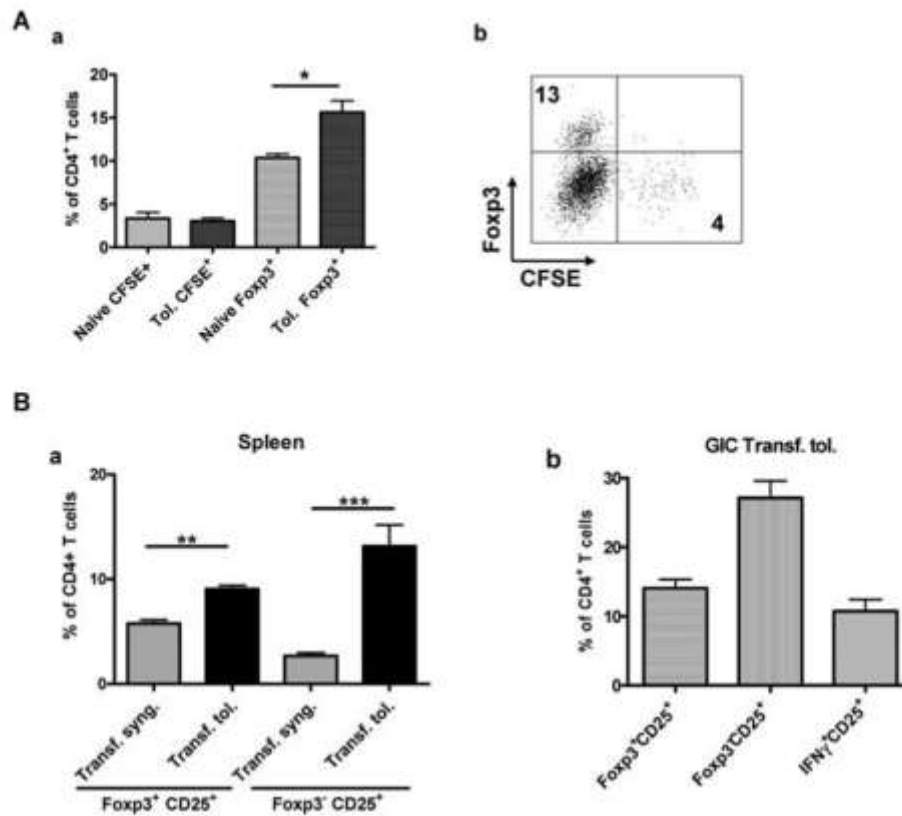


Figure 3: Following transfer to a secondary recipient, CD4⁺ T cells from tolerant recipients induce the accumulation of Fcpx3⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺ T cells. (A) (a) Percentage and (b) representative dot plots of CFSE⁺ versus Fcpx3⁺ cells in CD4⁺ T cells in the allografts of transferred recipients. 20 × 10⁶ CFSE-labeled spleen CD4⁺ T cells from long-term-tolerated allografts or from naive rats were transferred to a secondary irradiated host as described in the Materials and Methods. Five days after transfer, graft infiltrating cells were purified, stained with anti-TCR and anti-CD4, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Fcpx3 mAb as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on CD4⁺ T cells (n = 3 or n = 4), *p < 0.05. (B) (a) Percentage of Fcpx3⁺CD25⁺ and Fcpx3⁻CD25⁺ in spleen-derived CD4⁺ T cells of transferred recipients that have received naive CD4⁺ T cells (20 × 10⁶) and syngeneic grafts (Transf. syng., n = 5) and from recipients that have received CD4⁺ T cells from tolerant recipients (20 × 10⁶) and allogeneic grafts (Transf. tol., n = 3). (b) Percentage of Fcpx3⁺CD25⁺, Fcpx3⁻CD25⁺ and IFN γ ⁺CD25⁺ in CD4⁺ T cells in the allografts of recipients that have received CD4⁺ T cells from tolerant recipients (20 × 10⁶) and allogeneic grafts (GIC Transf. tol., n = 3). Thirty-five days after transfer, spleen-derived or graft infiltrating cells were purified, stained with anti-TCR, anti-CD4 and anti-CD25, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Fcpx3 or anti-IFN γ mAb as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on CD4⁺ T cells and results are expressed as percentage of CD4⁺ T cells.

anti-rat IFN γ mAb and 1-Methyl-DL-Tryptophan. Transfer of tolerance with CD4⁺ T cells from tolerant recipients was abrogated in 3 out of 4 recipients by *in vivo* treatment with anti-IFN γ mAb (n = 4, *p < 0.05, Figure 5A) and in all recipients treated with 1-Methyl-DL-Tryptophan (n = 4, **p < 0.01, Figure 5A). However, 1-Methyl-DL-Tryptophan treatment does not break the tolerant state of tolerated allografts induced by LF15-0195 treatment suggesting other mechanisms of regulation at long-term (n = 4, Figure 5A). No effect of control irrelevant mAb 3G8 or vehicle was observed (data not shown). Graft recipients that had received cell transfers and that had promptly rejected their allografts following anti-IFN γ treatment (day 10 after transplantation,

n=2) contained numerous CD4⁺CD25^{low} T cells in their allografts (40%) and few CD4⁺CD25^{high}Fcpx3⁺ T cells (7%) (n = 2, Figure 5B) compared to the controls at day 35 (14%, Figure 3B, and representative dot plot Figure 5B). These data suggest that anti-IFN γ treatment induces cellular rejection with numerous effector CD4⁺ T cells and few regulatory Fcpx3⁺CD4⁺ T cells infiltrating the allografts. Moreover, rejected allografts from transferred recipients treated with anti-rat IFN γ had considerably less IDO transcripts than untreated recipients (Figure 5C, n = 3, *p < 0.05). These results demonstrate that IFN γ plays a crucial role in the mechanisms of tolerance transfer in our model that is mediated by the induction of IDO expression by graft EC.

Thebault et al.

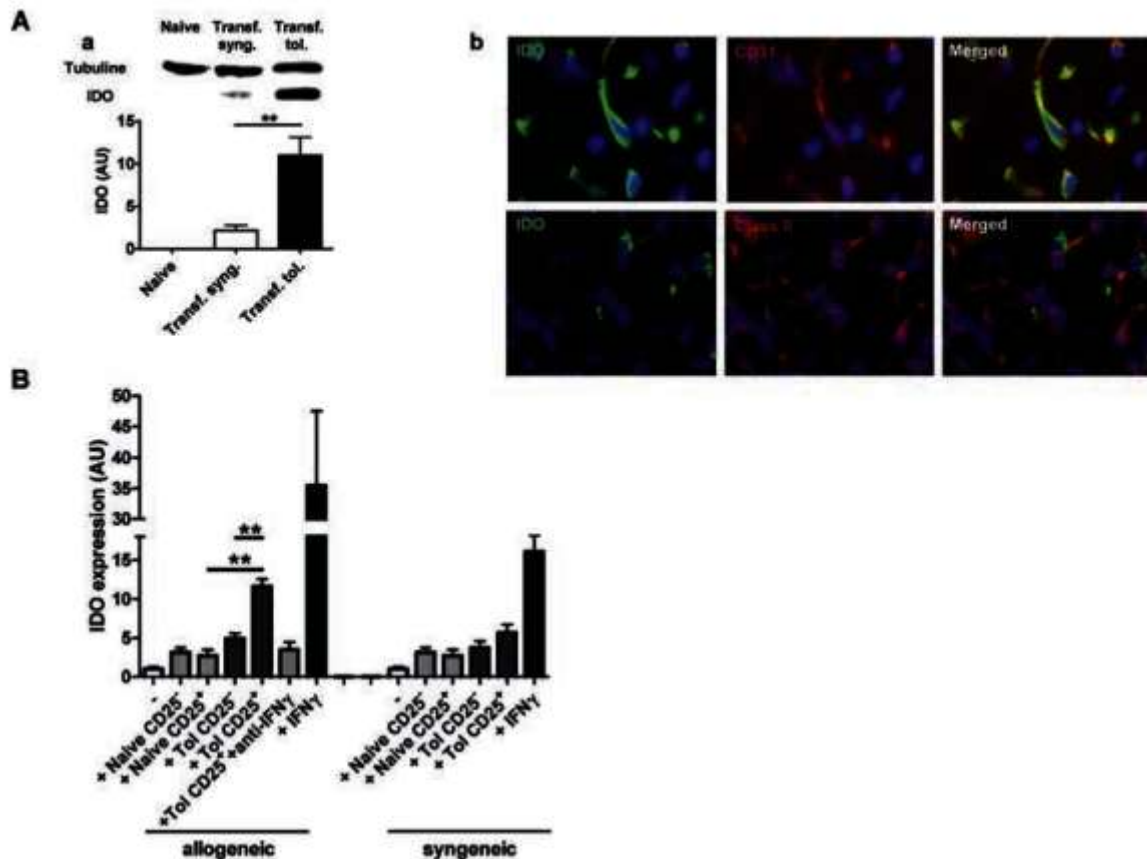


Figure 4: Regulatory CD4⁺T cells from tolerant recipients induce donor-type EC to express IDO by an IFN γ -dependent mechanism. (A) (a) Representative Western Blot analysis of IDO expression in naive hearts (Naive, n = 3), syngeneic grafts from recipients that had received CD4⁺T cells from naive rats (Transf. syng., n = 5) (day 35 posttransplantation) or allografts from recipients that had received CD4⁺T cells from tolerant recipients (Transf. tol, n = 3) (day 35 posttransplantation). The histogram represents IDO/Tubulin signal quantification, ** p < 0.01. (b) Representative pictures of immunofluorescence analysis of transferred allografts (day 35 posttransplantation) as described in Material and Methods for IDO (green) with Dapi (blue) and CD31 or MHC Class II (red) staining (merged). Original magnification : $\times 600$. (B) CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺T cells from naive or tolerant recipients were cocultured for 24 h with allogeneic LEW.1W or syngeneic LEW.1A EC lines in the presence of anti-IFN γ or control 3G8 (5 μ g/mL), and IDO was assessed specifically in EC by quantitative RT/PCR as described in the Materials and methods. EC were incubated with a high dose of IFN γ (50 ng/mL) to induce IDO expression. Results are expressed in AU of IDO/HPRT \pm SEM (n = 3, ** p < 0.01).

Expression of IFN γ is detected in the Foxp3⁻ subpopulation of CD4⁺CD25⁺T cells but is important for the survival of regulatory Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells

In order to determine whether regulatory Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells expressed IFN γ , we assessed intracellular IFN γ production following alloantigen specific or polyclonal stimulation. We were unable to detect intracellular IFN γ protein by FACS in Foxp3⁺CD4⁺T cells from either naive or tolerant recipients following either types of stimulation (data not shown). However, we observed expression of IFN γ by Foxp3⁻CD4⁺T cells from tolerant recipients following alloantigen-specific or polyclonal stimulation (Figure 6A, 2.6% and Figure 6B, 6.4%, n = 3, respectively) that was similar to that observed with Foxp3⁻CD4⁺T cells

from naive rats (Figure 6A, 3.4% and Figure 6B, 5.5%, n = 3, respectively) but reduced compared to that observed with Foxp3⁻CD4⁺T cells from rejecting recipients (Figure 6A, 10.3%, ***p < 0.001 and Figure 6B, 12.9%, n = 3, **p < 0.01, respectively). In order to determine whether spleen-derived CD4⁺CD25⁺T cells from tolerant recipients expressed quantitatively more IFN γ than those from naive rats, we performed quantitative RT/PCR and observed no difference in the level of expression of IFN γ transcripts (Figure 6C). However, the level of IFN γ transcripts in the CD4⁺CD25⁺T cells was relatively low compared to that in the CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺T-cell subpopulations.

Interestingly, we noted that the addition of anti-IFN γ during *in vitro* alloantigen-specific stimulation of CD4⁺T cells

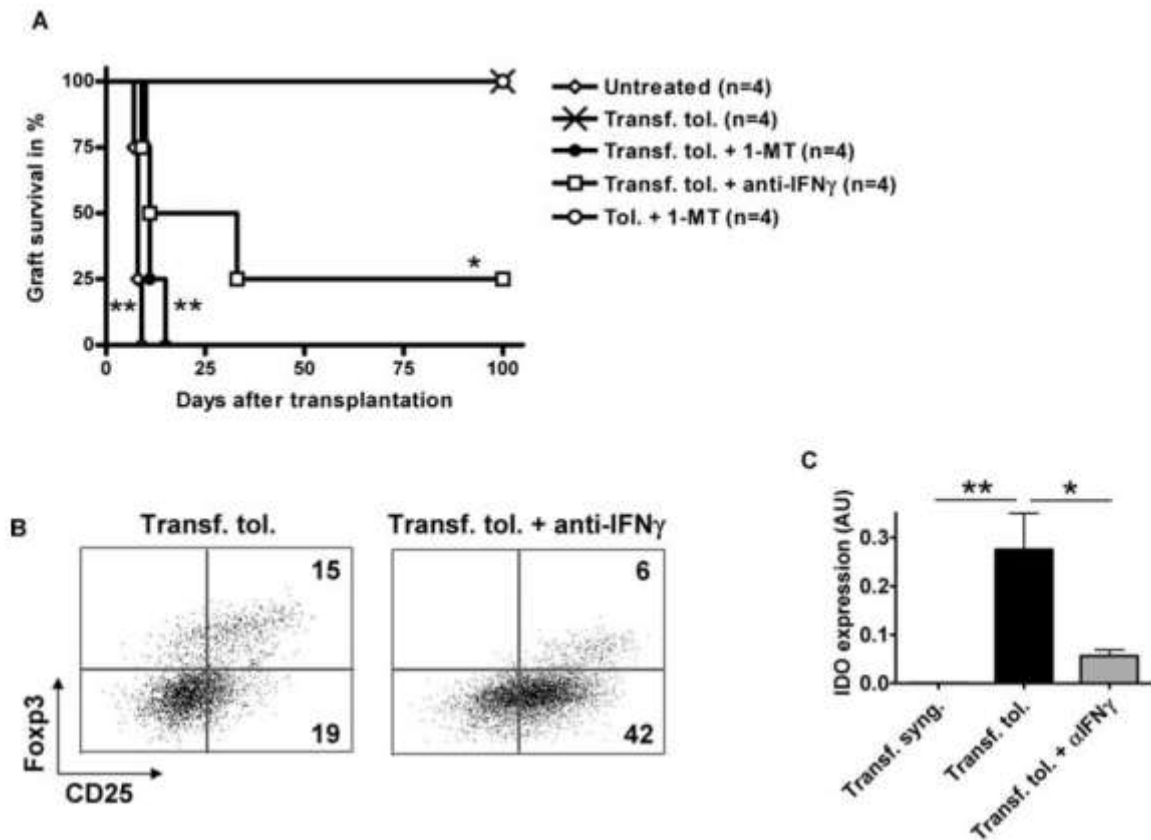


Figure 5: Anti-IFN γ treatment abrogates transfer of tolerance by blocking induction of IDO expression. (A) Long-term LF15-0195-treated recipients or secondary recipients that have been transferred with no cells (untreated) or 20×10^6 spleen CD4⁺T cells from long-term-tolerated allografts were treated as described in the Materials and Methods. A neutralizing mouse anti-rat IFN γ mAb (clone DB1, IgG1) was injected i.p. at day 0 (2.5 mg/kg) every day until rejection. 1-Methyl-DL-Tryptophan neutralizing IDO enzymatic activity (competitive inhibitor) was administered orally at 0.2 mg/kg twice daily. Graft survival was monitored daily by abdominal palpation, and rejection was defined as cessation of heartbeat (n = 4 in each group, **p < 0.01, *p < 0.05). (B) Representative Dot plots of Foxp3 versus CD25 in CD4⁺T cells from allografts of transferred recipients that had received no treatment and that tolerated their allografts (Transf. tol.) (day 35 posttransplantation) or that had rejected the allograft by anti-IFN γ treatment (Transf. tol. + anti-IFN γ) (day 10). Graft-infiltrating cells were purified stained with anti-TCR, anti-CD4 and anti-CD25, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Foxp3 as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on CD4⁺T cells and results are expressed as percentage. (C) IDO transcripts were assessed by quantitative RT/PCR as described in the Materials and Methods in syngeneic grafts from recipients that had received CD4⁺T cells from naïve rats (Transf. syng., n = 5) (day 35 posttransplantation), in allografts from recipients that had received CD4⁺T cells from tolerant recipients (Transf. tol., n = 3) and in allografts from recipients that had received CD4⁺T cells from tolerant recipients that have rejected their allografts following anti-IFN γ treatment (Transf. tol. + anti-IFN γ , n = 3); *p < 0.05, ** p < 0.01. Results are expressed in AU of IDO/HPRT \pm SEM.

from tolerant recipients strongly reduced the percentage of recovered Foxp3⁺CD4⁺T cells (Figure 7A, 1.6% vs. 4.1%, n = 3, **p < 0.01). We also observed a reduction, albeit to a lesser degree, in recovered Foxp3⁺CD4⁺T cells with CD4⁺T cells from naïve rats in the presence of anti-IFN γ (Figure 7A, 1.3% vs. 2.9%, n = 3, **p < 0.01). However, anti-IFN γ treatment did not reverse the hypoproliferative state of CD4⁺T cells from tolerant recipients despite the reduction in Foxp3⁺CD4⁺T cells (27% of proliferation vs. 25% with control antibody 3G8 and 41% with CD4⁺T cells from naïve rats) (Figure 7B). These results demonstrate

that IFN γ is detected by intracellular FACS staining only in the Foxp3⁻CD4⁺T-cell subpopulation but seems to play a role in the survival/expansion of regulatory Foxp3⁺CD4⁺T cells.

Discussion

We previously demonstrated, in a fully MHC mismatched rat cardiac allograft combination, that a short-term treatment with a deoxyspergualin analog, induces long-term

Thebault et al.

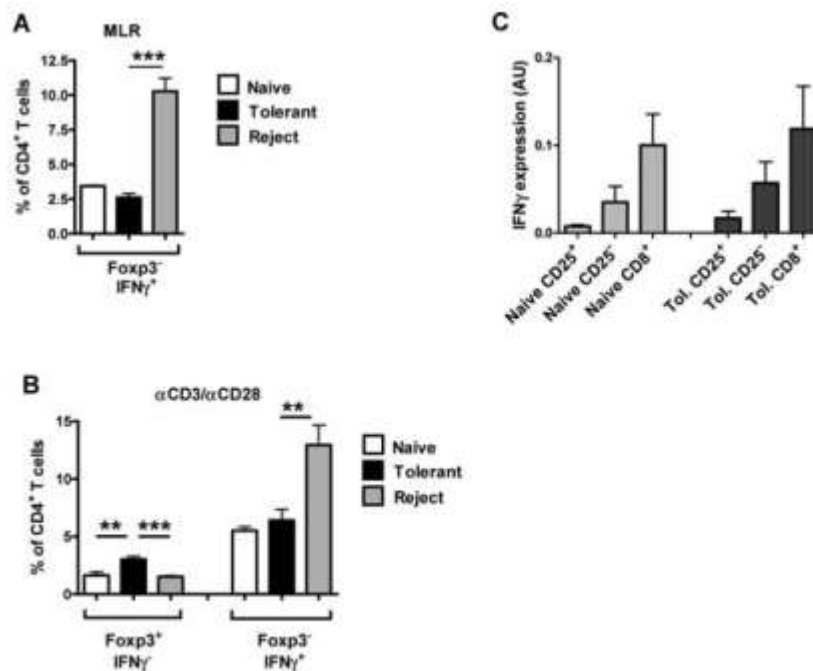


Figure 6: IFN γ is expressed at high levels by nonFxp3⁺CD4⁺T cells. T cells from naive rats, from long-term tolerant recipients (day 100) or from recipients that had rejected their allografts (untreated) (A) were cultured with allogeneic (LEW.1W) APC or (B) underwent polyclonal stimulation (plate bound anti-CD3 plus soluble anti-CD28) for 3 days as described in the Materials and Methods. Cells were recovered and stained with anti-TCR and anti-CD4, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Foxp3 and anti-IFN γ mAb as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS with gating on the CD4⁺T cells and results are expressed as percentage of CD4⁺T cells (n = 3). ** p < 0.01, *** p < 0.001. (C) IFN γ transcripts were assessed by quantitative RT/PCR as described in the Materials and Methods in highly purified CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺T cells from naive rats or from long-term tolerant recipients; n = 3 in each group. Results are expressed in AU of IFN γ /HPRT \pm SEM.

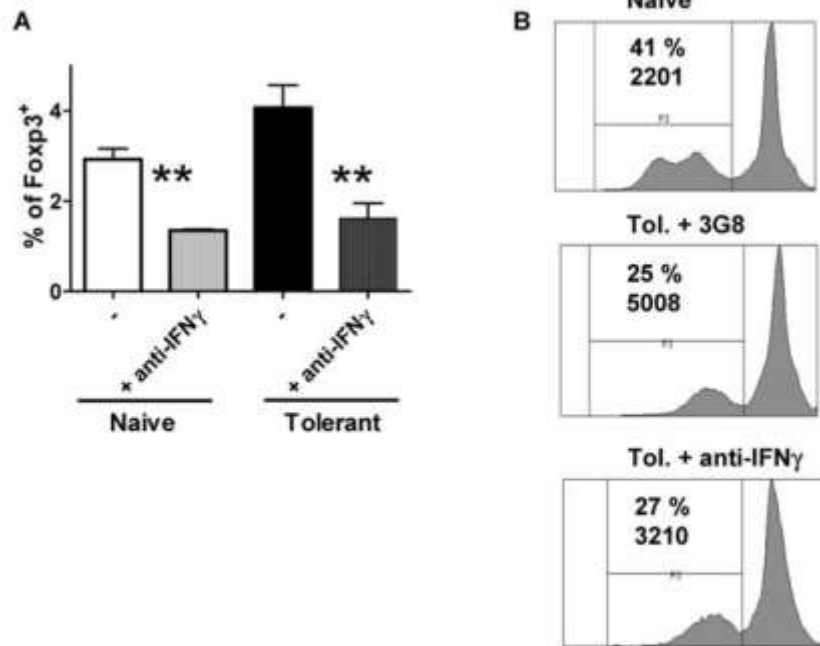
tolerance with a specific expansion of CD4⁺CD25⁺T cells that accumulate in the spleen and graft and are able to transfer tolerance to a secondary recipient (12–14). In this study, we demonstrated that both Fxp3⁺ and Fxp3⁻ subpopulations of CD4⁺CD25⁺T cells accumulated in the spleen and the graft of tolerant recipients. The Fxp3⁻CD4⁺CD25⁺T cells contained IFN γ -secreting cells that could represent other kinds of regulatory T cells or allogeneic-activated T cells. In fact, it has been shown in a model of skin allograft transplantation in mice that regulatory T cells represent only about one-half of the T cells that are present in tolerated allografts and that these nonregulatory T cells are able to reject the grafts when the regulatory CD4⁺T subpopulation is depleted (11,23). It has also been shown, in a model of colitis, that regulatory T cells accumulate in the colonic lamina propria and are in direct contact with dendritic cells, as well as effector T cells (24). Therefore, tolerated grafts could contain effector T cells, being held in check directly or indirectly by CD4⁺ regulatory T cells.

Here, we show that following transfer, CD4⁺T cells from long-term-tolerated recipients induce the accumulation of

Fxp3⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺T cells in the graft of a secondary recipient and induce EC to express high levels of IDO. These data demonstrate a state of local immune privilege within the graft with an interplay between regulatory T cells and graft EC to regulate T-cell responses and maintain long-term tolerance. Moreover, we show *in vitro* and *in vivo* that the induction of IDO expression in EC by CD4⁺T cells is IFN γ -dependent and that we were able to abrogate the transfer of tolerance by blocking IFN γ or IDO *in vivo*. Therefore, IFN γ plays a key role in the mechanisms of tolerance in this model. IFN γ has been shown to be a potent inducer of IDO in APC (22). IDO has been described as being expressed primarily by monocytes/macrophages and dendritic cells, but also by EC (25–27). A role for IDO in T-cell anergy and apoptosis has been demonstrated in several studies by depleting tryptophan and tryptophan metabolites (25,28–30), and over-expression of IDO in human EC has been shown to prevent T-cell activation (31).

We found that anti-IFN γ led to a reduction of regulatory Fxp3⁺CD4⁺T cells and to the abrogation of tolerance transfer. These data suggest an important role for IFN γ in the survival/expansion of alloantigen-induced regulatory

Figure 7: IFN γ is important for survival/expansion of alloantigen-induced Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells. CFSE-labeled T cells from naive rats or from long-term tolerant recipients (day 100) were stimulated by allogeneic (LEW.1W) APC for 5 days in the presence of anti-IFN γ (DB1) or irrelevant Ab (3G8) (5 μ g/mL) as described in the Materials and Methods. Cells were recovered and stained with anti-TCR and anti-CD4, fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-Foxp3 as described in the Materials and Methods. Cells were analyzed by FACS after gating on CD4⁺T cells. (A) Results are expressed as percentage of Foxp3⁺ cells in the CD4⁺T-cell population (n = 3, **p < 0.01). (B) Representative histograms of CFSE profile. Results represent the percentage of proliferation of CD4⁺T cells and the Mean Fluorescence of the proliferating cells. Data are representative of three independent experiments.



Foxp3⁺CD4⁺T cells and in the induction of IDO by graft EC. IFN γ is usually considered as a pro-inflammatory cytokine, driving Th1-type cell-mediated immune responses (32,33). However, recent data have demonstrated a paradoxical function for IFN γ , depending on the concentration and the microenvironment in which it is expressed. Along these lines, IFN γ treatment has been shown to downregulate experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing NO in local microglia and astrocytes in the target tissue (34). Moreover, a population of autoantigen-specific regulatory CD4⁺T cells, secreting low levels of IFN γ , was shown to directly stimulate APC to produce NO and to inhibit the proliferation of pathogenic T cells and the development of diabetes (35). In the transplantation setting, the generation and function of alloantigen-reactive regulatory T cells in a model of anti-CD4 therapy was impaired dramatically in IFN γ -deficient mice (36). The authors demonstrated that alloantigen-induced regulatory CD4⁺CD25⁺T cells rapidly and transiently express low levels of IFN γ and that induction of tolerance following adoptive transfer is IFN γ -dependent (36). Moreover, in rat, donor alloantigen-specific regulatory CD8⁺T cells have previously been shown to promote local graft immune privilege through IFN γ -dependent IDO expression (37).

We were unable to detect intracellular production of IFN γ protein by spleen-derived or graft-infiltrating Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells from long-term tolerant recipients. It is possible that IFN γ expression is transient and/or too low to enable detection by intracellular staining. Another explanation could be that the source of IFN γ is not the Foxp3⁺ subpopulation but the Foxp3⁻ subpopulation of CD4⁺CD25⁺T

cells. Indeed, in our model, we demonstrated numerous Foxp3⁻CD4⁺CD25⁺T cells that accumulate within the graft and spleen and that express quantitatively low levels of IFN γ . These cells could be regulatory T cells not expressing Foxp3. Alternatively, a part of these cells could be effector cells expressing low levels of IFN γ that are held in check by regulatory Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells. The IFN γ produced by these cells may be necessary for the survival, expansion and functional properties of the regulatory Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T cells. Along these lines, it has been shown, in both the human and mouse setting, that *in vitro* IFN γ treatment of CD4⁺CD25⁻T cells leads to their conversion into regulatory CD4⁺T cells, as characterized by increased expression of Foxp3 and enhanced regulatory function (38).

In conclusion, we show here a key role for IFN γ and IDO in the induction of local immune privilege in allograft tolerance with an interplay between regulatory T cells and graft EC. Further studies will help to define the paradoxical role of IFN γ in the immune response and its regulation, with prospects for developing immunotherapies in a clinical setting.

References

1. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2: 816-822.
2. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: Their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18-32.

Thebault et al.

3. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199–210.
4. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531–562.
5. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T Cell development by the transcription factor *Foxp3*. *Science* 2003; 299: 1057–1061.
6. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. *Foxp3* programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330–336.
7. Walker MR, Kasprlowicz DJ, Gersuk VH et al. Induction of *FoxP3* and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4 + CD25 – T cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 1437–1443.
8. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the fork-head transcription factor *foxp3*. *Immunity* 2005; 22: 329–341.
9. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C et al. Characterization of *Foxp3* + CD4 + CD25 + and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006; 177: 5852–5860.
10. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002; 195: 1641–1646.
11. Cobbold SP, Castejon R, Adams E et al. Induction of *foxP3*+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004; 172: 6003–6010.
12. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant* 2002; 2: 745–757.
13. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 2002; 168: 5058–5069.
14. Heslan JM, Beriou G, Le Leduc JB et al. Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted *Vbeta7*-TCR rearrangements in tolerated allografts. *Transplantation* 2005; 80: 1476–1484.
15. Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, Chiffolleau E. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1185–1193.
16. Ono K, Lyndsey ES. Improved technic of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968; 57: 225–229.
17. Souillou J-P, Blandin F, Günther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984; 38: 63–67.
18. Charreau B, Cassard A, Tesson L et al. Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation* 1994; 58: 1222–1229.
19. Louvet C, Heslan JM, Merieau E, Souillou JP, Cuturi MC, Chiffolleau E. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 2004; 78: 1259–1266.
20. Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 1997; 100: 3173–3183.
21. Haspot F, Severo C, Dugast AS et al. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant* 2005; 5: 2339–2348.
22. Yoshida R, Imanishi J, Oku T, Kishida T, Hayaishi O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 129–132.
23. Cobbold SP, Adams E, Graca L et al. Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2006; 213: 239–255.
24. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: Cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 170: 3939–3943.
25. Terness P, Bauer TM, Rose L et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002; 196: 447–457.
26. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002; 107: 452–460.
27. Adam R, Russing D, Adams O et al. Role of human brain microvascular endothelial cells during central nervous system infection. Significance of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immunoregulation. *Thromb Haemost* 2005; 94: 341–346.
28. Munn DH, Zhou M, Attwood JT et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191–1193.
29. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206–1212.
30. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9: 1269–1274.
31. Beutelspacher SC, Tan PH, McClure MO, Larkin DF, Lechler RI, George AJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: Implications for the control of alloresponses. *Am J Transplant* 2006; 6: 1320–1330.
32. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749–795.
33. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 713–758.
34. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: A possible role for nitric oxide. *J Immunol* 1999; 163: 5278–5286.
35. Chen C, Lee WH, Zhong L, Liu CP. Regulatory T cells can mediate their function through the stimulation of APCs to produce immunosuppressive nitric oxide. *J Immunol* 2006; 176: 3449–3460.
36. Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, Karim M, Herber M, Wood KJ. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med* 2005; 201: 1925–1935.
37. Guillonneau C, Hill M, Hubert FX et al. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007; 117: 1096–1106.
38. Wang Z, Hong J, Sun W et al. Role of IFN-gamma in induction of *Foxp3* and conversion of CD4 + CD25 – T cells to CD4+ Tregs. *J Clin Invest* 2006; 116: 2434–2441.

2. Conclusions et Discussion

L'équipe avait précédemment montré, dans un modèle d'allogreffe cardiaque incompatible pour les molécules du CMH de classe I et II chez le rat, qu'un court traitement de 20 jours avec un analogue de la déoxyspergualine (le LF15-0195) induit une tolérance à long terme spécifique du donneur et sans signe de rejet chronique. La tolérance se caractérise par une expansion spécifique de cellules T CD4⁺CD25⁺ dans la rate et le greffon. Ces cellules sont capables de transférer la tolérance à un second receveur préalablement irradié (Chiffolleau et al. 2002b; Chiffolleau et al. 2002a; Heslan et al. 2005). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans notre modèle, l'équipe a appliqué la technique des puces à ADN. Elle avait aussi observé, dans les allogreffes tolérées, une accumulation de transcrits codant pour de nombreuses molécules cytoprotectrices telles que l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), l'hème-oxygenase-1 (HO-1), la Nitric oxide synthase (NOS) (Heslan et al. 2006) ce qui suggérait une possible coopération entre les cellules endothéliales du greffon et les cellules T régulatrices pour la mise en place d'un privilège immun local.

Dans cette étude, nous avons tout d'abord analysé chez les animaux tolérants, l'expression de la protéine Foxp3, marqueur spécifique des cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ chez le rat (Heslan et al. 2005). Pour cela, nous avons utilisé un anticorps anti-Foxp3 et nous avons observé par cytométrie de flux, une accumulation spécifique de cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (50% des cellules T CD4⁺CD25⁺) dans la rate et la greffe des animaux tolérants par rapport à des animaux en rejet ou syngéniques. Nous avons aussi constaté la présence de nombreuses cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ qui pourraient être une autre population de cellules T régulatrices ou des cellules T allogéniques activées.

L'équipe avait précédemment démontré, grâce aux puces à ADN, une augmentation de transcrits codant pour IDO, HO-1, iNOS dans les allogreffes tolérées à long terme par rapport à des allogreffes présentant des signes de rejet chronique et des greffes syngéniques (Heslan et al. 2006). Nous montrons ici par immunofluorescence que l'expression de ces molécules cytoprotectrices est confinée spécifiquement aux cellules endothéliales des vaisseaux de la greffe, de moyen calibre pour iNOS et HO-1 et de petit calibre pour IDO. Afin de déterminer si l'expression de ces molécules cytoprotectrices par les cellules endothéliales était due à une coopération avec les cellules T régulatrices ou due au traitement avec le LF15-0195, nous avons transféré les cellules T CD4⁺ d'animaux tolérants à des receveurs irradiés. De manière intéressante, nous avons observé, dans les greffons des receveurs irradiés 35 jours après la greffe, une accumulation de cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ mais aussi de cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ dont certaines sécrètent de

l'IFN γ . Cette accumulation de cellules s'accompagne d'une forte expression d'IDO spécifiquement dans les cellules endothéliales des vaisseaux du greffon. Ceci démontre une coopération entre les cellules Treg et les cellules endothéliales du greffon pour induire localement un privilège immun. Cet état de privilège permet de réguler la réponse des cellules T et ainsi maintenir la tolérance à long terme. Cependant, chez ces animaux transférés, nous n'avons pas retrouvé d'expression d'iNOS et d'HO-1 démontrant que l'induction de ces deux molécules n'est pas due à la coopération des cellules endothéliales avec les cellules T régulatrices mais plutôt aux mécanismes de protection des cellules endothéliales suite au traitement avec le LF15-0195. De plus, nous avons montré *in vivo* et *in vitro* que l'induction d'IDO dans les cellules endothéliales par les cellules T CD4⁺CD25⁺ issues d'animaux tolérants est dépendante de l'IFN γ . Dans la rate des animaux tolérants ou naïfs, l'expression de l'ARNm de l'IFN γ dans les cellules T CD4⁺CD25⁺ est très faible en comparaison à celle observée dans des cellules T CD4⁺CD25⁻ et CD8⁺. De plus, l'activation de lymphocytes T via une stimulation spécifique des alloantigènes montre que l'IFN γ est produit par des cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻, comme observé dans les greffons des animaux, 35 jours après le transfert de cellules T CD4⁺ issues d'animaux tolérants.

Suite à ces résultats, nous avons voulu tester le rôle d'IDO et de l'IFN γ dans le transfert de tolérance et nous avons montré que leur inhibition *in vivo* abolit la tolérance. Par conséquent, ces résultats démontrent que l'IFN γ et IDO jouent un rôle important dans les mécanismes de tolérance dans notre modèle. L'IFN γ a longtemps été considérée comme une cytokine proinflammatoire entraînant une réponse T de type Th1 (Boehm et al. 1997; Szabo et al. 2003). Cependant, de récentes études montrent une fonction régulatrice de l'IFN γ selon la concentration et le microenvironnement dans lequel il est produit (Willenborg et al. 1999; Sawitzki et al. 2005). En effet, une expression transitoire et précoce de l'IFN γ par les cellules Treg induites pourrait prévenir d'une réponse immunitaire agressive, telle que le rejet de greffe, en inhibant l'activation et la prolifération des cellules T naïves ou en contrôlant les mécanismes des cellules T effecteurs. Les principales propriétés anti-inflammatoires de l'IFN γ sont l'inhibition de la prolifération des cellules T et l'induction de l'apoptose (Shtrichman and Samuel 2001; Kishimoto et al. 2002; Refaeli et al. 2002). Ces propriétés anti-inflammatoires peuvent se faire directement sur les cellules T. Seules les cellules T naïves et les cellules Th2 sont sensibles à l'IFN γ car elles expriment les 2 chaînes du récepteur à l'IFN γ (Tau et al. 2000; Bernabei et al. 2001). De plus, l'IFN γ peut aussi agir directement sur les CPA en induisant l'expression d'iNOS (Atochina et al. 2001). Les CPA vont alors sécréter du NO qui entraîne l'apoptose des cellules T voisines. Un autre mécanisme immunosuppresseur est la production d'IDO par les CPA entraînant la dégradation du tryptophane et la production d'HO-1 (Mellor and Munn 1999; Oh et al. 2004).

Ces deux molécules vont ensuite inhiber la prolifération des cellules T et moduler leur activité (Hawiger et al. 2004; Moreau et al. 2009). Dans le contexte de la transplantation et plus spécifiquement dans un modèle de thérapie anti-CD4, la génération et la fonction de cellules Treg induites spécifiques d'alloantigène sont fortement diminuées chez des souris déficientes pour l'IFN γ . Ils ont aussi montré que ces cellules Treg exprimaient rapidement et de façon transitoire de faibles quantités d'IFN γ et que l'induction de tolérance par transfert adoptif était dépendante de l'IFN γ (Sawitzki et al. 2005). En 2007, une équipe de notre laboratoire a aussi montré dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat, que des cellules Treg CD8⁺ spécifiques des antigènes du donneur étaient capables d'induire un privilège immun dans la greffe par l'expression d'IDO, dépendante de l'IFN γ (Guillonnet et al. 2007).

Nous avons donc voulu savoir dans notre modèle si nos cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ sécrétaient de l'IFN γ . Malheureusement, nous n'avons pas pu détecter, par cytométrie de flux, de sécrétion d'IFN γ par ces cellules dans la rate et le greffon des animaux tolérants. Cela peut s'expliquer par une trop faible production d'IFN γ ou par un problème de cinétique. Cependant, comme je l'ai précisé plus tôt dans la discussion, 35 jours après le transfert, nous avons retrouvé dans le greffon et la rate, quelques cellules Foxp3⁻ qui exprimaient l'IFN γ . Ces cellules sont peut être des cellules T régulatrices qui n'expriment pas Foxp3 ou des cellules T effectrices qui sécrètent de faibles quantités d'IFN γ . De plus, l'inhibition de l'IFN γ , *in vitro* dans une stimulation allogénique, réduit significativement le pourcentage de cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Nous avons montré aussi que l'IFN γ était important pour la survie et l'expansion des cellules Treg induites CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Ces résultats montrent que l'IFN γ est produit par des cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ mais qu'il semble jouer un rôle dans la survie et expansion des cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. De la même façon, des études chez l'homme et la souris ont décrit que *in vitro* l'IFN γ permettait la conversion de cellules T CD4⁺CD25⁻ en cellules Treg CD4⁺ caractérisées par une augmentation de l'expression de Foxp3 et de la fonction régulatrice (Wang et al. 2006).

Grâce à ce travail, nous avons donc démontré un rôle important de l'IFN γ et d'IDO dans l'induction d'un privilège immun dans les allogreffes tolérées par la coopération des nombreuses cellules T régulatrices présentes dans le greffon et les cellules endothéliales de l'allogreffe. En effet, les cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ accumulées au niveau de la greffe induisent les cellules endothéliales à produire IDO selon un mécanisme dépendant de l'IFN γ , ce qui permet l'installation de la tolérance.

Ce travail nous a aussi permis de valider la technique de puces à ADN. En effet, nous avons confirmé l'implication dans les mécanismes de tolérance, de molécules identifiées comme étant surexprimées dans les allogreffes tolérées par les puces.

III. Caractérisation du rôle de CLEC-1 dans la tolérance

Suite aux résultats obtenus dans l'article 1, nous avons voulu étudier une autre molécule identifiée comme étant surexprimée dans les allogreffes tolérées par puces à ADN. Nous avons choisi une molécule qui est un récepteur lectine de type C nommée CLEC-1. Notre choix s'est porté sur cette molécule car elle présentait le même profil d'expression qu'HO-1 et iNOS, molécules liées à la cytoprotection des cellules endothéliales, une augmentation de l'expression dans les allogreffes tolérées et une diminution dans les allogreffes présentant du rejet chronique par rapport aux greffes syngéniques (**Figure 10**). De plus, cette molécule a été précédemment décrite chez l'homme comme étant exprimées par les cellules dendritiques et endothéliales (Sobanov et al. 2001).

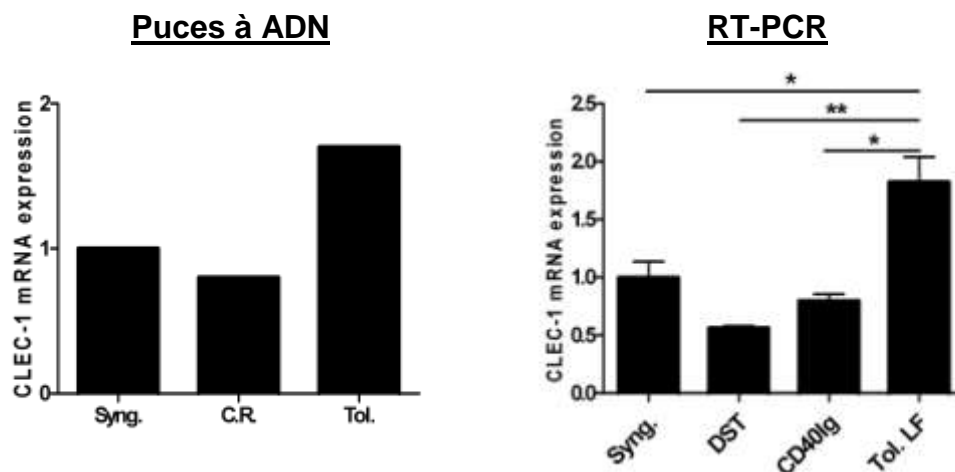


Figure 10 : Expression de l'ARNm de CLEC-1 dans les allogreffes par puces à ADN et RT-PCR quantitative.

1. La molécule CLEC-1

Les transcrits orthologues de CLEC-1 (aussi appelé CLEC1A) chez le rat, l'homme et la souris ont été identifiés. Le gène codant pour CLEC-1 chez le rat est localisé sur le chromosome 4. Ce gène est composé de 6 exons et 5 introns et le transcrit correspondant est formé de 3299 paires de bases (pb) dont seulement 783 pb dans la partie codante (**Figure 11**). La protéine correspondante est donc composée de 261 acides aminés et son poids moléculaire est estimé à 32 kDa (estimation du poids moléculaire à l'aide du logiciel ProtParam : <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

chromosome: 4; Location: 4q42

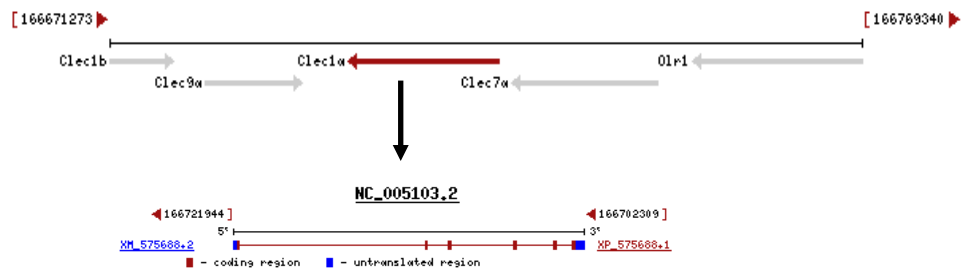


Figure 11 : Localisation chromosomique et structure du transcrit codant pour CLEC-1

CLEC-1 est un récepteur appartenant à la superfamille des "C-type lectin like receptor" localisée dans le complexe de gènes des cellules NK (Colonna et al. 2000). Cette superfamille se compose de 2 sous-familles : la famille de DCIR et celle de Dectin-1 dont CLEC-1 fait partie (**Figure 12**). Cette superfamille code pour de nombreux récepteurs possédant d'importantes fonctions immunes ou de reconnaissance de cellules modifiées par les cellules monocytaires, dendritiques ou endothéliales (DCIR, Dectin-1, Lox-1, MICL) (Sobanov et al. 2001; Kanazawa 2007). Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II qui se caractérise par un domaine extracellulaire à l'extrémité C-terminale. Une caractéristique importante des récepteurs de cette famille est le besoin de calcium pour la liaison à leurs ligands d'où le nom récepteur "C-type (Ca^{2+} -dependent) lectin". La protéine CLEC-1 ne possède pas l'acide aminé important pour la liaison du ligand carbohydrate dépendante du calcium (Sobanov et al. 2001), c'est pourquoi elle appartient à la sous famille des "C-type lectin like receptor". Dans son domaine cytoplasmique, CLEC-1 possède un résidu tyrosine qui n'est pas un motif ITIM ou ITAM donc la cascade de signalisation par cette tyrosine est inconnue pour l'instant (**Figure 13**). Le ligand de CLEC-1 et sa fonction étaient inconnus. Plusieurs membres de cette famille ont été décrits comme pouvant avoir un ligand endogène et un ligand exogène (composé pathogène). Par exemple, Dectin-1 a comme ligand le zymosan mais aussi un ligand présent sur les cellules T (Brown 2006).

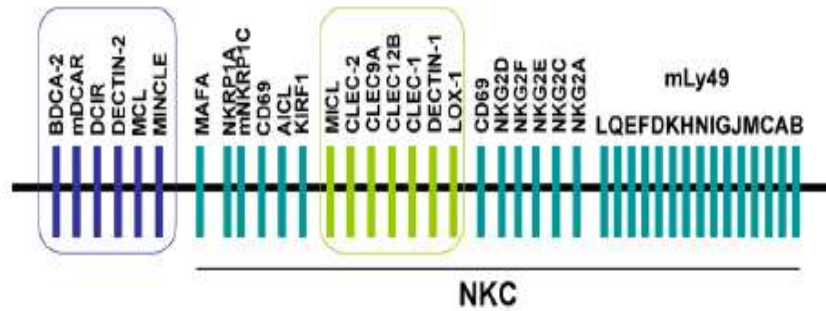


Figure 12 : Composition du complexe de gènes des cellules NK

D'après Kanazawa et al. (Kanazawa 2007)

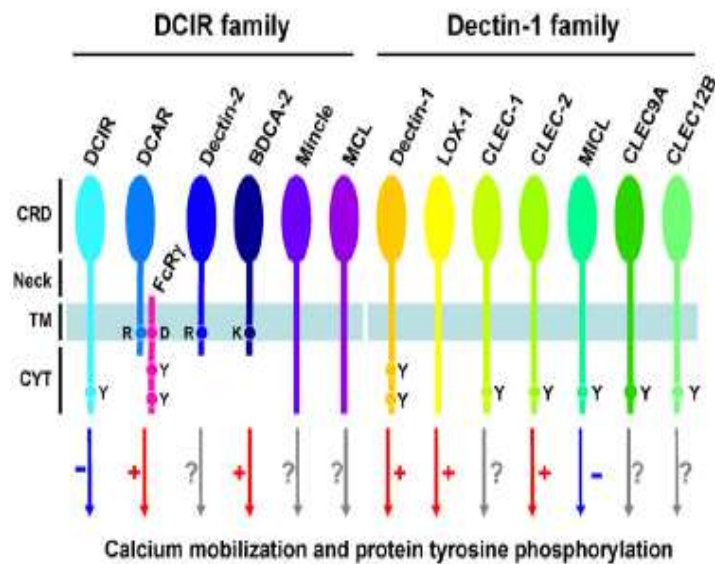


Figure 13 : Structure et signalisation des récepteurs de la superfamille des "C-type lectin receptor"

D'après Kanazawa et al. (Kanazawa 2007)

CLEC-1 a été précédemment décrite, chez l'homme, comme étant préférentiellement exprimée dans les cellules endothéliales et dendritiques (Sobanov et al. 2001). De plus, il a été suggéré que CLEC-1 aurait besoin d'une autre chaîne pour être exprimée à la membrane cellulaire (Sobanov et al. 2001). Une situation similaire a été décrite pour NKG2A et NKG2C qui ont besoin de former des hétérodimères avec le CD94 pour pouvoir être exprimés à la membrane cellulaire (Lazetic et al. 1996).

2. Article 2

“The C-type lectin-like Receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is upregulated by immuno-regulatory mediators and moderates T cell activation”

Paméla Thébault, Natacha Lhermite, Gaëlle Tilly, Laëtizia Le Texier, Thibaut Quillard, Michèle Heslan, Ignacio Anegon, Jean-Paul Soullou, Sophie Brouard, Beatrice Charreau, Maria Cristina Cuturi et Elise Chiffolleau.

Accepté dans The Journal of Immunology, en 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/1833099-10\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.1093/jimmunol.0803767

Résumé de l'article 2

Les récepteurs lectine de type C ont été récemment décrit comme jouant des rôles importants dans l'immunité et l'homéostasie car ces protéines sont capables de reconnaître des pathogènes aussi bien que des antigènes du soi. Nous avons identifié, grâce aux puces à ADN, CLEC-1, un récepteur lectine-like de type C comme étant surexprimé dans un modèle de tolérance à l'allogreffe chez le rat. Nous avons précédemment décrit, dans ce modèle, l'expression de nombreuses molécules cytoprotectrices par les cellules endothéliales du greffon ainsi que la relation entre ces cellules endothéliales et les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺.

Dans cette étude, nous avons démontré que CLEC-1 est exprimée par les cellules myéloïdes et spécifiquement par les cellules endothéliales dans les greffons tolérés. De plus, nous avons montré que l'expression de CLEC-1 peut être induite dans les cellules endothéliales par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ spécifiques d'alloantigènes. L'analyse de l'expression de CLEC-1 chez le rat naïf a permis de montrer que CLEC-1 est fortement exprimée par les cellules myéloïdes et à un niveau plus faible par les cellules endothéliales. Cette expression de CLEC-1 est diminuée par des stimuli inflammatoires tels que le LPS, l'IFN γ ou le poly I:C mais augmentée par des molécules tolérogènes telles que l'IL10 ou le TGF β . De façon intéressante, nous avons montré *in vitro* que CLEC-1 exprimée par les cellules présentatrices d'antigène module la réponse T CD4⁺ allogénique en diminuant la différenciation Th17 et favorisant le pool de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Cet effet n'est pas dû à un effet direct sur la différenciation des cellules T naïves en cellules T effectrices Th17 mais semble plutôt dû à un effet indirect de la suppression exercée par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ sur les cellules effectrices. Par ailleurs, la forte expression de CLEC-1 dans les allogreffes tolérées est associée à une faible expression d'IL17 et à la présence de nombreuses cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ qui s'accumulent dans la greffe.

En conclusion, ces résultats suggèrent que CLEC-1, exprimé par les cellules myéloïdes et endothéliales, est induit par des médiateurs immunorégulateurs et module la réponse allogénique effectrice Th17. Ainsi, CLEC-1 pourrait représenter une cible de choix pour moduler la réponse immunitaire dans le domaine de la transplantation et de l'autoimmunité.

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

Pamela Thebault, Natacha Lhermite, Gaëlle Tilly, Laëticia Le Texier, Thibaut Quillard, Michele Heslan, Ignacio Anegón, Jean-Paul Soulillou, Sophie Brouard, Beatrice Charreau, Maria-Cristina Cuturi, and Elise Chiffolleau²

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/1833099-10\$16.00

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

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

Materials and Methods

Animals and transplantation

Rats were purchased from the Centre d’Elevage Janvier and maintained in an animal facility under standard conditions according to our institutional guidelines. The studies were reviewed and approved by the appropriate institutional review committee. LEW.1W (RT1u) or LEW.1A (RT1a) rats served as heart donors, and LEW.1A rats served as recipients. For allograft tolerance models, LF15-0195 (20 days) (Fournier Laboratories) or anti-donor class II Abs were administered to recipients as previously described (12, 13). Chronic allograft rejections were induced by two donor blood transfusions (donor-specific transfusion (DST)) before transplantation or by CD40-Ig administration as previously described (8, 14). Graft function was assessed by scoring pulsations through the abdominal wall for heart or by proteinuria for kidney transplants. For in vivo transfer experiments, a total of 20×10^6 CD4⁺ T cells from LEW.1A-tolerant LF15-0195-treated recipients or from LEW.1A naïve rats were injected i.v. into LEW.1A secondary syngeneic irradiated recipients (4 Gy, whole-body irradiation (Institut Fédératif de Recherche Thérapeutique 26, Nantes, France) 1 day before transplantation) on the day of LEW.1W or LEW.1A (syngeneic) cardiac transplantation.

Antibodies

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

Generation of a polyclonal anti-rat CLEC-1 Ab

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

N-glycosidase treatment and Western blot

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

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

Immunohistology

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

Cell purification, culture, and activation

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

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

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

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

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

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

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

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

Table 1. Oligonucleotides used in this study

| Oligonucleotide | 5' to 3' Sequence |
|--------------------|---------------------------|
| Rat HPRT | |
| Forward | CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC |
| Reverse | TTCGCTGATGACACAAACATGA |
| Rat CLEC-1 | |
| Forward | TTTGGTGTGCTCGTTGGC |
| Reverse | AAGTTCACGACACAGTTTTCACGG |
| Rat FoxP3 | |
| Forward | CCCAGGAAGACAGCAACCTT |
| Reverse | CTGCTTGGCAGTGCCTTGAGAA |
| Rat IL-17 | |
| Forward | TGCTGTGCTGCTACTGAACC |
| Reverse | AACCTCCCTCAGCGTTGAC |
| Rat ROR γ t | |
| Forward | GCAGGAGCAATGGAAGTCG |
| Reverse | CGCTGAGGAAGTGGGAAAA |
| Rat IDO | |
| Forward | GCTGCCTCCCATTCGTCTT |
| Reverse | TGGGATTPCCACCATTAGAGAG |
| Rat TGF β 1 | |
| Forward | CTCAACACCTGCACAGCTCC |
| Reverse | ACGATCATGTTGGACAACTGCT |
| Human HPRT | |
| Forward | CGAGATGTGATGAAGGAGATGG |
| Reverse | CCTGTTGACTGGTCAATACAATAGC |
| Human CLEC-1 | |
| Forward | AAACAAGAAGACCTGGAATTTGC |
| Reverse | TCTTGGGCTGGTGACATCTATTA |

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

Two days following transfection, LEW.1A BMDCs were harvested and stained using anti-OX6, B7.1, or B7.2 mAbs for flow cytometry analysis or were plated (1.5 \times 10⁴ cells/ml) with LEW.1W lymph node-derived T cells in complete RPMI medium. Alternatively, LEW.1W lymph node-derived T cells or highly purified CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ T cells were labeled with CFSE (Molecular Probes). Three days later, cells were pulsed for 8 h with 0.5 μ Ci/well [methyl-³H]thymidine (Amersham), and thymidine incorporation was measured using a scintillation counter (Top-Count NXT; PerkinElmer). CFSE-labeled cells were stained with anti-TCR, anti-CD4, and intracellularly with anti-Foxp3 Abs as previously described and were analyzed by flow cytometry at day 5 of culture (10). T cells or culture supernatants were harvested at day 3 or 5 of culture for quantitative RT-PCR analysis or cytokine measurement.

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA from tissues or cells was prepared using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed as previously described (20) using a GenAmp 7700 sequence detection system and SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems). The oligonucleotides used in this study are described in Table 1. HPRT was used as an endogenous control gene to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method (20, 21) and is expressed in arbitrary units (AU).

Flow cytometry analysis

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

Cytokine assays

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

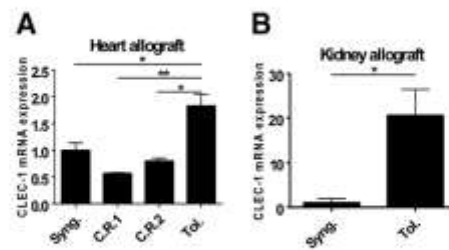


FIGURE 1. mRNA expression of CLEC-1 in rat tolerated allografts. mRNA expression of CLEC-1 was analyzed by quantitative RT-PCR. **A**, Cardiac syngeneic grafts (Syng.), chronically rejected allografts by DST treatment (C.R.1) or CD40 Ig treatment (C.R.2), or tolerated allografts by LF15-0195 treatment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

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

Statistical analysis

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

Results

CLEC-1 is overexpressed in tolerated allografts

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

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

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

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

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

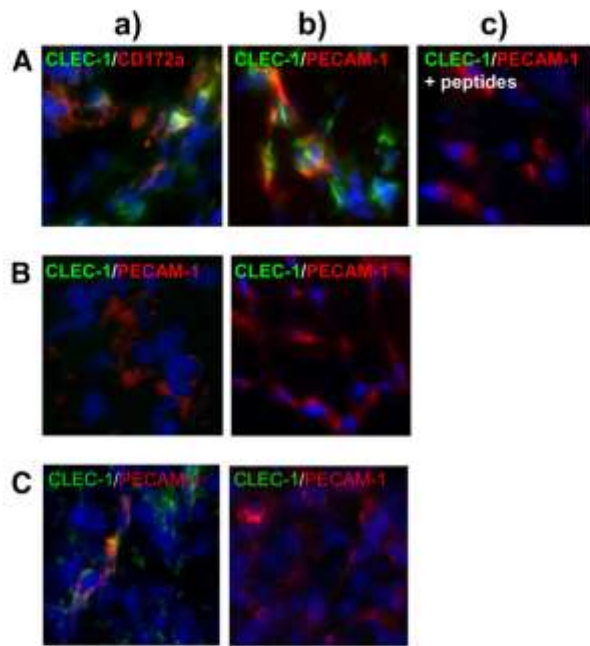


FIGURE 2. Subtypes of cells expressing CLEC-1 in tolerated allografts. Representative images of immunofluorescence merged staining for PECAM-1 (red) or CD172a (red) with CLEC-1 (green) and DAPI (blue). *A*, Long-term tolerated cardiac allografts for CLEC-1 and DAPI staining with (a) CD172a, (b) PECAM-1,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

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

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

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

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

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

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

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

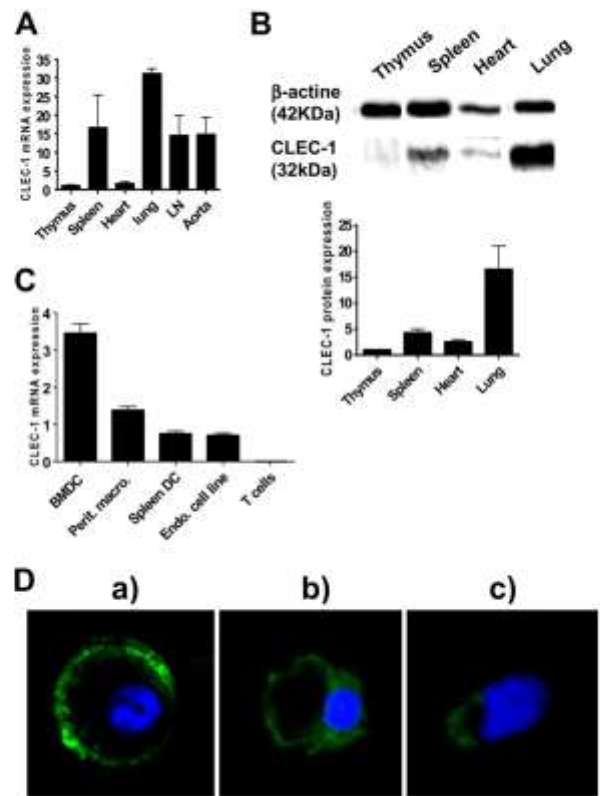


FIGURE 3. Expression of CLEC-1 in different organs and cell subtypes from naive rats. *A*, CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR in different organs from naive rats; $n = 3$ in each group. Results are expressed in AU of CLEC-1/HPRT \pm SEM compared with the reference thymus (value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

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

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

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

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

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

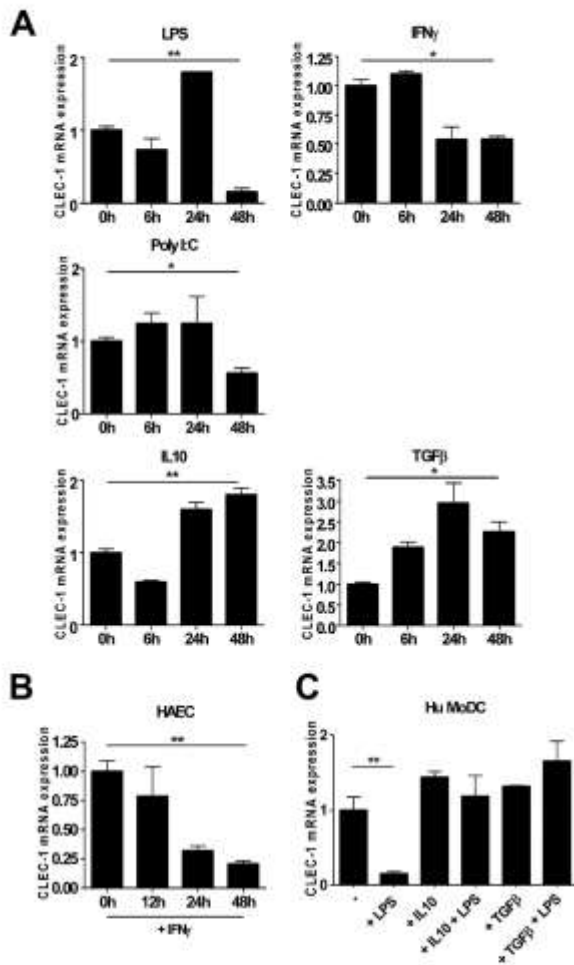


FIGURE 4. Regulation of CLEC-1 expression. *A*, Rat BMDCs were cultured for 6, 24, or 48 h with different stimuli, including LPS (1 μ g/ml), IFN- γ (50 U/ml), poly(I:C) (25 μ g/ml), rIL-10 (20 ng/ml), or rhTGF β 1 (20 ng/ml). CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR, and results are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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CLEC-1 alters T cell activation

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

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

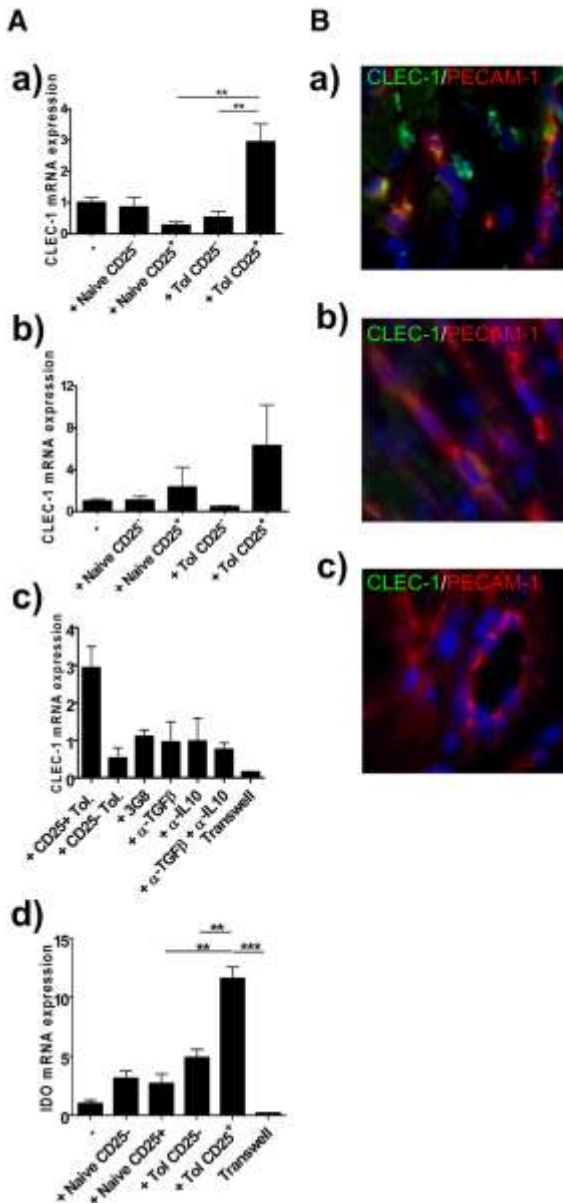


FIGURE 5. Regulation of CLEC-1 expression by alloantigen-induced regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. **A**, Rat EC lines of (a) donor (LEW.1W) or (b) recipient (LEW.1A) origin were coincubated with highly purified LEW.1A CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ T cells from naive rats or from tolerant recipients (*n* = 6).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

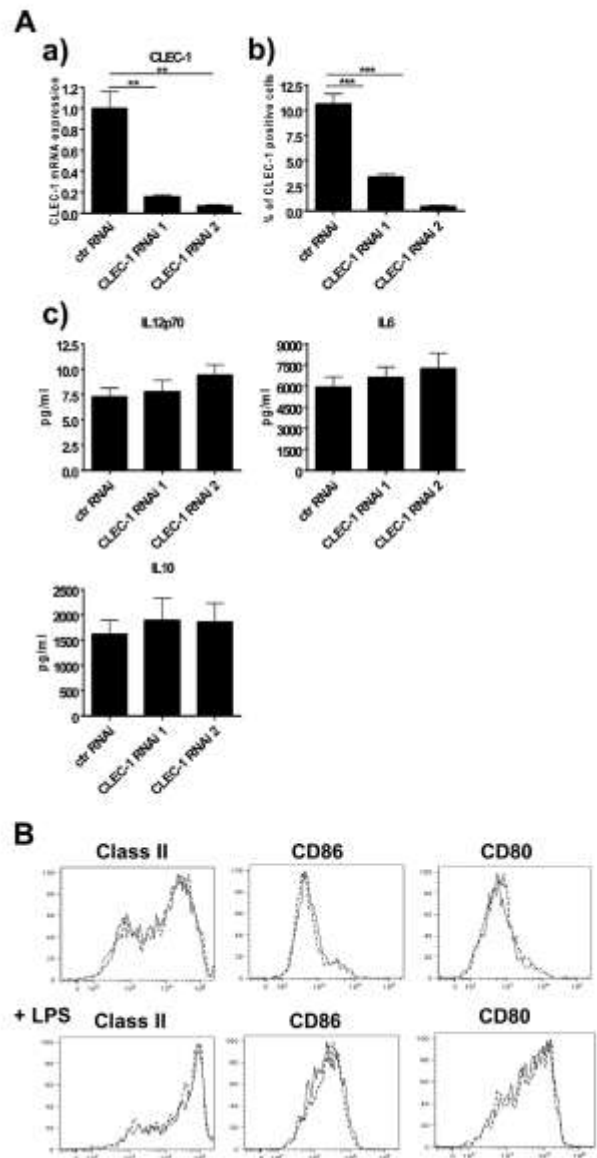


FIGURE 6. Effect of CLEC-1 inhibition on rat DC culture. Rat BMDCs were transfected with control Stealth RNAi or two CLEC-1-specific Stealth RNAi for 48 h and were stimulated with LPS (1 μg/ml) or left unstimulated. **A**, **a**, CLEC-1 mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR and expressed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

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

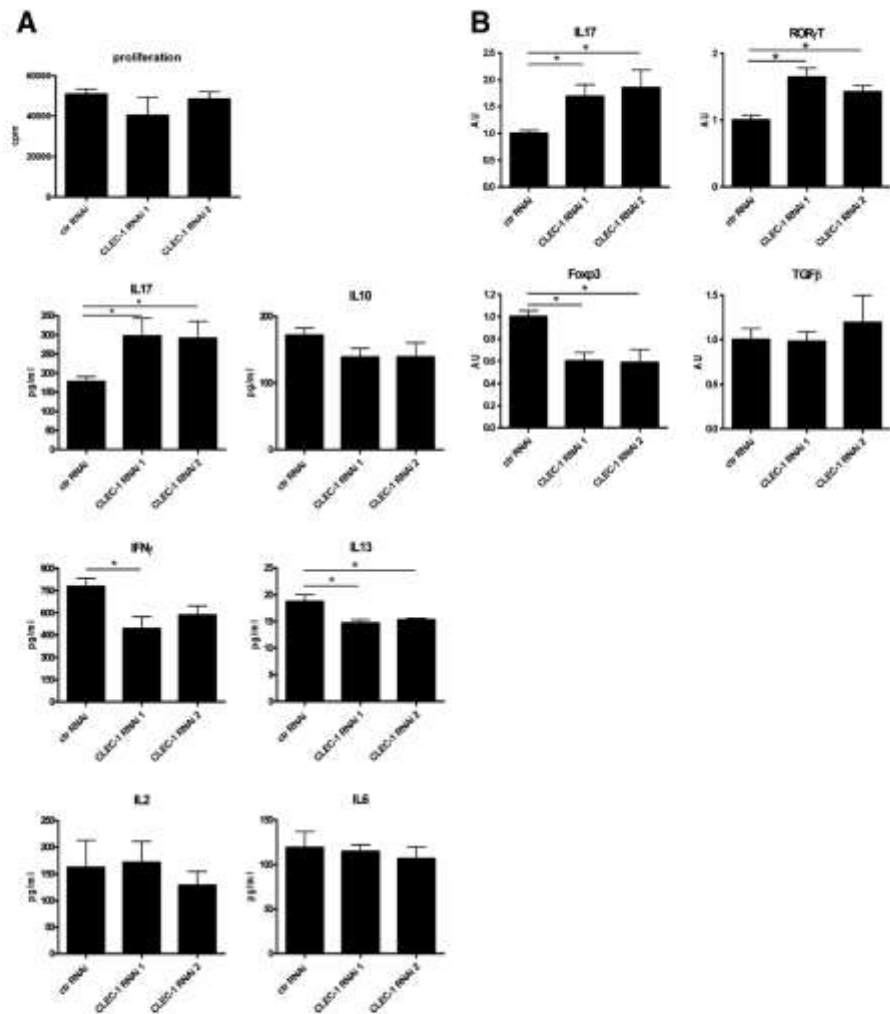


FIGURE 7. Effect of CLEC-1 inhibition on allogeneic T cell activation and cytokine production. LEW.1A rat BMDCs were transfected with control Stealth RNAi or two CLEC-1-specific Stealth RNAi constructs for 48 h and then cocultured with LEW.1W allogeneic T cells for 3 days. *A*, LEW.1W allogeneic T cell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

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

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

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

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

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

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

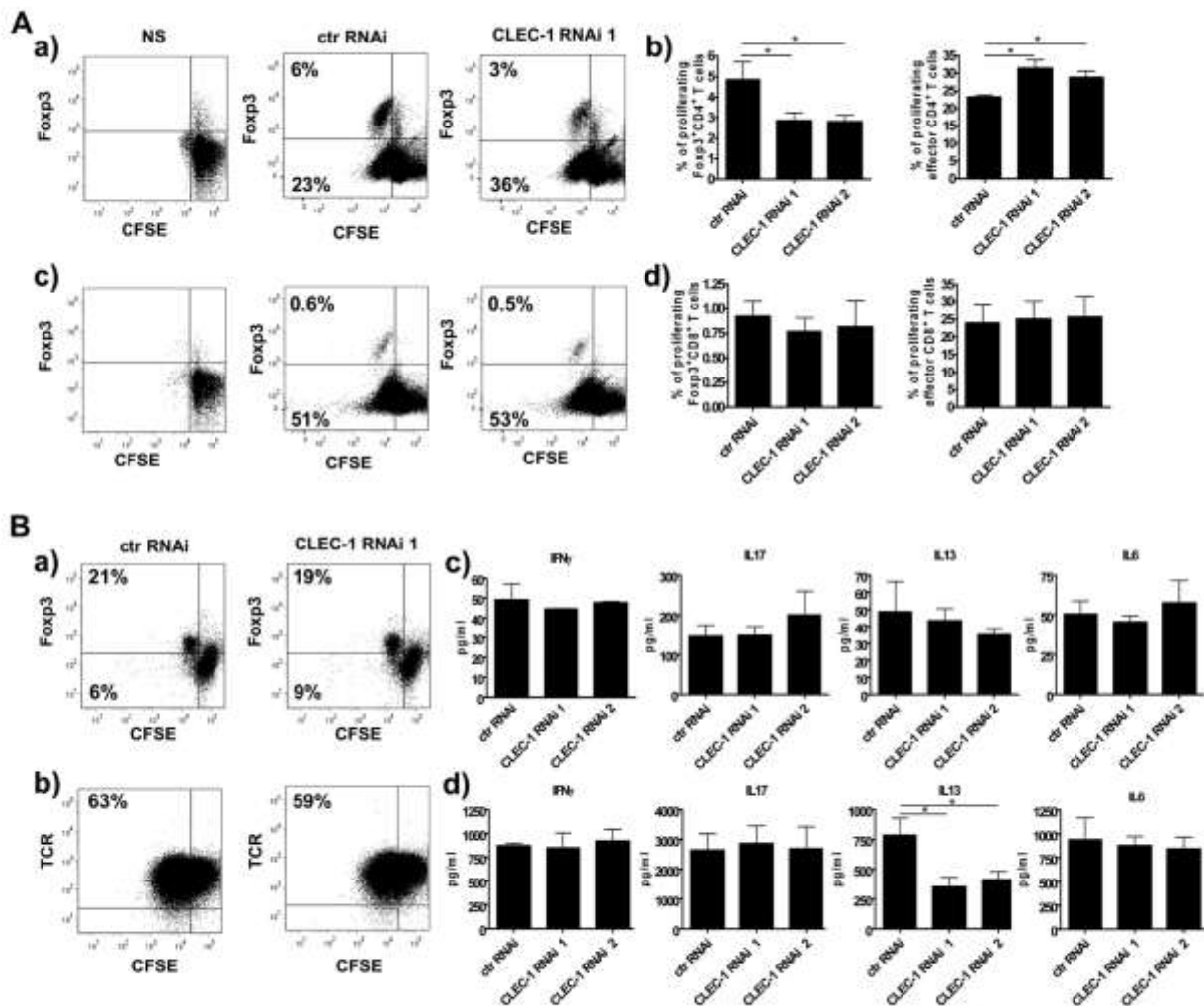


FIGURE 8. Effect of CLEC-1 inhibition on proliferation and cytokine production of regulatory CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells. LEW.1A rat BMDCs were transfected with control Stealth RNAi or two CLEC-1-specific Stealth RNAi constructs for 48 h and then cocultured with LEW.1W allogeneic T cells for 5 days.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

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

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

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

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

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

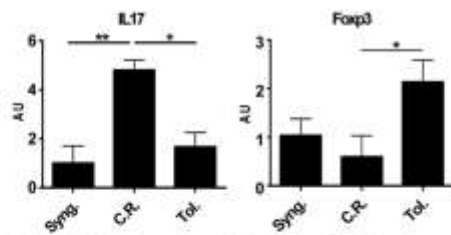


FIGURE 9. mRNA expression of IL-17 and Foxp3 in rat cardiac tolerated allografts. mRNA expression of IL-17 and Foxp3 were analyzed by quantitative RT-PCR in cardiac syngeneic grafts (Syng.), chronically rejected allografts by DST treatment (C.R.), or tolerated allografts by LF15-0195 treatment (Tol.)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

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

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

We showed herein for the first time that as for many C-type lectin receptors expressed on myeloid cells, CLEC-1 is involved in the modulation of T cell activation. For example, DCAL-2 triggering has been shown to alter cytokine production by DCs and thereby to regulate the quality of downstream T cell activation (32, 33). DCAL-1 has been described to act as a T cell costimulatory molecule, which skews CD4⁺ T cells toward a Th2 response by enhancing their secretion of IL-4 (34). Dectin-1, an activating receptor, is shown to promote the activation of DCs to instruct the differentiation of IL-17-producing effector CD4⁺ T cells and CD8⁺ CTLs and to convert regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells into IL-17 producer cells (2, 7, 35). Moreover, AICL receptor expressed on myeloid cells and Nkp80 expressed on NK and memory CD8⁺ T cells are both activating C-type lectin-like receptors interacting with each other, and their mutual engagement promotes reciprocal activation and cytokine release at sites of inflammation (36). CLEC-1 triggering may modulate directly activation of the DCs and ECs and/or give a regulatory signal to T cells.

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

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Robinson, M. J., D. Sancho, E. C. Slack, S. LeibundGut-Landmann, and C. Reis e Sousa. 2006. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat. Immunol.* 7: 1258–1265.
2. Leibundgut-Landmann, S., F. Osorio, G. D. Brown, and C. Reis e Sousa. 2008. Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood* 112: 4971–4980.
3. Sobanov, Y., A. Bernreiter, S. Derdak, D. Mechtcheriakova, B. Schweighofer, M. Duchler, F. Kalthoff, and E. Hofer. 2001. A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocyte, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *Eur. J. Immunol.* 31: 3493–3503.
4. Oka, K., T. Sawamura, K. Kikuta, S. Iwakawa, N. Kurse, T. Kita, and T. Masaki. 1998. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9535–9540.
5. Theriault, J. R., S. S. Mumbula, T. Sawamura, M. A. Stevenson, and S. K. Calderwood. 2005. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett.* 579: 1951–1960.
6. Renie, G., F. Maingrette, and L. Li. 2007. Diabetic vasculopathy and the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). *Curr. Diabetes Rev.* 3: 103–110.
7. LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighofer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Rutland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8: 630–638.
8. Heslan, J. M., K. Renaudin, P. Thebault, R. Josien, M. C. Cuturi, and E. Chiffolleau. 2006. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 82: 1185–1193.
9. Heslan, J. M., G. Beriou, J. B. Le Luduec, C. Guillonnet, I. Aneqon, J. P. Souillou, M. C. Cuturi, and E. Chiffolleau. 2005. Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vβ7-TCR rearrangements in tolerated allografts. *Transplantation* 80: 1476–1484.
10. Thebault, P., T. Condamine, M. Heslan, M. Hill, I. Bernard, A. Saoudi, R. Josien, I. Aneqon, M. C. Cuturi, and E. Chiffolleau. 2007. Role of IFNγ in allograft tolerance mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am. J. Transplant.* 7: 2472–2482.
11. Coloma, M., J. Samaridis, and L. Angman. 2000. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 697–704.
12. Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Souillou, and M. C. Cuturi. 2002. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation: evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am. J. Transplant.* 2: 745–757.
13. Jovanovic, V., A. S. Dugast, J. M. Heslan, J. Ashton-Chess, M. Giral, N. Degauque, A. Moreau, A. Pullier, E. Chiffolleau, D. Lair, et al. 2008. Implication of matrix metalloproteinase 7 and the noncanonical wingless-type signaling pathway in a model of kidney allograft tolerance induced by the administration of anti-donor class II antibodies. *J. Immunol.* 180: 1317–1325.
14. Guillonnet, C., V. Aubry, K. Renaudin, C. Seveno, C. Usal, K. Tezuka, and I. Aneqon. 2005. Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation* 80: 255–263.
15. Peche, H., M. Heslan, C. Usal, S. Amigorena, and M. C. Cuturi. 2003. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 76: 1503–1510.
16. Chiffolleau, E., J. M. Heslan, M. Heslan, C. Louvet, T. Condamine, and M. C. Cuturi. 2007. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4⁺ T cell and

- modulates suppressive activity mediated by CD4⁺CD25⁺ T cell. *Int. Immunol.* 19: 193–201.
17. Charreau, B., A. Cassard, L. Tesson, B. Le Mauff, J.-M. Navenot, D. Blanchard, D. Lublin, J. P. Souillou, and I. Aneqon. 1994. Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation* 58: 1222–1229.
18. Le Bas-Bernardet, S., M. Hourmant, S. Coupel, J. D. Bignon, J. P. Souillou, and B. Charreau. 2003. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am. J. Transplant.* 3: 167–177.
19. Spisek, R., L. Bretonneau, I. Barbieux, K. Mefflah, and M. Gregoire. 2001. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 417–427.
20. Louvet, C., J. M. Heslan, E. Merieau, J. P. Souillou, M. C. Cuturi, and E. Chiffolleau. 2004. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8⁺ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 78: 1259–1266.
21. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCTT} method. *Methods* 25: 402–408.
22. Degaque, N., D. Lair, A. Dupont, A. Moreau, G. Roussey, F. Moizant, F. X. Hubert, C. Louvet, M. Hill, F. Haspot, et al. 2006. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103⁺ cells. *J. Immunol.* 176: 3915–3922.
23. Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Souillou, and M. C. Cuturi. 2002. Role for thymic and splenic regulatory CD4⁺ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J. Immunol.* 168: 5058–5069.
24. Klatt, A. R., G. Klinger, D. Zech, B. Paul-Klausch, J. H. Renno, J. Schmidt, G. Malchau, and K. Wielckens. 2007. RNAi in primary human chondrocytes: efficiencies, kinetics, and non-specific effects of siRNA-mediated gene suppression. *Biologicals* 35: 321–328.
25. Kanazawa, N. 2007. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J. Dermatol. Sci.* 45: 77–86.
26. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1033–1036.
27. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238.
28. Chang, C., R. Ciubotariu, J. Manavalan, J. Yuan, A. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera, and N. Suci-Foca. 2002. Tolerization of dendritic cells by T_H cells: the crucial role of inhibitory ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 3: 237–243.
29. Liu, J., Z. Liu, P. Witkowski, G. Vlad, J. S. Manavalan, L. Scotto, S. Kim-Schulze, R. Cortesini, M. A. Hardy, and N. Suci-Foca. 2004. Rat CD8⁺FOXP3⁺ T suppressor cells mediate tolerance to allogeneic heart transplants, inducing PIR-B in APC and rendering the graft invulnerable to rejection. *Transplant Immunol.* 13: 239–247.
30. Rao, D. A., R. E. Eid, L. Qin, T. Yi, N. C. Kirkiles-Smith, G. Tellides, and J. S. Pober. 2008. Interleukin (IL)-1 promotes allogeneic T cell intimal infiltration and IL-17 production in a model of human artery rejection. *J. Exp. Med.* 205: 3145–3158.
31. Yuan, X., J. Paez-Cortez, I. Schmitt-Knosalla, F. D’Addio, B. Mfarrej, M. Domarumma, A. Habicht, M. R. Clarkson, J. Iacomini, L. H. Glimcher, et al. 2008. A novel role of CD4⁺Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J. Exp. Med.* 205: 3133–3144.
32. Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197: 1107–1117.
33. Chen, C. H., H. Floyd, N. E. Olson, D. Magaletti, C. Li, K. Draves, and E. A. Clark. 2006. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood* 107: 1459–1467.
34. Ryan, E. J., A. J. Marshall, D. Magaletti, H. Floyd, K. E. Draves, N. E. Olson, and E. A. Clark. 2002. Dendritic cell-associated lectin-1: a novel dendritic cell-associated, C-type lectin-like molecule enhances T cell secretion of IL-4. *J. Immunol.* 169: 5638–5648.
35. Osorio, F., S. LeibundGut-Landmann, M. Lochner, K. Lahl, T. Sparwasser, G. Eberl, and C. Reis e Sousa. 2008. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur. J. Immunol.* 38: 3274–3281.
36. Kuttrauf, S., S. Koch, A. Kelp, G. Pawelec, H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2009. NKG80 defines and stimulates a reactive subset of CD8 T cells. *Blood* 113: 358–369.

3. Discussion

Grâce aux puces à ADN, l'équipe a identifié CLEC-1 comme étant surexprimée dans les allogreffes tolérées. Nous avons confirmé, par RT-PCR quantitative, la surexpression de CLEC-1 dans les allogreffes tolérées à long terme par comparaison à des allogreffes présentant des signes de rejet chronique ou des greffes syngéniques.

Nous avons aussi regardé l'expression de CLEC-1 dans un autre modèle de tolérance développé dans le laboratoire. Il s'agit d'un modèle de transplantation rénale dans lequel la tolérance est induite par un anticorps anti-Classe II du donneur (Degauque et al. 2006). De manière intéressante, nous avons aussi observé une surexpression de CLEC-1 dans ce modèle de tolérance par rapport à des greffes rénales syngéniques. La surexpression de CLEC-1 dans plusieurs modèles de tolérance à l'allogreffe montre que CLEC-1 n'est pas une molécule spécifique de notre modèle de tolérance induite par le LF15-0195 et suggère un rôle de CLEC-1 dans les mécanismes régulateurs.

CLEC-1 a été précédemment décrite chez l'homme comme étant exprimée dans les poumons et par les cellules endothéliales et dendritiques (Colonna et al. 2000; Sobanov et al. 2001). Pour la première fois chez le rat, nous avons démontré une forte expression de CLEC-1 par les cellules myéloïdes immatures et à un niveau moindre par les cellules endothéliales. Aucune expression de CLEC-1 n'a été observée dans les cellules T. Le profil d'expression de CLEC-1 chez le rat est donc en accord avec celui précédemment décrit chez l'homme. Grâce à un anticorps polyclonal que nous avons généré, nous avons montré que CLEC-1 était exprimée à la membrane des cellules myéloïdes et endothéliales.

Dans les allogreffes tolérées, nous n'avons observé aucun comarquage de CLEC-1 avec un marqueur de cellules T, confirmant les résultats obtenus par RT-PCR quantitative. Cependant, nous avons constaté une expression de CLEC-1 par des groupes de cellules myéloïdes et par les cellules endothéliales des vaisseaux. Par ailleurs, l'expression de CLEC-1 dans les cellules endothéliales n'a pas été observée sur des coupes de greffons en rejet chronique ou syngéniques démontrant que l'expression de CLEC-1 par ces cellules est spécifique au modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque et rénale.

De façon intéressante, nous avons démontré que l'expression de CLEC-1 est diminuée par des stimuli inflammatoires tels que le LPS, l'IFN γ et le Poly I:C alors que des molécules tolérogènes comme l'IL10 et le TGF β augmentent l'expression de CLEC-1 et rendent les cellules résistantes à la diminution de CLEC-1 induite par le LPS. Ces résultats suggèrent un rôle important de CLEC-1 dans la régulation de la réponse immunitaire.

Nous avons précédemment montré une expression spécifique d'IDO, HO-1 et iNOS dans les cellules endothéliales des vaisseaux des allogreffes tolérées ainsi qu'une

coopération des cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ avec les cellules endothéliales pour induire l'expression de ces molécules et permettre l'installation d'une tolérance à long terme (Heslan et al. 2006; Thebault et al. 2007). Dans cette étude, nous avons montré que les cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ d'animaux tolérants mais pas celles d'animaux naïfs augmentaient *in vitro* l'expression de CLEC-1 dans les cellules endothéliales du même haplotype que le donneur. L'effet des cellules Treg sur les cellules endothéliales nécessite un contact entre ces deux populations cellulaires, comme pourIDO. De plus, nous avons montré *in vivo* que le transfert de cellules T CD4⁺ d'animaux tolérants permet l'induction de l'expression de CLEC-1 spécifiquement dans les cellules endothéliales de la greffe. Nous n'avons observé aucune expression de CLEC-1 dans les cellules endothéliales suite aux transferts de cellules T CD4⁺ d'animaux tolérants ou de naïfs à des receveurs de greffes syngéniques, démontrant l'allospécificité de cette induction. La forte expression de CLEC-1 dans les cellules endothéliales du greffon pourrait, comme pourIDO, jouer un rôle dans la tolérance.

Afin d'étudier la fonction de CLEC-1, nous avons utilisé des stealth siRNA non chevauchants. Ces siRNA ont été décrit comme étant moins immunogènes et induisant une inhibition plus stable dans le temps (Klatt et al. 2007). Nous avons d'abord vérifié la bonne inhibition de l'expression de CLEC-1 avec ces siRNA. Pour cela, nous avons transfecté des BMDC pendant 48h et nous avons obtenu une inhibition de l'expression de CLEC-1 supérieure à 80% avec deux des trois siRNA par rapport au siRNA contrôle. L'étude de l'effet de l'inhibition de CLEC-1 dans les BMDC avec les siRNA, nous a permis de montrer que CLEC-1 ne modifiait pas le phénotype de ces cellules (ClassII, CD80 et CD86), ni leur sécrétion de cytokines induite par le LPS (IL6, IL12p70 et IL10). Ce résultat pourrait être du à l'absence de liaison de CLEC-1 avec son ligand (non exprimé par les BMDC) et donc à l'absence de signalisation intracellulaire. Afin d'étudier l'effet de CLEC-1 sur la réponse lymphocytaire, nous avons réalisé des réactions lymphocytaires mixtes avec des BMDC matures (stimulées par le LPS) transfectées avec les siRNA spécifiques de CLEC-1 ou contrôle et des cellules T spléniques. De manière intéressante, nous avons observé *in vitro* que CLEC-1 dans les BMDC altère la réponse des cellules T CD4⁺ allogénique en diminuant la différenciation des cellules Th17 et en augmentant le nombre de cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer ce résultat. En effet, l'inhibition de l'expression de CLEC-1 pourrait soit directement augmenter la différenciation des cellules T naïves en cellules Th17, soit diminuer le nombre de cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, soit permettre la conversion des cellules T régulatrices en cellules effectrices Th17. Pour tester ces hypothèses, nous avons purifié des cellules T CD4⁺CD25⁺ et CD4⁺CD25⁻ que nous avons mis en culture avec les BMDC matures transfectées. Malheureusement, nous n'avons observé ni de modification de la

différenciation des Th17 avec des cellules T CD4⁺CD25⁻, ni de différence de prolifération des cellules T CD4⁺CD25⁺ purifiées. Nous pouvons donc penser que l'effet observé avec les cellules T totales n'est pas du à une conversion des cellules Treg en cellules Th17, ni à un effet direct sur la différenciation des Th17 mais plutôt à une diminution de la capacité suppressive des cellules T régulatrices ce qui permet l'expansion des cellules Th17. Une autre hypothèse serait que la liaison de CLEC-1 avec son ligand sur les cellules T régulatrices modifierait la fonction des cellules dendritiques qui en retour diminuerait la différenciation des Th17.

Une cytokine clé dans la différenciation des cellules Th17 et Treg Foxp3⁺ est l'IL6. En effet, des équipes ont montré que l'IL6 apportait aux cellules T effectrices CD4⁺CD25⁻ une résistance à la suppression des cellules Treg (Pasare and Medzhitov 2003) et que l'IL6 empêchait la différenciation en cellules Treg (Bettelli et al. 2006). Cependant, nous n'avons retrouvé aucune modification d'expression de cette cytokine dans les cultures *in vitro*, suggérant l'action de d'autres facteurs dans la régulation de la balance Teff/Treg. D'autres récepteurs de la famille de CLEC-1 ont été décrits comme étant impliqués dans la modulation de la réponse T. En effet, Dectin-1 qui est un récepteur activateur, induit l'activation des cellules dendritiques favorisant la différenciation des cellules T CD4⁺ en Th17 (Levings et al. 2005) et des cellules T CD8⁺ en cellules cytotoxiques (Leibundgut-Landmann et al. 2008). Dectin-1 a aussi été montré comme induisant la conversion des cellules T régulatrices en Th17 (Osorio et al. 2008). Par conséquent, la régulation de la réponse allogénique des cellules Th17 par la surexpression de CLEC-1 dans les cellules endothéliales et dendritiques pourrait contribuer à l'installation d'une tolérance à long terme et ainsi prévenir du rejet chronique. En effet, il a été montré que les cellules endothéliales humaines pouvaient par l'intermédiaire de l'IL1 α activer la production d'IL17 et que les cellules Th17 participaient au rejet de la greffe dans un modèle expérimental de rejet chronique (Rao et al. 2008).

De manière intéressante, lors des MLR réalisées avec les cellules T totales et les cellules T CD4⁺CD25⁻ purifiées, nous avons observé une diminution de l'expression de l'IL13, cytokine spécifique des cellules T de type Th2, lorsque CLEC-1 était inhibé dans les BMDC par rapport au siRNA contrôle. Ces résultats démontrent un effet direct de CLEC-1 sur la différenciation des cellules T effectrices en Th2.

Ce travail nous a permis de mieux caractériser la molécule CLEC-1. En effet, nous montrons, pour la première fois chez le rat, que CLEC-1 est surexprimée dans les allogreffes tolérées par rapport aux allogreffes présentant des signes de rejet chronique et aux greffes syngéniques. Nous avons aussi démontré que CLEC-1 est exprimée par de nombreuses cellules myéloïdes et les cellules endothéliales des vaisseaux dans les greffons tolérés. De

plus, son expression est augmentée par des médiateurs tolérogènes (IL10 et TGF β) mais aussi par les cellules Treg CD4⁺CD25⁺. L'étude de la fonction de CLEC-1 nous a permis de montrer que CLEC-1 agit comme un récepteur inhibiteur capable de réguler la réponse effectrice Th17 par un effet sur les cellules Treg. L'ensemble de ces résultats suggère que CLEC-1 pourrait être utilisée comme outil thérapeutique dans le contexte de la transplantation ou de l'autoimmunité.

4. Perspectives

4.1. Chez le rat

Peu de chose étant connue sur la molécule CLEC-1 et peu d'outils étant disponibles, nous avons commencé à générer une protéine de fusion comprenant le domaine extracellulaire de CLEC-1 de rat couplé à un fragment Fc IgG2 murin (48kDa) muté sur 3 acides aminés afin d'éviter la fixation de la protéine de fusion sur les récepteurs Fc présents sur les CPA et la fixation au complément (**Figure 14**).

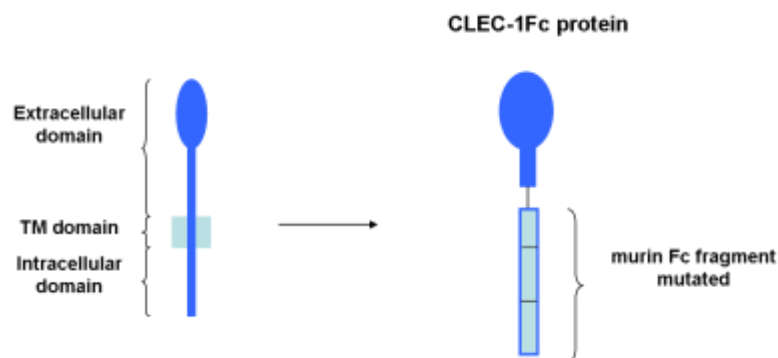


Figure 14 : Schéma de la construction de la protéine de fusion.

Nous avons intégré cette construction dans un vecteur pFUSE contenant le peptide signal de sécrétion de l'IL2 puis nous avons transfecté des cellules COS (clones transitoires) ou des CHO (clones stables). La vérification de la bonne production de notre protéine de fusion a été faite par Western blot en condition non réduite à l'aide d'un anticorps anti-Fc. Nous observons une bande d'environ 100 kDa correspondante à la protéine de fusion sous forme dimérique (**Figure 15**). En effet, une IgG fonctionnelle est sécrétée sous forme d'homodimère reliée par des ponts disulfures.

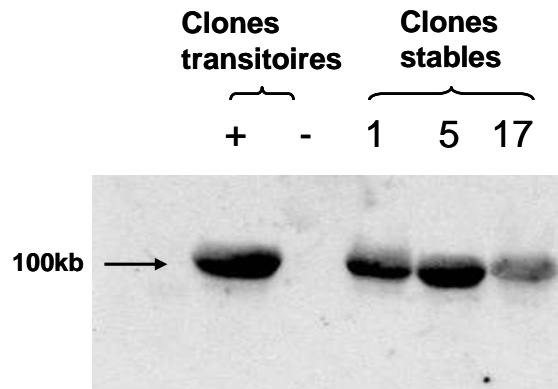


Figure 15 : Etude de l'expression de la protéine de fusion dans les clones stables et transitoires par Western blot

L'expression de la protéine de fusion CLEC-1-Fc a été quantifiée par la technique de Western Blot en condition dénaturée dans les surnageants de cellules COS (clones transitoires) transfectées (+) ou non (-) et des CHO (clones stables) transfectées.

La prochaine étape pour l'obtention de la protéine de fusion est la purification des IgG2 sur colone de sépharose. Une fois produite en grande quantité, cette protéine de fusion pourra nous permettre de déterminer les cellules qui porte le ligand de CLEC-1 par cytométrie de flux. L'identification du ligand se fera par immunoprécipitation de la protéine de fusion avec un lysat de cellules spléniques, suivi d'un gel 2D et du séquençage par spectrométrie de masse. Cette protéine nous permettra aussi de bloquer *in vitro* et *in vivo* l'interaction de CLEC-1 avec son ligand afin de confirmer les résultats obtenus avec les siRNA (forme soluble antagoniste) et d'étudier l'effet dans des systèmes d'immunisation ou sur l'induction de tolérance en transplantation.

L'équipe a aussi pour but de générer un anticorps monoclonal anti-CLEC-1 de rat qui permettra d'analyser l'expression de CLEC-1 par cytométrie de flux. Par ailleurs, cet anticorps pourra aussi permettre de déterminer la fonction de CLEC-1 sur les cellules dendritiques et endothéliales en servant d'agoniste.

4.2. Chez la souris

L'étude de CLEC-1 dans le modèle souris est nécessaire afin d'approfondir la fonction et les mécanismes d'action de CLEC-1. En effet, plus d'outils sont à notre disposition chez la souris.

Pour commencer, nous avons confirmé l'efficacité de nos siRNA sur des BMDC de souris, car deux siRNA sur les trois cross-matchent parfaitement avec le CLEC-1 de souris. Nous avons obtenu une très forte inhibition de CLEC-1 avec ces siRNA (**Figure 16**).

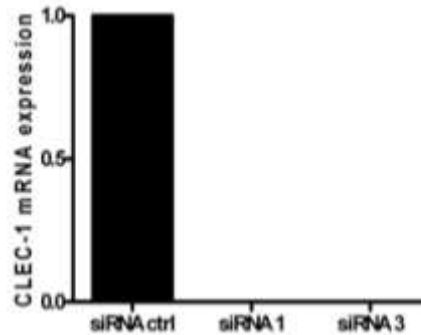


Figure 16 : Expression de l'ARNm de CLEC-1 dans des BMDC de souris transfectées avec les siRNA CLEC-1 et le siRNA contrôle.

Les BMDC ont été obtenues par culture de la moelle osseuse de souris en présence de GMCSF durant 8 jours. Au 8^{ème} jour de culture, 2×10^6 BMDC adhérentes ont été transfectées avec de la lipofectamine et le siRNA contrôle ou les siRNA spécifiques de CLEC-1 pendant 48h. Les ARN totaux ont ensuite été isolés et analysés par RT-PCR quantitative pour l'expression de CLEC-1. L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU).

L'équipe utilisera ensuite ces BMDC transfectées dans des réactions lymphocytaires mixtes (MLR) pour étudier l'effet de CLEC-1 sur la différenciation Th1, Th2, Th17 et Treg par FACS intracellulaire. Pour cela, ils utiliseront les souris transgéniques possédant des cellules T transgéniques spécifiques du peptide de l'ovalbumine (OT-I pour les T CD8⁺ et OT-II pour les T CD4⁺). Ils pourront ainsi analyser de façon plus précise l'expression de l'IL17, l'IL10, l'IFN γ et le Foxp3 par FACS intracellulaire.

4.3. Chez l'homme

Afin de savoir si CLEC-1 pourrait être un bon outil prédictif ou diagnostique de la tolérance ou du rejet chronique, nous avons regardé l'expression de CLEC-1 dans le sang d'animaux naïfs, en rejet chronique ou tolérants (**Figure 17**).

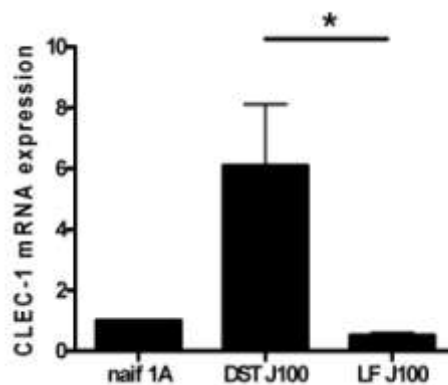


Figure 17 : Expression de CLEC-1 dans le sang de rats greffés.

Le sang d'animaux naïfs, d'animaux ayant des allogreffes avec des signes de rejet chronique (DST) et d'animaux tolérants (LF) 100 jours après la transplantation, a été prélevé par ponction cardiaque. L'ARN des cellules du sang a ensuite été isolé et analysé par RT-PCR quantitative pour l'expression

de CLEC-1. L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU).

Malheureusement, l'expression de CLEC-1 n'est pas diminuée dans le sang de rats greffés en rejet chronique mais au contraire, augmentée par rapport aux rats naïfs et tolérants. Il ne semble donc pas que CLEC-1 soit un marqueur sanguin prédictif de la tolérance. Il serait cependant intéressant de regarder l'expression de CLEC-1 dans le sang et les biopsies de patients tolérants et en rejet chronique. Pour analyser l'expression de CLEC-1 dans les biopsies et plus particulièrement dans les cellules endothéliales, l'équipe pourra utiliser un anticorps monoclonal anti-CLEC-1 commercialisé par R&D system.

L'équipe souhaite aussi générer une protéine de fusion chez l'homme afin de confirmer les résultats que nous obtiendrons chez le rat (identification du ligand, test *in vitro*...).

Pour finir, l'équipe déterminera s'il existe une forme soluble de CLEC-1, comme pour Lox-1 (Biocca et al. 2008) obtenue par épissage alternatif ou par clivage des protéases. Cette forme soluble pourrait être dosée dans le sang des patients et pourrait servir de biomarqueur de la tolérance ou du rejet chronique. Nous avons d'abord analysé par PCR les différents transcrits alternatifs possibles présents chez le rat, cependant nous n'avons pas observé de transcrits solubles (absence du domaine transmembranaire) chez le rat.

Toutes ces études chez l'homme permettront peut-être un jour l'utilisation de CLEC-1 comme outils thérapeutique ou diagnostic en transplantation.

IV. Schéma récapitulatif des mécanismes régulateurs dans le modèle de tolérance induite par le LF15-0195

La figure 18 propose un essai de synthèse des différentes données acquises par l'étude des nouveaux médiateurs et des mécanismes impliqués dans le modèle de tolérance induite par le traitement LF15-0195.

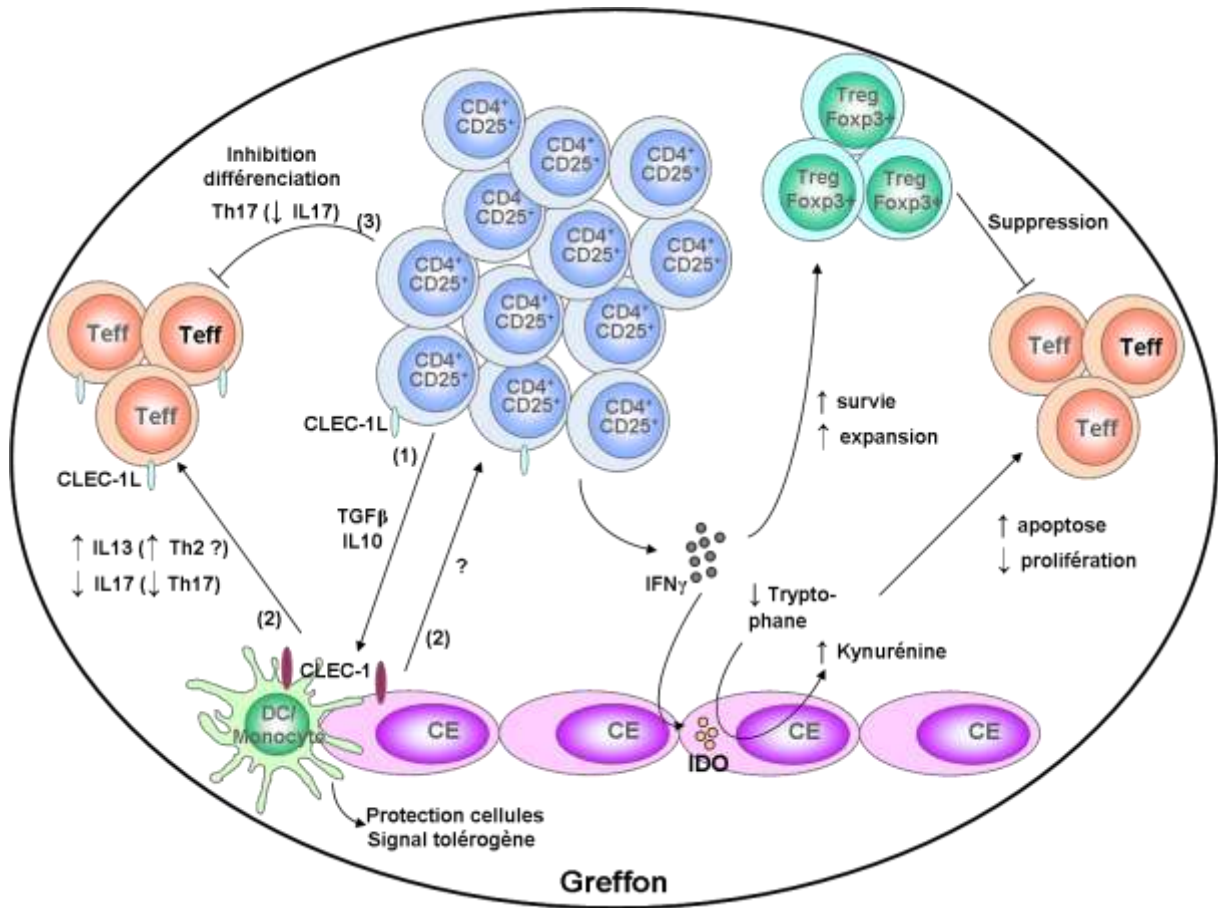


Figure 18 : Schéma des mécanismes impliqués dans la tolérance induite par le traitement LF15-0195.

B. Modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque par l'administration de cellules dendritiques immatures syngéniques et un traitement immunosuppresseur sous-optimal avec le LF15-0195

Les cellules dendritiques sont des régulateurs clés du devenir de la réponse immunitaire, capables d'induire l'activation du système immunitaire mais aussi la tolérance envers les antigènes qu'elles présentent. Les propriétés tolérogènes des cellules dendritiques ont conduits différents groupes à étudier leur capacité à moduler les réponses envers les allogreffes.

L'injection, plusieurs jours avant la transplantation, de cellules dendritiques du même haplotype que le donneur dérivées de la moelle osseuse (BMDC) immatures (Fu et al. 1997; Lu et al. 1997) ou de sous-populations de cellules dendritiques spléniques spécialisées immatures ou matures (O'Connell et al. 2002) a permis de moduler la réactivité anti-donneur et de prolonger la survie de greffe chez la souris. D'autres approches sont basées sur la présentation des antigènes du donneur dans le contexte du CMH du receveur. L'administration de cellules dendritiques du receveur préalablement chargées avec les antigènes du donneur a aussi montré des effets bénéfiques sur la survie de la greffe (Garrovillo et al. 1999; Ali et al. 2000; Garrovillo et al. 2001; Turnquist et al. 2007).

De plus, une étude chez des volontaires sains a montré que l'injection de cellules dendritiques immatures chargées avec un peptide allogénique permet *in vivo* une inhibition spécifique de la fonction des cellules effectrices spécifiques du peptide (Dhodapkar et al. 2001).

Depuis quelques années, notre équipe s'est intéressée à étudier chez le rat l'effet de l'administration de BMDC immatures syngéniques sur la survie d'allogreffe cardiaque (Beriou et al. 2005; Peche et al. 2005).

I. Les avantages des stratégies basées sur l'administration de cellules dendritiques autologues

Les stratégies thérapeutiques basées sur l'administration de cellules dendritiques autologues présentent de nombreux avantages. Tout d'abord, contrairement aux cellules dendritiques du donneur, les cellules dendritiques autologues ne sont pas reconnues et donc pas détruites par des réponses allospécifiques. D'un point de vue thérapeutique, ces cellules peuvent être utilisées en clinique dans des protocoles de transplantation à partir de cadavre.

En effet, sauf dans le cas de greffe entre donneur vivant, le donneur n'est pas connu avant la transplantation. Les stratégies basées sur l'injection de cellules dendritiques allogéniques, plusieurs jours avant la transplantation, sont donc très difficilement réalisables. En revanche, l'administration de cellules dendritiques syngéniques serait tout à fait envisageable. Ainsi, les cellules dendritiques pourraient être préparées à partir d'un échantillon de la moelle osseuse ou du sang des patients, puis congelées et administrées au moment de la greffe.

II. Résultats préalablement acquis et objectifs de l'étude

1. Génération des BMDC

La génération des BMDC immatures se fait selon une méthode de culture de la moelle osseuse avec de faibles doses de GM-CSF et d'IL4, mise au point par notre équipe (Pêche et al. 2005). Après 8 jours de culture, deux sous-populations sont obtenues, l'une adhérente et l'autre surnageante. L'analyse phénotypique de ces deux populations a permis d'identifier la population surnageante comme étant des cellules dendritiques matures exprimant fortement les molécules du CMH de classe II et la grande majorité expriment B7.2. La population adhérente a été décrite comme immature exprimant faiblement les molécules du CMH de classe II et n'exprimant pas B7.2 (Pêche et al. 2005). Ces cellules ont ensuite été caractérisées du point de vue de leur capacité stimulatrice. Ainsi, les BMDC surnageantes sont capables de stimuler les cellules T à faible concentration de BMDC, alors que les cellules adhérentes sont de faibles cellules stimulatrices (Pêche et al. 2005)

2. Monothérapie avec les BMDC immatures syngéniques

L'équipe a montré que l'injection de 7 millions de BMDC immatures de l'haplotype du receveur en intra-veineuse, la veille de la greffe, induit une prolongation de survie de 22,5 jours par comparaison à 6 jours sans traitement (Pêche et al. 2005). Dans notre modèle, les BMDC syngéniques ne sont pas chargées *in vitro* avec des antigènes du donneur avant le transfert.

Cette prolongation de survie est accompagnée d'une forte inhibition de la production d'anticorps anti-donneur. De plus, cinq jours après la greffe, les splénocytes des receveurs traités avec les BMDC prolifèrent peu en présence de CPA du donneur. Cependant, cette inhibition de prolifération est aussi observée après stimulation avec la Concanavaline A, suggérant un effet non spécifique du traitement avec les BMDC immatures (Pêche et al. 2005).

3. Bithérapie avec les BMDC en combinaison avec le LF15-0195

L'administration des BMDC immatures syngéniques ne permettant pas d'induire une survie définitive du greffon, l'équipe a tenté d'améliorer ce protocole afin d'induire une tolérance à l'allogreffe. Ils ont ainsi montré que l'injection de 7×10^6 de BMDC immatures syngéniques en combinaison avec le LF15-0195 à une dose sous optimale (1,5mg/kg, 10 jours, intrapéritonéale) a des effets synergiques importants et induit une acceptation définitive du greffon chez 92% des receveurs (**Figure 19**).

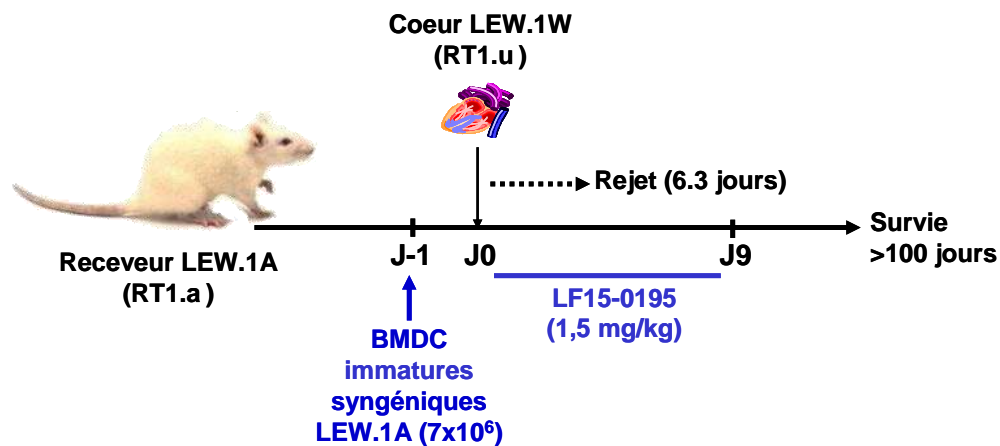


Figure 19 : Acceptation définitive du greffon avec l'injection de BMDC immatures syngéniques, la veille de la greffe, en association avec le LF15-0195 en dose sous-optimale.

La veille de la transplantation d'un cœur allogène LEW.1W, le receveur LEW.1A reçoit une injection en intraveineuse contenant 7 millions de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) immatures syngéniques (LEW.1A). Contrairement aux receveurs contrôles injectés avec du PBS, qui rejettent la greffe en 6,3 jours, les receveurs traités avec les BMDC en combinaison avec un court traitement sous optimal de 10 jours avec l'immunosuppresseur LF15-0195 présentent une prolongation de la survie définitive du greffon.

Chez ces receveurs tolérants, les greffes de peau de même haplotype que le donneur sont acceptées mais les greffes de peau de tierce partie sont rejetées prouvant que la tolérance est spécifique du donneur (Beriou et al. 2005).

Le transfert de cellules spléniques d'animaux tolérants à des receveurs irradiés induit une prolongation indéfinie de la survie du greffon démontrant la présence de cellules régulatrices dans la rate (**Tableau I**).

| Cellules injectées (150x10 ⁶ , i.v., J0) | Irradiation (3 Grays, J-2) | n | Survie greffe (Médiane) |
|--|-------------------------------|-----|----------------------------|
| Pas de cellules | - | n=8 | 6 jours |
| Pas de cellules | + | n=5 | 7 jours |
| Splénocytes "iBMDC-LF" | + | n=6 | > 100 jours |

Tableau I : Effets du transfert des splénocytes des receveurs tolérants "BMDC-LF" sur la survie d'allogreffe.

Ils ont aussi démontré qu'*in vivo*, le LF15-0195 n'agit pas en augmentant la survie ou la prolifération des BMDC injectées mais en diminuant l'expression des molécules du CMH de classe II, de B7.2 et de CD40, suggérant que le LF15-0195 diminue la maturation des BMDC. L'inhibition de la maturation des cellules dendritiques par le LF15-0195 a été précédemment montrée chez la souris (Min et al. 2003b) et caractérisée au niveau moléculaire comme impliquant un blocage de la voie NF-kB (Yang et al. 2003b). De plus, il a été montré chez la souris que le LF15-0195, en combinaison avec un anti-CD45RB, pouvait favoriser la génération de cellules dendritiques immatures tolérogènes (Min et al. 2003b).

Dans cette étude, nous avons voulu mieux comprendre les mécanismes d'induction de la tolérance dans ce modèle de bithérapie. Nous avons donc essayé de déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'induction de tolérance.

III. Résultats obtenus

1. Détermination de la localisation des BMDC injectées

Afin de déterminer le principal organe vers lequel les BMDC migrent après leur injection, nous les avons préalablement marquées avec de la PKH-26 selon le protocole décrit par Pêche et al. (Pêche et al. 2005) permettant ainsi leur suivi *in vivo* après injection. Le greffon et les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) de plusieurs receveurs traités avec les BMDC et le LF15-0195 tolérants (je nommerai ces animaux tolérants par la suite) ont été récupérés cinq jours après la transplantation. Des coupes de ces organes ont ensuite été réalisées et l'analyse a été effectuée par microscopie confocale (**Figure 20**). Nous n'avons pas retrouvé de BMDC marquées à la PKH-26 (rouge) dans la greffe et les ganglions lymphatiques (**Figure 20A et 20B**). Cependant, 5 jours après la transplantation, la

pulpe rouge de la rate des animaux tolérants est l'endroit où les BMDC migrent après leur injection (**Figure 20C et 20D**). La rate des animaux tolérants semble donc être un organe privilégié pour étudier les mécanismes régulateurs responsable de la tolérance dans notre modèle.

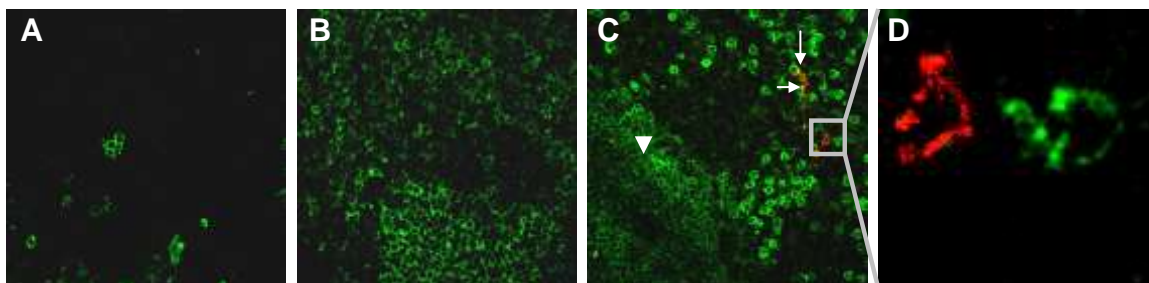


Figure 20 : Localisation, cinq jours après la greffe, des BMDC injectées marquées à la PKH26.

Les marquages ICH sont réalisés sur des coupes de cœur greffé (**A**), ganglions mésentériques (**B**) et de la rate (**C et D**). Le marquage rouge représente les BMDC marquées avec la PKH-26 *in vitro* avant l'injection par voie intraveineuse, la veille de la greffe. Le marquage vert correspond aux cellules T. Images A, B et C : grossissement x430. L'image D est un grossissement de l'image C. Les flèches indiquent les BMDC et les têtes de flèches indiquent la zone de cellules T. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

2. Etude des médiateurs tolérogènes exprimés dans la rate des animaux tolérants

2.1. Analyse au niveau de l'ARNm

Afin de déterminer si des molécules tolérogènes étaient exprimées dans notre modèle de tolérance, nous avons analysé dans la rate d'animaux tolérants et d'animaux contrôles (naïfs, en rejet, traités avec les BMDC seules ou le LF seul en dose sous-optimale), l'expression de différentes cytokines (IFN γ , EBI3, IL12p40, IL12p35, IL27p28, IL10), l'enzyme immunosuppressive IDO et du facteur de transcription Foxp3 (**Figure 21**). De façon intéressante, l'expression d'une seule cytokine, l'IFN γ , est significativement augmentée dans la rate des animaux tolérants par rapport à tous les groupes contrôles (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). La molécule EBI3 est quant à elle significativement augmentée chez les animaux tolérants par rapport seulement aux traitements LF seul et BMDC seules (* $p < 0.05$). L'augmentation d'expression de l'ARNm de ces deux molécules n'a cependant pas été retrouvée dans les greffons des animaux tolérants (données non montrées), confirmant que la rate est, dans notre modèle l'organe privilégié pour étudier les mécanismes régulateurs.



Figure 21 : Profil d'expression de l'ARNm de différentes cytokines dans la rate, cinq jours après la transplantation.

L'expression de l'ARNm de l'IFN γ a été analysée par RT-PCR quantitative dans la rate d'animaux ayant reçu une greffe cardiaque syngénique (□), greffe allogénique non traités en rejet (■), traités avec les BMDC (▣), traités avec le LF15-0195 (□) et traités avec les BMDC et le LF (tol.) (▤) prélevées 5 jours après la transplantation. L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU). Ces résultats représentent la moyenne de l'expression de ces molécules sur plusieurs échantillons distincts

2.2. Analyse au niveau de la protéine

Afin de confirmer au niveau protéique l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IFN γ observée dans la rate des animaux tolérants cinq jours après la transplantation, nous avons quantifié cette expression protéique par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-IFN γ sur des coupes de rate. Nous avons observé une augmentation significative du nombre de cellules exprimant l'IFN γ dans la rate d'animaux tolérants par comparaison à la rate d'animaux en rejet (*p<0.05) (**Figure 22A**). De plus, dans la rate des animaux non traités et tolérants, les cellules IFN γ ⁺ (marquage vert) sont localisées dans la pulpe rouge et la zone marginale (**Figure 22B**). Ces cellules se situent, de manière intéressante, dans la même zone de la rate des animaux tolérants que les BMDC injectées.

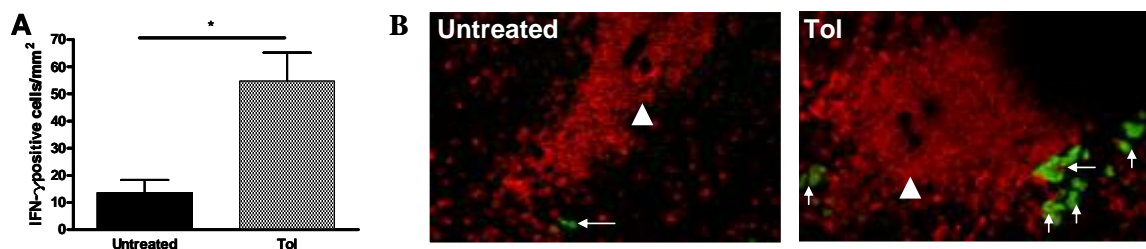


Figure 22 : Profil d'expression protéique de l'IFN γ dans la rate d'animaux en rejet et tolérants, cinq jours après la transplantation.

(A) Quantification des cellules IFN γ ⁺ dans la rate d'animaux en rejet ou tolérants, 5 jours après la transplantation grâce au system Apotome (confocal-like). 1mm² par section de tissu a été analysé. 3 sections de tissu par rat et 3 rats différents par condition ont été analysées. (* $p < 0.05$). (B) Images confocales représentatives du comarquage de l'IFN γ (vert) et anti-TCR $\alpha\beta$ (rouge) sur des coupes de rates d'animaux en rejet ou tolérants, 5 jours après la transplantation. Les zones T de la rate sont indiquées par les têtes de flèche.

3. Etude *in vivo* du rôle de l'IFN γ dans l'induction de tolérance

Nous avons précédemment montré que l'expression de l'IFN γ était augmentée dans la rate des animaux tolérants au niveau du transcrit et de la protéine. Nous nous sommes donc demandé si cette molécule jouait un rôle dans les mécanismes d'induction de tolérance dans notre modèle de bithérapie. L'IFN γ a longtemps été considérée comme une cytokine proinflammatoire entraînant une réponse T de type Th1 (Boehm et al. 1997; Szabo et al. 2003). Cependant, des études récentes ont montré un rôle de l'IFN γ dans les mécanismes de tolérance (Sawitzki et al. 2005; Guillonneau et al. 2007; Thebault et al. 2007). Afin de tester le rôle de l'IFN γ dans notre modèle, nous avons bloqué *in vivo*, chez les animaux traités avec les BMDC et le LF15-0195, l'expression de l'IFN γ à l'aide d'un anticorps anti-IFN γ neutralisant. De manière intéressante, la neutralisation de l'IFN γ entraîne de manière significative un rejet de l'allogreffe chez tous les receveurs traités (** $p < 0.001$) (**Figure 23**).

Tous ces résultats démontrent que l'IFN γ joue un rôle important dans les mécanismes d'induction de tolérance chez les animaux tolérants.

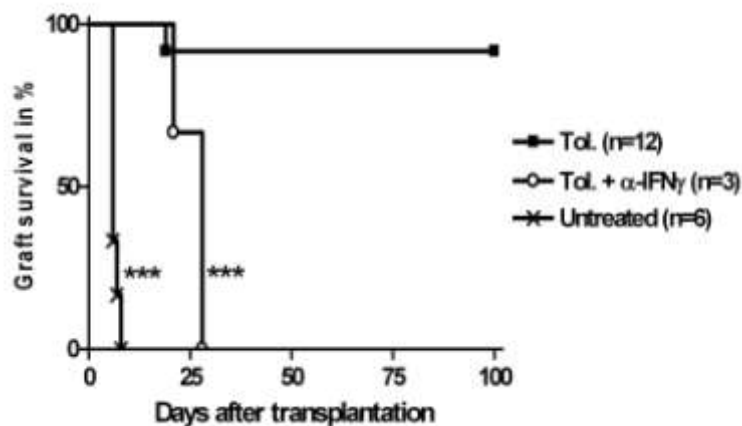


Figure 23 : Effet de l'inhibition de l'IFN γ sur l'induction de la tolérance.

Un anticorps monoclonal anti-rat IFN γ (clone DB1, IgG1) a été injecté par voie intra-péritonéale du jour 0 (2,5 mg/kg) tous les jours jusqu'au rejet. La survie de la greffe a été surveillée par palpation de la paroi abdominale et le rejet est défini par la cessation de battements (receveurs non traités n=6, tolérants n=12 et tolérants + anti-IFN γ n=3, ** $p < 0.001$).

4. Identification des cellules exprimant l'IFN γ

Afin de déterminer les cellules qui jouent un rôle important dans l'induction de tolérance en sécrétant de l'IFN γ , nous avons réalisé des comarquages de l'IFN γ avec des marqueurs de différentes populations cellulaires impliquées dans la réponse immunitaire. Ces marquages ont ensuite été analysés par microscopie confocale (**Figure 24**).

Nous avons observé que la quasi-totalité des cellules IFN γ ⁺ dans la rate des animaux tolérants étaient TCR $\alpha\beta$ ⁺. De manière intéressante, il a été décrit que dans des modèles de tolérance à l'allogreffe, des cellules régulatrices T CD4⁺ (Sawitzki et al. 2005; Thebault et al. 2007) ou des T CD8⁺ (Guillonneau et al. 2007) expriment l'IFN γ qui est important pour la tolérance. Nous avons donc approfondi la caractérisation du phénotype des cellules TCR $\alpha\beta$ ⁺IFN γ ⁺. Cependant, aucun comarque n'a été observé entre l'IFN γ et le CD4 ou le CD8. Ce résultat suggère que l'IFN γ peut être sécrété par des cellules T régulatrices double négative (Zhang et al. 2000) ou des cellules NKT (Bendelac et al. 1997). Cependant, nous n'avons constaté aucune expression d'IFN γ par des cellules marquées avec le NKRP1, marqueur des cellules NK. Par contre, dans la rate des animaux en rejet, nous avons observé une expression de l'IFN γ par des cellules TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺.

L'ensemble de ces résultats démontrent que l'IFN γ est sécrété dans la rate des animaux tolérants par des cellules TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻NKRP1⁻ (DN). Ces cellules ont été décrites comme sécrétant de l'IFN γ (Zhang et al. 2000). Cependant, actuellement aucun rôle fonctionnel n'a été attribué à cette cytokine dans les cellules T DN. En transplantation, ces cellules T DN ont été décrites comme prolongeant la survie d'allogreffe de peau (Zhang et al. 2000) et de cœur (Chen et al. 2003b) ainsi que la survie de xénogreffe (Chen et al. 2003a).

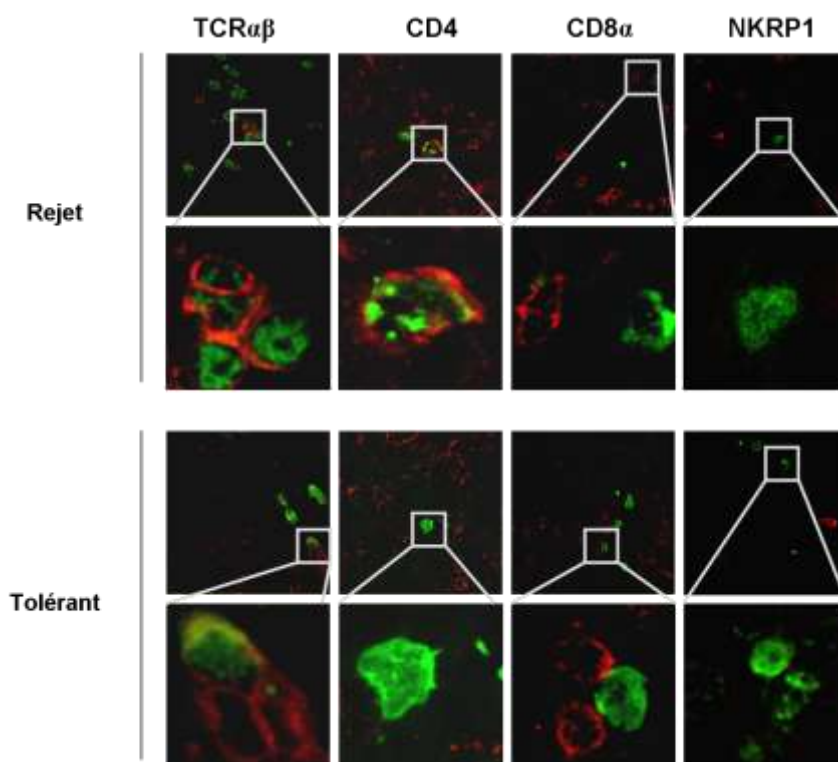


Figure 24 : Identification des cellules $IFN\gamma^+$ dans la rate des animaux en rejet et tolérants.

Images représentatives de l'analyse immunofluorescente de coupes de rates d'animaux greffés en rejet ($n=3$) et d'animaux tolérants ($n=6$) prélevées 5 jours après la transplantation, pour l' $IFN\gamma$ (vert) en comarquage avec le $TCR\alpha\beta$, $CD4$, $CD8$ ou $NKRP1$ (rouge). Les images situées en haut de chaque groupe correspondent à un grossissement de $\times 630$ tandis que celles du bas sont un zoom des images du haut.

5. Caractérisation des cellules T Double Négative

Afin d'approfondir les mécanismes régulateurs, nous avons étudié plus particulièrement ces cellules T régulatrices DN.

5.1. Etude du nombre de cellules T régulatrices DN dans la rate

Nous avons tout d'abord analysé, par cytométrie de flux, le nombre absolu de cellules T DN présentes dans la rate d'animaux naïfs ou d'animaux greffés en rejet et tolérants, cinq jours après la transplantation. Pour cela, nous avons quantifié les cellules qui étaient $TCR\alpha\beta^+CD4^-CD8^-NKRP1^-$. De manière intéressante, nous avons montré une augmentation significative du nombre de cellule T DN dans la rate des animaux tolérants par comparaison à des rats naïfs ou en rejet ($*p<0.05$, $**p<0.01$) (**Figure 25**).

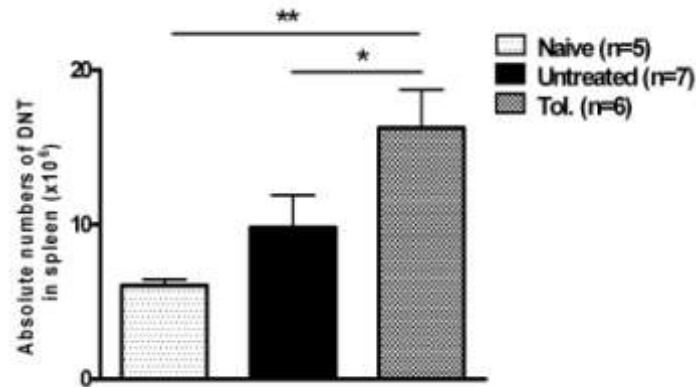


Figure 25 : Nombre absolu de cellules T DN dans la rate, cinq jours après la transplantation.

Quantification des cellules T Double Négatives ($TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8^-NKRP1^-$) par cytométrie de flux dans la rate d'animaux naïfs ($n=5$) et d'animaux greffés en rejet ($n=7$) et tolérants ($n=6$), 5 jours après la transplantation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

5.2. Etude de la production d'IFN γ par les cellules T DN

Afin d'analyser si les cellules T DN issues d'animaux tolérants étaient capables de produire plus d'IFN γ que celles issues d'animaux en rejet, nous avons regardé par cytométrie de flux la production d'IFN γ directement dans la population T DN dans des rates fraîchement préparées. Malheureusement dans ces conditions, nous n'avons pas pu détecter d'expression de l'IFN γ dans les cellules T DN issues directement des animaux. Ceci pourrait s'expliquer par une faible production d'IFN γ et au relargage de la cytokine. Pour pallier à ce problème, nous avons restimulé *in vitro* les splénocytes totaux issus d'animaux tolérants ou en rejet avec des cellules présentatrices d'antigènes allogéniques pendant trois jours. Pour amplifier la quantité d'IFN γ présente dans les cellules, nous avons ajouté de la Bréfeldine A pendant les 4 dernières heures de la culture pour empêcher l'exocytose des cytokines. De façon intéressante, nous avons observé une expression d'IFN γ plus importante par les cellules T DN restimulées d'animaux tolérants par rapport à celles d'animaux naïfs ou en rejet restimulées (**Figure 26**).

Nos résultats montrent que les cellules T DN sont amplifiées dans la rate de nos animaux tolérants et qu'elles produisent plus d'IFN γ , que nous avons montré comme étant nécessaire pour l'induction de tolérance dans ce modèle. Ces résultats suggèrent donc un rôle important des cellules T DN dans l'induction de tolérance par l'administration de cellules dendritiques immatures autologues et une immunosuppression courte.

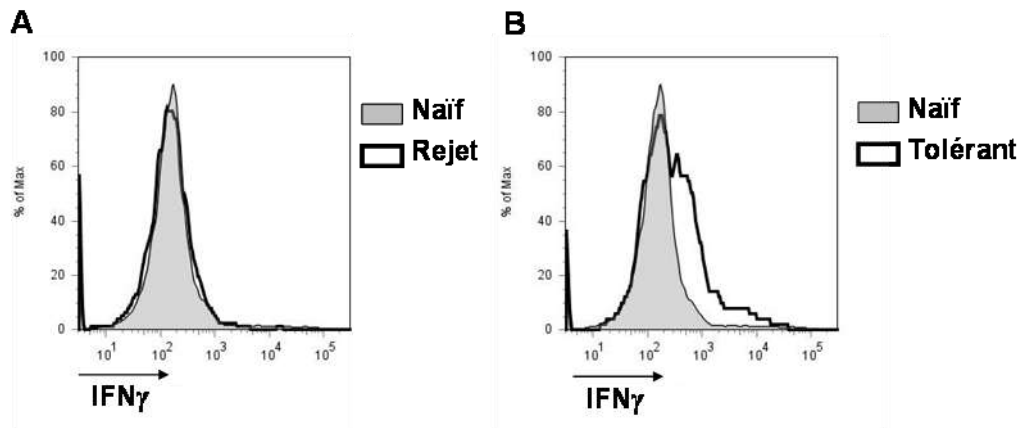


Figure 26 : Expression de l'IFN γ dans les cellules T DN lors d'une MLR.

Les splénocytes 1A d'animaux naïfs, en rejet ou tolérants ont été mis en culture *in vitro* avec des CPA 1W allogéniques pendant 5 jours. L'expression de l'IFN γ a été déterminée par cytométrie de flux dans la population T DN. Les histogrammes sont représentatifs de 4 expériences indépendantes.

5.3. Caractérisation des mécanismes entraînant la production d'IFN γ par les cellules T DN

5.3.1. Identification des cellules induisant cette production d'IFN γ

L'expression de l'IFN γ et les BMDC injectées étant localisés dans la même zone de la rate et cette cytokine étant produite par les cellules T DN, nous avons supposé que les BMDC pourraient être impliquées dans l'expression de l'IFN γ par les cellules T DN. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé *in vitro* des réactions lymphocytaires mixtes (MLR) avec des BMDC ou des cellules dendritiques de la rate (SDC) comme cellules stimulatrices et des splénocytes, en condition syngénique pendant cinq jours de culture avec ajout de la bréfeldine A. La condition syngénique mime parfaitement la situation présente *in vivo* chez nos animaux tolérants, où les BMDC sont du même haplotype que le receveur. De façon intéressante, les BMDC syngéniques induisent une plus forte production d'IFN γ par les cellules T DN que les SDC (11,2% versus 1,56%, *** $p < 0.001$) (**Figure 27A et 27B**). Les BMDC sont donc capables *in vitro* d'induire la production de l'IFN γ par les cellules T DN de manière plus efficace que les SDC, suggérant que les BMDC immatures sont de meilleures stimulatrices des cellules T DN pour la production d'IFN γ . Cependant, l'effet des BMDC sur les cellules T DN *in vitro* est indépendant des alloantigènes.

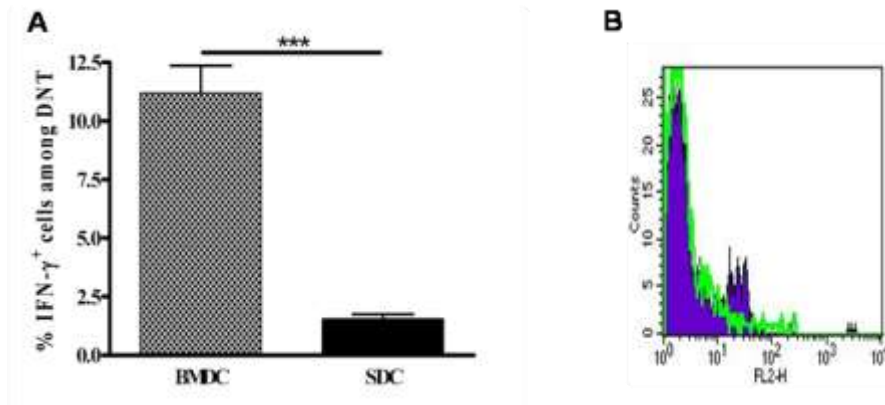


Figure 27 : Etude de l'expression de l'IFN γ dans les DNT lors d'une réaction lymphocytaire mixte en condition syngénique.

MLR en condition syngénique réalisées avec des splénocytes issus d'animaux naïf 1A mis en culture pendant 5 jours avec des BMDC 1A ou des cellules dendritiques de la rate (SDC) 1A. L'expression de l'IFN γ a été évaluée par cytométrie de flux dans la population T double négative (DN). (A) Résultats représentent la moyenne de l'expression de l'IFN γ de 5 expériences indépendantes (** $p < 0.001$). (B) Histogrammes représentatifs d'une expérience (histogramme violet : culture avec les BMDC, histogramme vert : culture avec les SDC).

En accord avec ce résultat obtenu *in vitro*, nous avons observé, par microscopie confocale, qu'*in vivo* les BMDC injectées étaient retrouvées de manière fréquente en contact étroit avec les cellules T DN dans la rate des animaux tolérants (Figure 28).

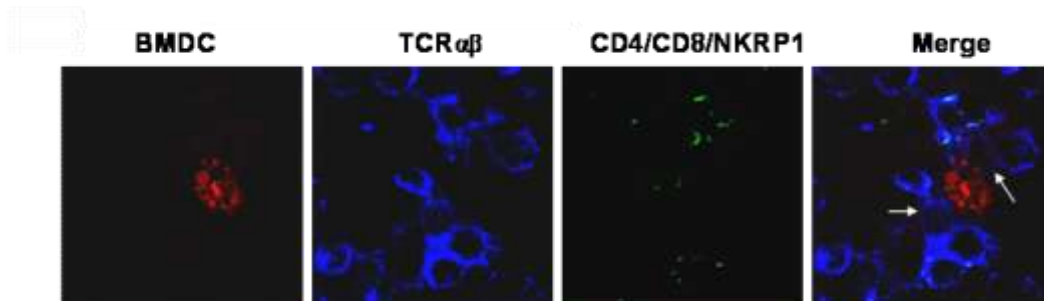


Figure 28 : Localisation des BMDC-PKH26⁺ injectées et des cellules T DN dans la rate d'animaux tolérants.

Images représentatives des contacts établis entre les BMDC-PKH26⁺ injectées (rouge) et les cellules T DN *in vivo* dans la rate d'animaux tolérants, 5 jours après la transplantation. Les cellules T sont marquées par un anticorps anti-TCR amplifié par un anticorps anti-mouse biotinylé et une streptavidine-Alexa647 (Bleu). Parmi les cellules T, les cellules T DN sont identifiées comme étant CD4⁺CD8⁻NKRP1⁺ (vert) et indiquées par les flèches blanches. 50 cellules BMDC-PKH26⁺ ont été étudiées chez 3 animaux tolérants différents.

5.3.2. Identification des médiateurs impliqués dans l'induction d'IFN γ

Nous avons ensuite voulu identifier un ou des médiateurs responsables de cette capacité des BMDC immatures à induire l'expression de l'IFN γ par les cellules T DN. Comme l'IL12 est un fort inducteur d'IFN γ dans les cellules T, nous avons étudié *in vitro* par RT-PCR

quantitative, l'expression de différents membres de la famille de l'IL12 tels que l'IL27p28, EBI3, IL12P35 et l'IL12p40 dans les BMDC stimulées ou non par des ligands de TLR (**Figure 29**). Parmi les cytokines analysées, seule l'expression d'EBI3 est augmentée de manière significative suite à la stimulation des BMDC par le LPS et le Poly I:C (* $p < 0.05$).

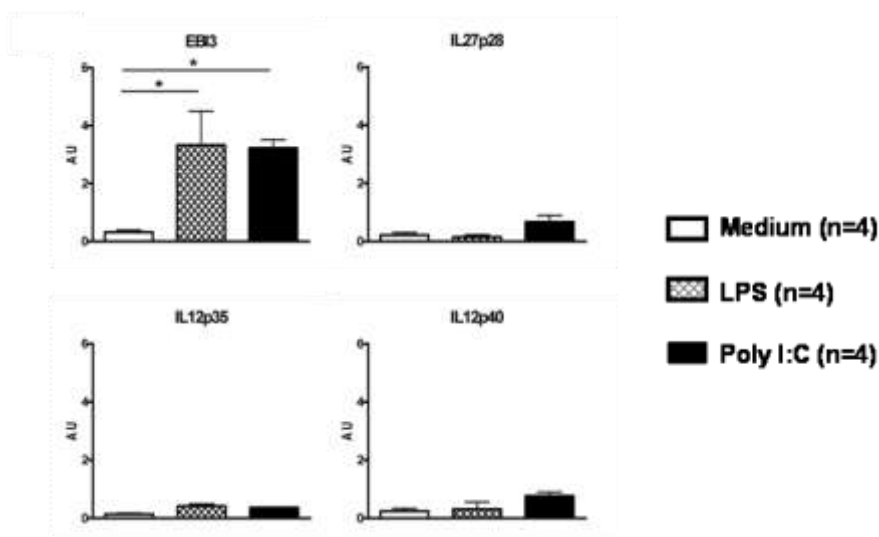


Figure 29 : Expression de l'ARNm de cytokines membres de la famille de l'IL12 dans les BMDC stimulées in vitro par des ligands de TLR

Les BMDC ont été obtenues par culture des cellules de la moelle osseuse en présence de GM-CSF et d'IL4 pendant 8 jours. Ces cellules ont ensuite été remises en culture en présence ou non de ligands de TLR (LPS ou Poly I:C) durant 24h. Les ARN totaux ont ensuite été isolés et analysés par RT-PCR quantitative pour l'expression de cytokines membres de la famille de l'IL12 (EBI3, IL27p28, IL12p35 et IL12p40). L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU). Ces résultats représentent la moyenne de l'expression de ces molécules dans 4 échantillons distincts.

De plus, nous avons précédemment montré que seules les cytokines $IFN\gamma$ et EBI3 étaient augmentées de manière significative dans la rate des animaux tolérants cinq jours après la transplantation. Ces résultats suggèrent donc qu'EBI3, comme l' $IFN\gamma$, pourrait être impliqué dans les mécanismes de régulation dans notre modèle. C'est pourquoi, nous avons ensuite étudié, dans la rate des animaux tolérants à J5, l'expression de cette molécule dans les BMDC immatures syngéniques injectées. Par microscopie confocale, nous avons montré qu'environ 30% des BMDC-PKH26⁺ étaient marquées par l'anticorps polyclonal anti-EBI3 (**Figure 30**). De plus, il a été montré qu'EBI3 formait des homodimères (Nieuwenhuis et al. 2002), mais aussi des hétérodimères avec l'IL27p28 pour former la molécule IL27 (Pflanz et al. 2002) et avec l'IL12p35 pour constituer la molécule IL35 (Devergne et al. 1997). Nous avons donc analysé *in vivo* l'expression de ces deux molécules dans les BMDC-PKH26⁺ injectées. Aucune expression de l'IL27p28 n'a été détectée, alors qu'une faible expression d'IL12p35 a été observée dans la rate des animaux tolérants, mais dans d'autres cellules que les BMDC injectées (aucun comarquage de la PKH26 avec l'anticorps anti-IL12p35).

Ces résultats suggèrent que dans notre modèle et plus particulièrement dans les BMDC immatures syngéniques injectées, l'EBI3 pourrait agir sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères pas encore décrits avec d'autres chaînes pas encore décrites.

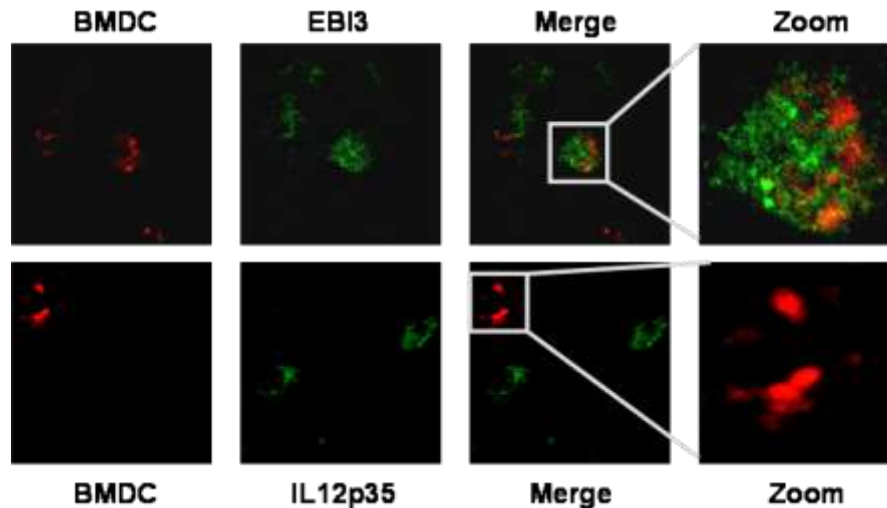


Figure 30 : Expression d'EBI3 et d'IL12p35 dans la rate d'animaux tolérants.

La rate d'animaux tolérants traités avec les BMDC marquées à la PKH26 a été prélevée, 5 jours après la transplantation. Des coupes de ces rates d'une épaisseur de 20 μ m ont été réalisées au cryostat. Images confocales représentatives de l'analyse immunofluorescente des BMDC-PKH26⁺ (rouge) en comarquage avec un anticorps anti-EBI3 (images du haut) ou un anticorps anti-IL12p35 (images du bas) (vert). L'analyse a été analysée sur 60 BMDC-PKH26⁺ sur 3 animaux tolérants différents.

L'ensemble de ces données suggère qu'EBI3 produit par les BMDC injectées pourrait être un médiateur de la production de l'IFN γ par les cellules T DN. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé *in vitro* la même expérience que précédemment, c'est-à-dire une MLR en condition syngénique où nous avons bloqué l'expression d'EBI3 dans la culture à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-EBI3 utilisé à une concentration de 5 μ g/ml (**Figure 31**). De manière intéressante, nous avons observé une diminution de l'expression d'IFN γ dans les cellules T DN stimulées par les BMDC et aucune modification avec les SDC comme stimulatrices (n=5, ***p<0.001).

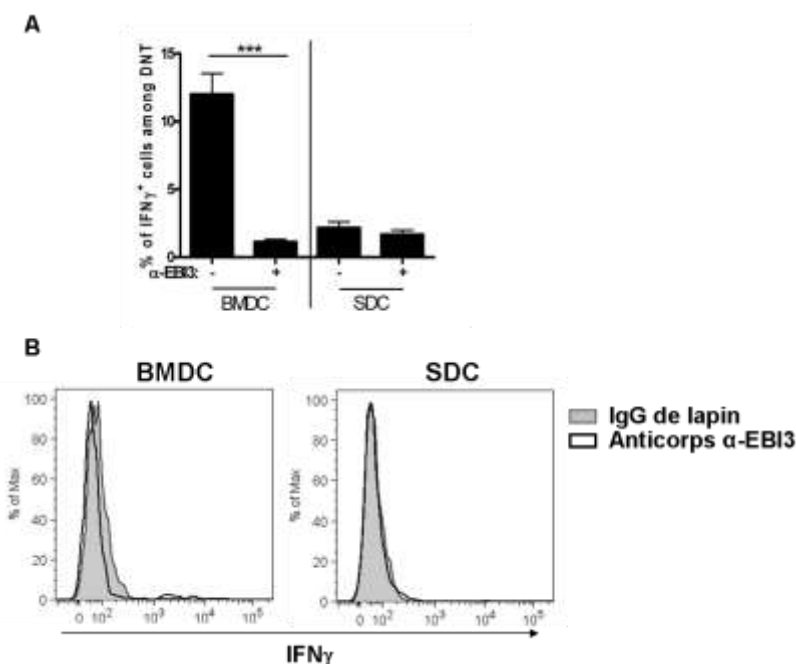


Figure 31 : Effet de l'inhibition d'EBI3 (anticorps polyclonal) sur la production d'IFN γ par les cellules T DN.

Une MLR syngéniques de 5 jours a été réalisée comme dans la **Figure 27** et l'expression de l'IFN γ a été évaluée dans la population T DN. Un anticorps polyclonal anti-EBI3 ou des IgG de lapin purifiées ont été rajoutés à la culture avec une concentration finale de 5 μ g/ml. **(A)** Résultats représentant la moyenne d'expression de l'IFN γ de 3 expériences indépendantes (** $p < 0.001$). **(B)** Histogrammes représentatifs d'une expérience.

Dans le but de déterminer si l'EBI3 nécessaire pour l'expression de l'IFN γ par les cellules T DN est bien produit par les BMDC, nous avons transfecté des BMDC avec des siRNA spécifiques d'EBI3. Les stealth siRNA utilisés ont la caractéristique d'être moins immunogènes et plus stables dans le temps permettant une inhibition prolongée pour l'utilisation *in vivo* (Klatt et al. 2007).

Tout d'abord, nous avons testé l'efficacité d'inhibition des siRNA en transfectant des BMDC immatures pendant cinq heures et nous avons observé une forte inhibition de l'expression d'EBI3 avec les deux siRNA non chevauchants par rapport à un siRNA contrôle universel (**Figure 32**).

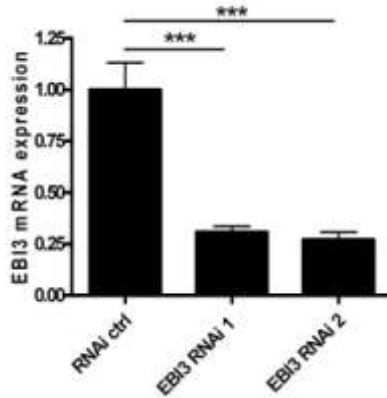


Figure 32 : Expression d'EBI3 dans les BMDC après transfection avec les siRNA spécifiques d'EBI3 ou le siRNA contrôle

Les BMDC ont été obtenues par culture de la moelle osseuse de souris en présence de GMCSF et d'IL4 durant 8 jours. Au 8^{ème} jour de culture, 2×10^6 BMDC adhérentes ont été transfectées avec de la lipofectamine et le siRNA contrôle ou les siRNA spécifiques d'EBI3 pendant 5h. Les ARN totaux ont ensuite été isolés et analysés par RT-PCR quantitative pour l'expression d'EBI3. L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU).

Après avoir validé l'efficacité de nos siRNA, nous avons réalisé la MLR en condition syngénique. De façon intéressante, nous avons confirmé la diminution de l'expression d'IFN γ dans les cellules T DN obtenue avec l'anticorps polyclonal anti-EBI3 (n=4, **p<0.01, ***p<0.001) (**Figure 33**).

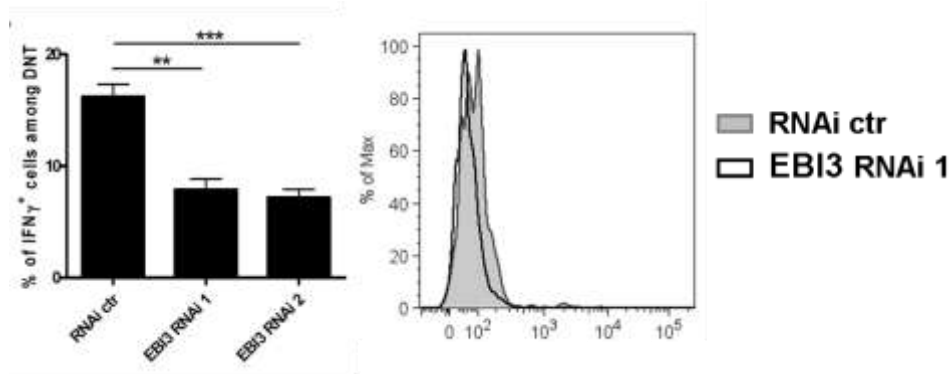


Figure 33 : Effet de l'inhibiteur d'EBI3 (siRNA) sur la production d'IFN γ par les cellules T DN.

Une MLR syngéniques de 5 jours a été réalisée comme dans la **Figure 27** et l'expression de l'IFN γ a été évaluée dans la population T DN. Les BMDC utilisées comme cellules stimulatrices ont été transfectées avec le siRNA contrôle ou des siRNA spécifique d'EBI3 pendant 5 jours. (A) Résultats représentants la moyenne d'expression de l'IFN γ de 3 expériences indépendantes (**p<0.01, ***p<0.001). (B) Histogrammes représentatifs d'une expérience.

6. Etude du rôle des leucocytes du donneur issus du greffon

Lors de l'analyse de la rate des animaux tolérants, cinq jours après la transplantation, nous avons constaté la présence de nombreuses cellules présentatrices d'antigène du donneur, suggérant un rôle possible des leucocytes du donneur dans la tolérance. Plusieurs études ont en effet montré que les leucocytes issus du greffon étaient nécessaires pour l'installation de la tolérance dans différents modèles (Josien et al. 1998; Ko et al. 1999; Chiffolleau et al. 2002b). Pour tester cette hypothèse dans notre modèle, nous avons traité les donneurs avec une injection unique intra-péritonéale de cyclophosphamide (300 mg/kg), cinq jours avant la greffe afin de dépléter les leucocytes présents dans le greffon. De manière intéressante, la déplétion des leucocytes du donneur empêche de manière significative l'induction de la tolérance par l'administration des BMDC immatures syngéniques en combinaison avec le LF15-0195. De plus, l'injection de cellules dendritiques spléniques du même haplotype que le donneur, le jour de la transplantation a permis d'induire une prolongation significative de la survie de l'allogreffe (médiane : 53j vs 20j) (**Figure 34**). Ces résultats démontrent un rôle des cellules du donneur dans l'induction de tolérance par la voie de présentation allogénique directe, indirecte ou semi-directe en échangeant des parties de leur membrane avec les BMDC présentes dans la rate.

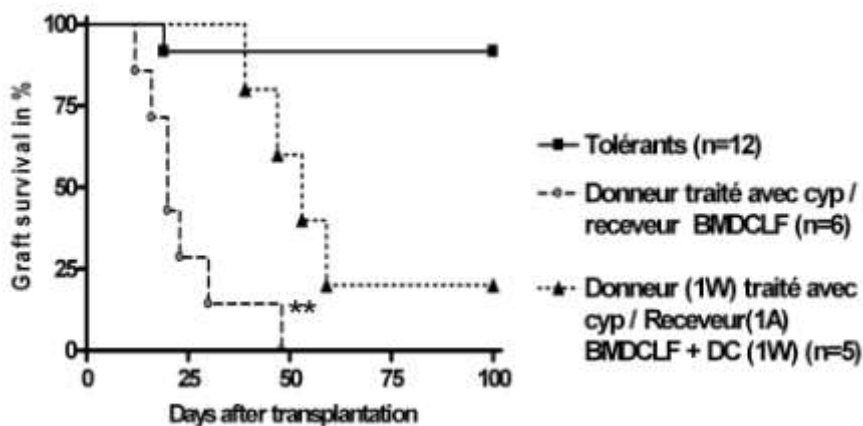


Figure 34 : Effet des leucocytes du greffon sur la survie de l'allogreffe cardiaque dans le modèle de tolérance induite par les BMDC et le LF15-0195.

Les donneurs Lew.1W ont été prétraités avec une injection unique de cyclophosphamide (cyp) par voie intrapéritonéale à une dose de 300mg/kg, 5 jours avant la transplantation. Les receveurs Lew.1A ont reçu une injection de 7×10^6 de BMDC la veille de la greffe en combinaison avec 10 jours d'injection de LF15-0195 (1,5mg/kg). Certains receveurs ont reçu, en plus, une injection par voie intraveineuse de 5×10^5 de cellules de la rate du même haplotype du donneur, le jour de la greffe.

7. Etude de nouveaux immunosuppresseurs en combinaison avec les BMDC

En parallèle, l'équipe a testé d'autres immunosuppresseurs en combinaison avec les BMDC immatures syngéniques, dont la rapamycine. En effet, comme pour le LF15-0195, il a été montré que la rapamycine inhibe la maturation des cellules dendritiques *in vitro* et *in vivo* (Hackstein et al. 2003). De manière étonnante, l'administration de la rapamycine par gavage à partir du jour de la greffe pendant dix jours en association avec les BMDC entraîne un rejet d'allogreffe précoce, sous traitement alors que les traitements avec les BMDC seules ou la rapamycine seule induisent une prolongation de survie plus importante (médiane : 10j vs 30j et 24.5j, respectivement) (**Figure 35**).

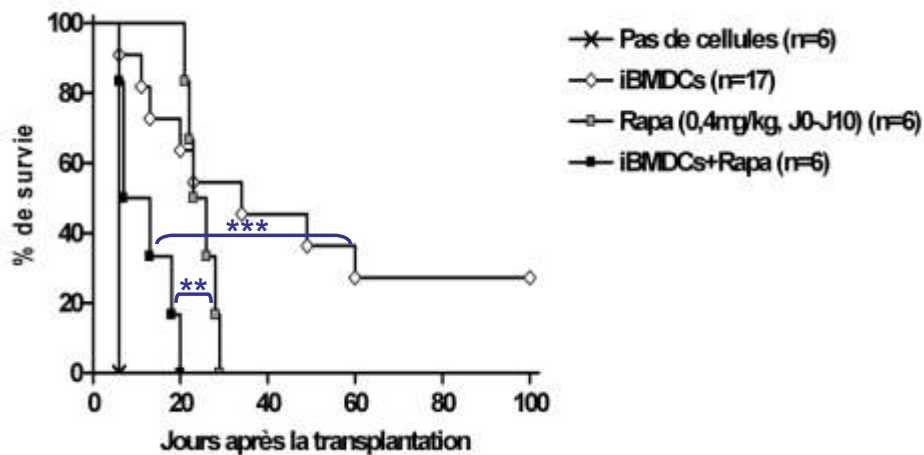


Figure 35 : Survie d'allogreffe cardiaque avec la rapamycine et les BMDC immatures syngéniques.

Les receveurs Lew.1A ont été transplantés avec un cœur Lew.1W et ont été soit non traités (n=6), traités avec 7×10^6 BMDC syngéniques la veille de la greffe (n=17), traités avec de la rapamycine administrée par gavage pendant 10 jours à partir du jour de la greffe, à une dose de 0,4 mg/kg (n=6) ou traités avec les BMDC en combinaison avec la rapamycine (n=6).

Afin de comprendre les mécanismes entraînant le rejet précoce de l'allogreffe dans la combinaison BMDC et rapamycine, nous avons tout d'abord étudié l'expression de l'IFN γ dans la rate des animaux à J5, par RT-PCR quantitative. De manière intéressante, l'expression de l'ARNm de l'IFN γ dans la rate de ces animaux est fortement diminuée par rapport aux animaux tolérants (**Figure 36**).

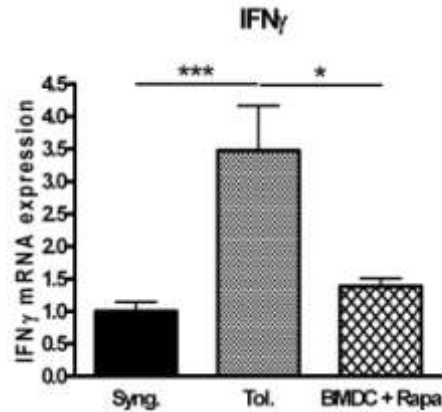


Figure 36 : Expression de l'ARNm de l'IFN γ dans la rate d'animaux greffés.

L'expression de l'ARNm de l'IFN γ a été analysée par RT-PCR quantitative dans la rate d'animaux ayant reçu une greffe cardiaque syngénique (■), greffe allogénique et traités avec les BMDC et le LF (tol.) (▨) ou traités avec les, BMDC et la rapamycine (▩), prélevées 5 jours après la transplantation. L'expression a été normalisée en fonction de l'HPRT et est exprimée en unité arbitraire (AU). Ces résultats représentent la moyenne de l'expression de l'IFN γ sur plusieurs échantillons distincts

Dans la bithérapie BMDC et LF15-0195, nous avons aussi montré le rôle important des leucocytes du greffon dans l'induction de tolérance ainsi que la présence de cellules présentatrices d'antigènes (Classe II) d'haplotype du donneur dans la rate. Nous avons donc voulu savoir si les leucocytes du donneur étaient aussi importants et présents chez les animaux ayant été traités avec les BMDC et la rapamycine. Par microscopie confocale, nous avons retrouvé des leucocytes du donneur dans le greffon mais pas dans la rate des receveurs, comme observé chez les animaux tolérants (Figure 37A et 37B). Il a été montré que chez les animaux non traités, les CPA du donneur migrent dans la rate des receveurs dans les premiers jours après la transplantation (Josien et al. 1998). Ces résultats suggèrent que dans notre modèle, la rapamycine pourrait inhiber la migration des leucocytes vers la rate et ainsi empêcher l'installation des mécanismes régulateurs

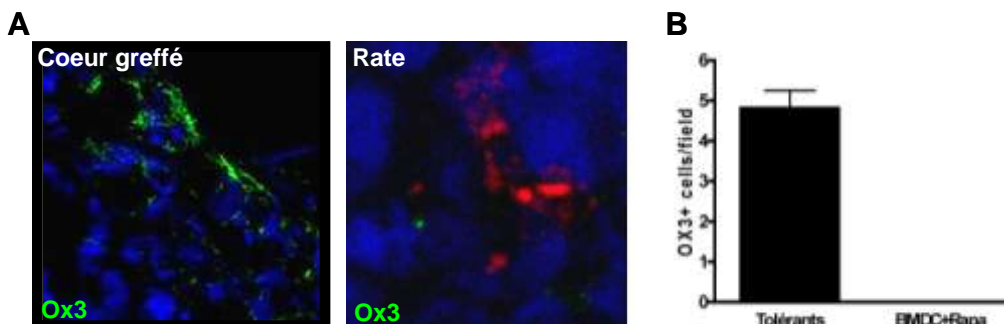


Figure 37 : Localisation et quantification des leucocytes du donneur chez les receveurs traités avec les BMDC et la rapamycine.

Des coupes de 20 μ m de cœurs et de rates issus d'animaux traités avec les BMDC-PKH26⁺ (rouge) et la rapamycine administrée de J0 à J10 ont été réalisées au cryostat. Un marquage des leucocytes du

donneur a été effectué à l'aide du clone Ox3 (vert). (A) Images représentatives du cœur et de la rate. (B) Résultats représentant la moyenne du nombre de cellules OX3+ dans la rate d'animaux tolérants et d'animaux traités avec les BMDC et la rapamycine. Analyse effectuée sur 20 coupes issues de 3 animaux différents pour chaque groupe.

Dans le but de déterminer si l'abrogation de l'induction de tolérance dans ce modèle était due à l'absence de leucocytes du donneur dans la rate, nous avons injectées des cellules dendritiques spléniques d'haplotype du donneur le jour de la greffe à des receveurs traités avec les BMDC et la rapamycine. De façon intéressante, nous avons observé une prolongation de survie significative par rapport aux receveurs traités avec les BMDC et la rapamycine (médiane : 22j vs 10j, **p<0.01) (**Figure 38**). Cependant, nous n'avons pas pu, par l'injection de ces cellules, obtenir une survie à long terme des greffons. Ceci pourrait s'expliquer par une différence phénotypique et fonctionnelle des cellules spléniques injectées et les cellules normalement présentes dans le greffon. Une autre possibilité serait un effet inhibiteur de la rapamycine sur les capacités d'endocytose et de macropinocytose des BMDC injectées. En effet, il a été montré *in vitro* que la rapamycine pouvait inhiber la capture des antigènes par endocytose et macropinocytose des BMDC de souris (Hackstein et al. 2002).

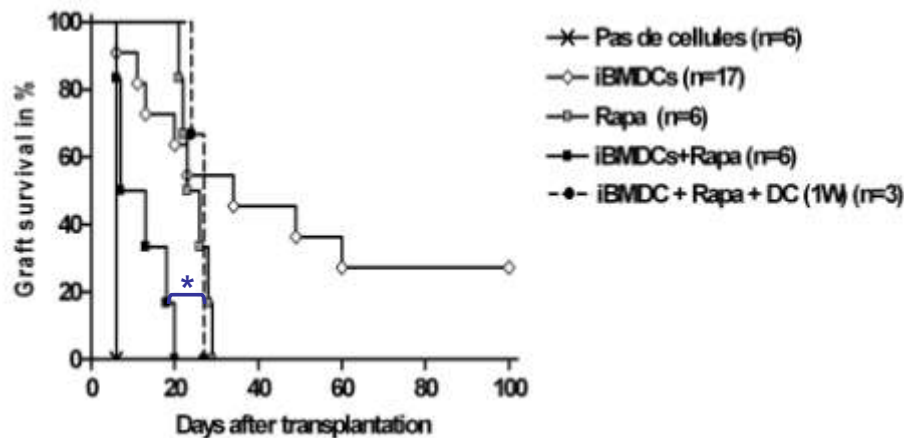


Figure 38 : Effet de l'injection de cellules spléniques d'haplotype du donneur sur la survie d'allogreffes cardiaques de receveurs traités avec les BMDC, la rapamycine.

Les receveurs Lew.1A ont été transplantés avec un cœur Lew.1W et ont été soit non traités (n=6), traités avec 7×10^6 BMDC syngéniques la veille de la greffe (n=17), traités avec de la rapamycine administrée par gavage pendant 10 jours à partir du jour de la greffe, à une dose de 0,4 mg/kg (n=6) ou traités avec les BMDC en combinaison avec la rapamycine (n=6). Certains receveurs traités avec les BMDC et la rapamycine ont également reçu une injection par voie intraveineuse de 5×10^5 cellules de la rate du même haplotype que le donneur, le jour de la transplantation (n=3).

De manière étonnante, nous avons observé une prolongation de survie significativement augmentée lorsque la rapamycine était administrée trois jours après la transplantation et toujours pendant dix jours par rapport à une administration de J0 à J10 (médiane : 32,5j vs 10j, respectivement) (**Figure 39**). Cette prolongation suggère que les

leucocytes du donneur présents dans le greffon ont le temps de migrer dans la rate des animaux receveurs avant l'administration de la rapamycine confirmant ainsi l'inhibition de la migration de ces cellules par cet immunosuppresseur. A l'heure actuelle, aucune étude *in vivo*, n'a montré d'effet de la rapamycine sur la migration des cellules dendritiques.

Ce modèle de bithérapie avec les BMDC immatures syngéniques et la rapamycine constitue donc un bon modèle d'étude des mécanismes nécessaires à l'induction de tolérance.

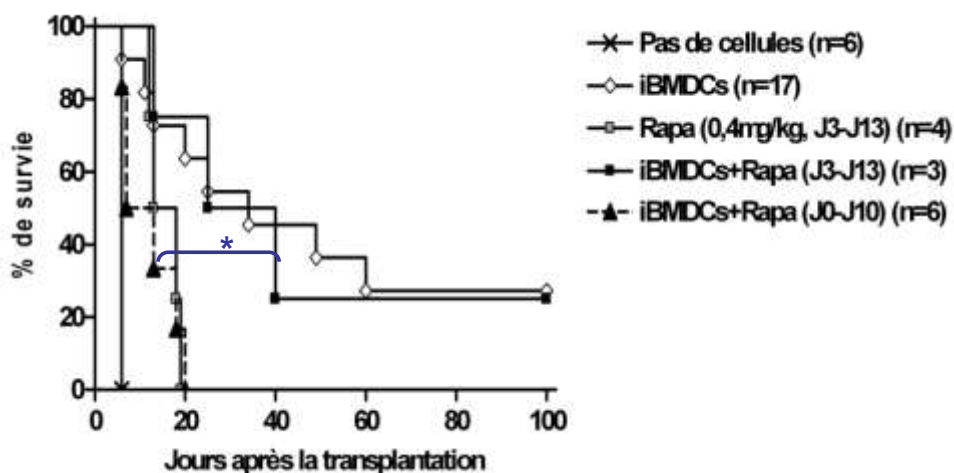


Figure 39 : Effet de l'administration de la rapamycine de J3 à J13 avec les BMDC, injectées la veille de la greffe, sur la survie d'allogreffe cardiaque.

Les receveurs Lew.1A ont été transplantés avec un cœur Lew.1W et ont été soit non traités ($n=6$), traités avec 7×10^6 BMDC syngéniques la veille de la greffe ($n=17$), traités avec de la rapamycine administrée par gavage pendant 10 jours avec le début de traitement 3 jours après la greffe, à une dose de 0,4 mg/kg ($n=4$) ou traités avec les BMDC en combinaison avec la rapamycine de J3 à J13 ($n=3$) ou de J0 à J10 ($n=6$).

IV. Perspectives

Cette étude des mécanismes régulateurs impliqués dans notre modèle de tolérance induite par l'administration de BMDC immatures syngéniques, la veille de la greffe, en association avec un traitement LF15-0195 sous-optimal, nous a permis de mettre en évidence un rôle important des cellules T DN, de l' $\text{IFN}\gamma$ et d'EBI3.

En effet, nous avons montré une migration des BMDC dans la rate des receveurs ainsi qu'une accumulation de cellules T double négative. Les BMDC ont été montrés comme produisant une cytokine membre de la famille de l'IL12, EBI3, qui induit les cellules T DN à produire de l' $\text{IFN}\gamma$, permettant ainsi l'installation de mécanismes tolérogènes.

Nous montrons dans cette étude pour la première fois *in vitro* un effet d'EBI3 sur l'expression d' $\text{IFN}\gamma$. En effet, il a été décrit chez l'homme que l' $\text{IFN}\gamma$ *in vitro* était un inducteur de l'expression d'EBI3 dans des cellules du muscle lisse de l'aorte (Kempe et al. 2009).

Dans notre modèle, une boucle de régulation entre les cellules T DN et les BMDC pourrait être envisagée. En effet, les BMDC injectées pourraient sécréter l'EBI3 qui induirait ensuite les cellules T DN à produire l'IFN γ . L'IFN γ ainsi sécrété pourrait en retour stimuler de façon plus importante les BMDC à produire EBI3. Afin de tester cette hypothèse, nous envisageons d'analyser *in vitro* l'expression d'EBI3 dans des BMDC immatures stimuler avec de l'IFN γ au niveau de l'ARNm et de la protéine. L'équipe tentera aussi d'identifier une chaîne qui pourrait se lier à EBI3 et ainsi former un nouvel hétérodimère.

Nous avons montré que les cellules T DN sécrètent de l'IFN γ qui peut participer aux mécanismes régulateurs. Cependant, ces cellules ont été décrites comme induisant l'apoptose des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ par l'interaction Fas/FasL (Ford et al. 2002). Nous allons donc essayer de quantifier l'apoptose présente dans notre modèle de tolérance. Pour cela, nous utiliserons la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) sur des coupes de rates d'animaux tolérants en comparaison avec des animaux traités avec les BMDC et la rapamycine, qui rejettent leur allogreffe sous traitement.

Nous tenterons aussi de mieux caractériser le rôle des cellules présentatrices d'antigène du donneur dans l'induction de tolérance. Pour cela, nous générerons des BMDC immatures à partir de la moelle osseuse d'animaux (F1) issus du croisement d'un mâle Lew.1W avec une femelle Lew.1A. Ces cellules présenteront donc à la fois les antigènes du donneur et ceux du receveur. Nous vérifierons que le phénotype et l'effet sur la survie d'allogreffe de ces cellules hybrides sont équivalents à ceux obtenus avec les BMDC Lew.1A classiquement utilisées. Nous les injecterons ensuite en combinaison avec le LF15-0195 dans la même combinaison de greffe que précédemment (Lew.1W sur Lew.1A) pour vérifier la survie à long terme des allogreffes. Une fois ces cellules validées dans notre modèle de greffe, nous traiterons les receveurs avec ces BMDC et le LF15-0195 ainsi que le donneur d'allogreffe avec la cyclophosphamide. Nous avons montré précédemment que la déplétion des cellules du donneur entraînait un rejet d'allogreffe à 20 jours en moyenne. Si l'injection de ces cellules permet de restaurer l'induction de tolérance en absence des cellules du donneur, nous pourrions en déduire que la présentation des antigènes du donneur par les BMDC est suffisante pour induire la tolérance. Si ces cellules n'empêchent pas le rejet d'allogreffe, nous en concluerions que la présentation directe des antigènes du donneur par les CPA du donneur est nécessaire à la tolérance. Grâce à ce modèle, nous pourrions ainsi mieux définir le rôle des CPA du donneur dans l'induction de tolérance.

A partir de nos résultats encourageants avec les BMDC immatures syngéniques et le LF15-0195, obtenus chez le rat, nous envisageons d'établir un modèle pré-clinique de

tolérance à une allogreffe rénale chez le primate par l'administration de cellules dendritiques immatures autologues avec un traitement immunosuppresseur. Cependant, lors d'essais de toxicité réalisés chez le primate, l'administration du LF15-0195 en forte dose et de façon prolongée a entraîné certains effets secondaires, ce qui rend son utilisation future en clinique impossible. Nous essaierons donc d'autres immunosuppresseurs utilisés en clinique (le mycophénolate mofetil, la rapamycine...) en combinaison avec les BMDC chez le rat afin d'optimiser le protocole. Le modèle le plus performant sera choisi pour être testé chez le primate.

L'équipe a mis au point les conditions de culture nécessaires à l'obtention de cellules dendritiques immatures à partir de la moelle osseuse des primates (Moreau et al. 2008; Moreau et al. 2009). L'effet de ces cellules couplé à un traitement immunosuppresseur va donc être testé dans un modèle d'allogreffe de rein chez le primate. Cette étape préclinique est nécessaire pour une future utilisation de ces cellules en clinique. En effet, une stratégie thérapeutique basée sur l'administration de cellules dendritiques autologues présente de nombreux avantages. Ces cellules ne seront pas détruites pas des réponses allospécifiques mais surtout l'utilisation de ces cellules ne nécessite pas de connaître le donneur plusieurs jours avant la transplantation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La transplantation d'organe ou de cellules, dans le but de remplacer des organes vitaux défaillants, est actuellement le traitement de choix dans de nombreuses pathologies touchant les reins, le foie, le cœur, les poumons ou la moelle osseuse. A l'heure actuelle, l'inhibition non spécifique de l'ensemble du système immunitaire par l'intermédiaire de drogues immunosuppressives reste la seule façon de diminuer l'incidence du rejet de greffe. Toutefois, ces traitements immunosuppresseurs sont très puissants et en déprimant l'ensemble du système immunitaire, ils entraînent des effets secondaires indésirables tels que le développement de cancers viro-induits ou des infections opportunistes. Par ailleurs, ces traitements ne permettent pas de prévenir le développement du rejet chronique. Ce rejet constitue actuellement la principale cause de rejet de greffe à long terme en transplantation humaine. Les recherches actuelles en transplantation visent donc à mieux comprendre les mécanismes de tolérance à l'allogreffe et à identifier de nouveaux médiateurs de cette tolérance. L'intérêt de la recherche de nouvelles molécules impliquées dans des modèles de tolérance est de trouver des agents capables d'intervenir dans le blocage spécifique de la réponse immune dirigée contre les antigènes du greffon, tout en perturbant le moins possible la réponse dirigée contre d'autres antigènes pathogènes. L'idéal étant de trouver une molécule ou des traitements permettant d'induire une tolérance spécifique et définitive. Cependant, il paraît difficilement concevable qu'une seule molécule puisse induire une tolérance spécifique du greffon. C'est pourquoi, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'établissement et le maintien de la tolérance immune pourrait permettre d'établir de nouveaux protocoles thérapeutiques.

Afin d'identifier les molécules associées à la tolérance à long-terme (100 jours après la greffe), nous avons comparé, par puces à ADN, des allogreffes tolérées induites par un traitement bref avec le LF15-0195 avec des allogreffes non rejetées mais présentant des signes de rejet chronique induites par deux transfusions de sang du donneur avant la transplantation (DST). Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'expression de nombreuses molécules protectrices dans les greffons tolérés démontrant des mécanismes actifs de tolérance dans ce modèle. Nous avons montré que la présence in situ dans la greffe de nombreuses cellules régulatrices T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ associée à la présence d' $IFN\gamma$ induisaient les cellules endothéliales du greffon à produireIDO, une enzyme tolérogène, démontrant une coopération entre les cellules T régulatrices et les cellules endothéliales pour la mise en place d'un privilège immun local permettant l'établissement de la tolérance à l'allogreffe (Article1).

Cette technique de puces à ADN, nous a aussi permis d'identifier une autre molécule, le récepteur CLEC-1 comme étant surexprimé dans les allogreffes tolérées. L'étude de CLEC-1 suggère que dans les allogreffes tolérées, l'expression de CLEC-1 est augmentée

dans les cellules endothéliales et myéloïdes par les cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺, accumulées dans le greffon, lui permettant ainsi en retour de moduler la réponse allogénique effectrice Th17. L'étude de cette molécule chez l'homme semble donc très intéressante, puisqu'elle pourrait permettre d'utiliser CLEC-1 comme outil thérapeutique ou diagnostique en transplantation.

Dans un autre modèle de tolérance à l'allogreffe, nous avons montré une prolongation de survie à long terme du greffon grâce à l'administration, la veille de la greffe, de cellules dendritiques dérivées de la moelle immatures et syngéniques en association avec un traitement immunosuppresseur sous-optimal avec le LF15-0195. L'étude des mécanismes régulateurs impliqués dans ce modèle, a montré un rôle de l'IFN γ produit par des cellules régulatrices T double négative et d'une molécule, EB13, sécrétée par les BMDC injectées. Une meilleure caractérisation des mécanismes régulateurs des BMDC immatures syngéniques permettra leur application future dans de nouveaux protocoles cliniques de thérapie cellulaire.

En conclusion, les résultats apportés par l'étude de nouveaux médiateurs impliqués dans les mécanismes de tolérance à l'allogreffe permettront peut-être un jour l'utilisation de ces différentes molécules dans de nouveaux protocoles cliniques.

ANNEXES

New Evidence for a Role of Allograft Accommodation in Long-Term Tolerance

Jean Marie Heslan,¹ Karine Renaudin,² Pamela Thebault,¹ Regis Josien,¹ Maria-Cristina Cuturi,¹ and Elise Chiffolleau^{1,3}

Background. Progressively better therapies have largely prevented or at least effectively treated acute allograft rejection. Consequently, the long-term survival of solid organ transplants has increasingly become limited primarily by the development of chronic allograft rejection. The mechanisms of chronic rejection remain largely unknown and the induction of specific tolerance would be the ultimate achievement in transplant immunology.

We previously demonstrated, in a fully major histocompatibility complex (MHC)-mismatched rat cardiac allograft combination, that a 20-day treatment with a deoxyspergualin (DSG) analogue, LF15-0195, induces allograft tolerance with the development of potent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. In order to better characterize the mechanisms involved in allograft tolerance, we compared long-term tolerated allografts with allografts exhibiting signs of chronic rejection induced by donor-specific blood transfusion.

Methods. We analyzed both types of allografts for infiltration, alloantibody production and gene expression by histology, exhaustive microarray and quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

Results. Interestingly, we observed in tolerated allografts an infiltrate as dense as the one observed in chronically rejected allografts and alloantibody deposits on graft endothelial cells. Prominent gene expression of many putative proinflammatory cytokines and genes related to cell activation or cytotoxicity were observed in tolerated allografts. However, we observed a specific upregulation of cytoprotective genes such as nitric oxide synthase, BclXL, and indoleamine 2,3 dioxygenase, and a poor in situ expression of immunoglobulin chain gene.

Conclusions. This study demonstrates a state of accommodation of tolerated allografts and suggests the importance of early control of humoral immunity for the prevention of chronic rejection and the maintenance of long-term tolerance.

Keywords: Tolerance, Accommodation, Regulatory T cells, Endothelial cells, Protection.

(*Transplantation* 2006;82: 1185–1193)

Organ and cell allotransplantation are currently used as treatments for human pathologies such as end-stage organ failure and leukemia. The clinical use of potent immunosuppressive drugs has helped to control allograft rejection and prolong the survival of transplants. However, current immunosuppressive drugs need to be taken for life, inducing a nonspecific immunosuppression, and do not prevent the development of chronic rejection (1). Chronic rejection is the leading cause of late graft failure and is characterized by a progressive functional deterioration of the graft due to vascular lesions and progressive occlusion of vessels. The immunological mechanisms that underlie chronic rejection are not well understood but seem to be associated with persistent alloreactivity of T cells and production of antidonor antibodies (2). Induction of donor-specific tolerance, defined as the acceptance of a graft after discontinuation of treatment without signs of chronic rejection, would be the solution of choice for long-term function and improved quality of life. Several studies demonstrate that tolerance involves a dynamic immune response in which an equilibrium between allospecific

regulatory T cells and effector cells has been reached (3). Comprehension of the mechanisms involved in the maintenance of tolerance may help to control graft outcome and to generate therapies.

We previously demonstrated that a short-term treatment with a deoxyspergualin analogue, LF15-0195, induces donor-specific heart allograft tolerance in a rat fully major histocompatibility complex (MHC)-mismatched combination (4, 5). We showed that under treatment, LF15-0195 inhibits alloantibody production, T cell alloreactivity, and graft cell infiltration. This suppression allows the installment of regulatory mechanisms with the specific expansion of potent regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells that accumulate in the spleen and at the graft site (6). Long-term surviving allografts exhibit no signs of chronic rejection despite the recovery of alloantibody production after the treatment (4, 5). There is some controversy regarding the role of alloantibodies in graft rejection. Several studies have demonstrated that posttransplant appearance of donor-specific alloantibodies and especially the presence of plasma cells in the graft and alloantibody deposits, are strongly correlated with the development of chronic rejection (7–10). However, it has been shown that under some conditions, notably when humoral immunity is partly suppressed, the graft may develop a condition known as accommodation (11). Accommodation is the absence of humoral-mediated injury, and continued function of a graft, despite the presence of antidonor antibodies in the circulation (12). The phenomenon of accommodation has been mostly described in xenograft transplants. Few reports describe the accommodation effect in allotransplantation settings and little is known about the mechanisms involved (13–17).

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 643 (INSERM U643) and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France.

² Anatomy Pathological Institution CHU Hotel Dieu, Nantes, France.

³ Address correspondence to: Elise Chiffolleau, Ph.D., INSERM U643, CHU Hôtel-Dieu, 30 bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.

E-mail: elise.chiffolleau@univ-nantes.fr

Received 18 May 2006. Revision requested 13 June 2006.

Accepted 29 June 2006.

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/06/8209-1185

DOI: 10.1097/01.tp.0000236573.01428.f3

In this paper, we demonstrate that long-term tolerated allografts induced by LF15-0195 treatment are in a state of accommodation that is characterized by the upregulation of cytoprotective molecules and the control of in situ antibody synthesis. This study reveals the importance of the alteration of humoral immunity for the prevention of chronic rejection and the maintenance of long-term tolerance.

MATERIALS AND METHODS

Animal, Transplantation, and Treatments

Rats were purchased by the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and maintained in an animal facility under standard conditions according to institutional guidelines.

Inbred eight-week-old male LEW.1W rats (RT1u) served as heart donors and LEW.1A (RT1a) as allograft recipients. Heterotopic cardiac allografts were performed as previously described (18). For the induction of tolerance by LF15-0195 treatment, LF15-0195 (Fournier Laboratories, Daix, France) was administered to allograft recipients by intraperitoneal injection at 3 mg/kg/day for 20 days starting on the day of transplantation (4). For induction of tolerance by donor-specific blood transfusion (DST), blood was collected by cardiac puncture into a heparinized syringe and allograft recipients were transfused with 1 mL of donor blood 14 and seven days prior to the transplant (19). The graft function was assessed daily by scoring heart pulsations through the abdominal wall. In the LEW.1W to LEW.1A strain combination without pretransplant blood transfusion, the graft was rejected 6.4 ± 1.7 days posttransplantation. DST-treated or LF15-0195-treated recipients had a graft survival prolongation above 100 days.

Antibodies

The following hybridomas (mouse immunoglobulin [IgG]) were obtained from the European Collection of Animal Cell Culture (Salisbury, U.K.) and were used to phenotype rat leukocytes: OX1-OX30 (anti-CD45 present on leukocytes), ED1 (recognizing CD68 on monocytes, macrophages), R7-3 (anti-TCR alpha/beta), W3/25 (anti-CD4), OX8 (anti-CD8alpha), Ox33 (anti-CD45RA present on B cells) and Marm4 (IgM present on immature and mature B cells). Secondary antibodies (Abs) included biotin-conjugated antimouse IgG, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin, Phycoerythrin-conjugated streptavidin and VIP substrate, purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-mouse anti-rat Fc IgG F(ab')₂ fragments, mouse anti-rat IgG1 and IgG2b, Fc gamma-fragment specific and FITC-goat anti-mouse IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Histology and Immunohistology

Heart allografts were removed and cross-sectioned. Immediately a part of the cardiac tissue was fixed in 4% diluted formalin. Tissue blocks were routinely processed and embedded in paraffin. Serial sections of 6 μ m were obtained for hematoxylin-eosin-saffron staining. The other part of cardiac tissue was snap-frozen in liquid nitrogen after embedding in O.C.T. compound (Tissue Tek; Miles Laboratories, Elkhart, IN) and then stored at -70°C until use. Cryostat sec-

tions of 5 μ m were cut, air-dried, and fixed in acetone for 10 min. Sections were then labeled using a three-step indirect immuno-peroxidase technique using either OX1-OX30, ED1, R7-3, OX8, W3/25, or Marm4. The number of positively stained cells was counted on each slide using a grid mounted in the ocular eyepiece (\pm standard deviation [SD]).

Determination of Antidonor Alloantibodies

Circulating Alloantibody

LEW.1W splenocytes from untreated or LF15-0195-treated recipients were incubated with decomplemented sera and diluted (1/4) in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) and 0.02% sodium azide. Cells were reacted with FITC-mouse anti-rat IgG or with mouse anti-rat IgG1 and IgG2b and then with FITC-goat anti-mouse IgG. At the same time, splenocytes were stained with biotin-conjugated Ox33 monoclonal antibodies (mAb) and revealed by phycoerythrin-conjugated streptavidin. Cells were collected on a FACScan and analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences). The analysis was performed by double staining on Ox33⁺ cells (MHC class I and class II positive B cells) and on Ox33⁻ cells (MHC class I positive T cells).

Alloantibody Deposit

For measurement of antidonor IgG deposit on heart graft tissues, sections were incubated (60 min) with serial dilutions of biotinylated mouse anti-rat IgG mAb (vector Biosystems) followed by HRP-streptavidin and developed with peroxidase substrate (vector VIP). Serial sections were assessed using dilutions of mouse Abs, from 1/20,000 to 1/80,000. Results are expressed as the highest dilution of mouse anti-rat IgG Ab showing positive labeling (end-titer dilution).

Microarray Analysis

The Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) rat Genome Survey Microarray (P/N 4337467) contains 26,857 60-mer oligonucleotide probes representing 27,088 individual rat genes. Total RNA from syngeneic grafts ($n=2$), chronically rejected (DST-treated) or tolerated (LF15-0195 treated) allografts ($n=3$) (day 100 after transplantation) were prepared by TRIzol extraction (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ten micrograms RNA were cleaned up using Rneasy columns (Qiagen). Optical densities were measured by a Nanodrop. Digoxigenin-uridine triphosphate (UTP) labeled cRNA was generated and amplified from 0.5 μ g of total RNA from each sample using an Applied Biosystems Chemiluminescent nanoAmp RT-IVT Labeling Kit (P/N 4365715). Array hybridization was performed for 16 hr at 55°C . Chemiluminescence detection, image acquisition, and analysis were performed using the Applied Biosystems Chemiluminescence Detection Kit (P/N 436875D), Analyzer (P/N 4338036) and analyzer software v-1.1 (P/N 4336391) following the manufacturer's protocol. Three biological replicates were performed on each group and the DNA chip data were considered significant when P values were <0.05 .

Real-time Quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA from syngeneic grafts ($n=2$), chronically rejected (DST-treated), or tolerated (LF15-0195 treated) al-

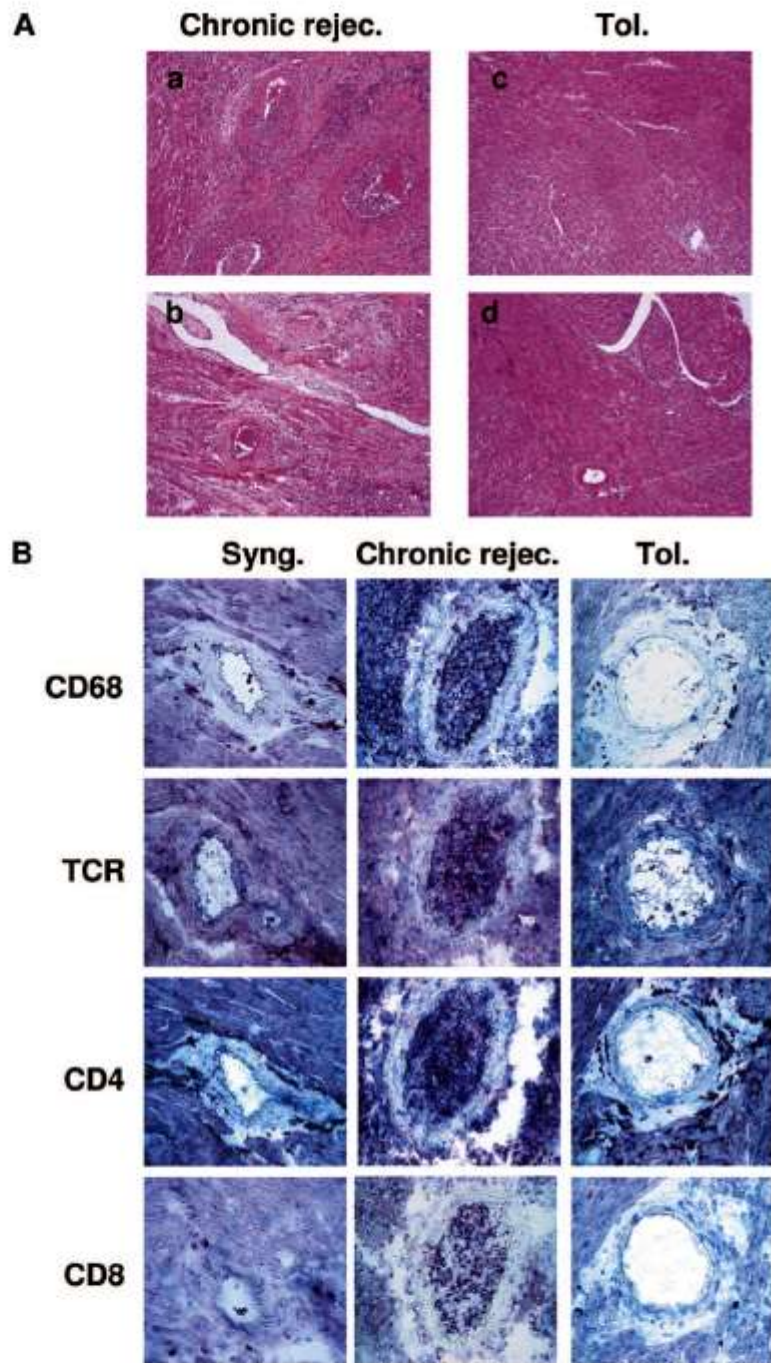


FIGURE 1. (A) Hematoxylin-eosin-saffron staining (X20) of (a and b) chronically rejected allografts (DST-treated) or (c and d) tolerated allografts (LF15-0195 treated) (day 100 after transplantation). (B) Representative immunohistology staining for CD68, TCR, CD4, CD8, of syngeneic grafts, tolerated allografts (LF15-0195 treated) or chronically rejected allografts (DST-treated) (day 100 after transplantation).

lografts (n=3) (day 100 after transplantation) was prepared by TRIzol extraction (Invitrogen). Genomic DNA was removed by DNase treatment (Roche, Indianapolis, IN) and mRNA was reverse transcribed into first strand cDNA using polydT oligonucleotide and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time quantitative

PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 Sequence Detection System using SYBR-Green PCR Core Reagents as previously described (20). Oligonucleotides used in this study: rHPRT (Up-CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC, Lo-TTCGCTGATGACACAAACATGA), rGranzyme A (Up-TTTTACAATAAGTCACTCCCTC, Lo-CGTAGCATG-

AGTCCTTCCCAC), rGranzyme B (Up-TGTGCTATGTGGCTGGTTGG, Lo-TTIGATCTTIGGGTCCCCTG), rTissue Factor Pathway inhibitor-2 (Up-GCAGGACTACGAATGTGTTCCC, Lo-GTGTAGGTGAAGGTCTGGCAGG), rIg gamma heavy chain C region (Up-CATTCCCTGCCCCCATC, Lo-CCGTTCACTTCCACTCCGT) endothelial-NO Synthase (Up-GCTCCCAACTGGACCATCTC, Lo-ACATCACCGCAGACAAACATG), rKiller Cell lectin like-rec KLRG1 (Up-ACCTCCTGTTCTCACTCCTGCT, Lo-CCTTCCACTC-GCTATCCG), rinducible-NOsynthase (Up-GACCAAAC-TGTGCTGGA, Lo-TACTCTGAGGGCTGACACAAAG), rInterferon- γ (Up-TGGATGCTATGGAAGGAAAGA, Lo-GAT-TCTGGTGACAGCTGGTG), rIndoleamine 2,3 dioxygenase (Up-GCTGCCTCCCATCTGTCTT, Lo-TGCGATTTCCAC-CATTAGAGAG).

HPRT was used as an endogenous control gene to normalize for varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method where the reference represents one-fold expression (syngeneic grafts).

Statistical Analysis

Statistical evaluation was performed using the Student's *t* test and results were considered significant if *P* values were <0.05 . Data are expressed as means \pm SD.

RESULTS

Models of Tolerance and Chronic Rejection

We previously demonstrated that a short-term treatment with a deoxyspergualin analogue, LF15-0195, induces donor-specific allograft tolerance in a rat fully MHC-mismatched combination. We showed that long-term surviving allografts exhibit no signs of chronic rejection and demonstrated the involvement of regulatory mechanisms (4, 5). In contrast, in the same rat allograft combination, pregraft DST, which is able to prevent the development of acute rejection, is not able to protect from that of chronic rejection (19). Indeed, hematoxylin-eosin-saffron staining demonstrated that long-term surviving heart allografts in DST-treated recipients exhibited histological features typical of chronic rejection, including patches of mononuclear infiltrates within the myocardium, myocardial fibrosis and varying degrees of vascular damage (Fig. 1A, a and b). Vascular lesions were not observed in long-term allografts from LF15-0195 treated recipients (Fig. 1A, c and d). In allografts from DST-treated recipients, inflammatory intimal proliferation lesions were observed in large and medium-sized arteries that exhibited fibrous intimal thickening, leading to luminal obstruction in most of the large and medium-sized arteries (Fig. 1A, a and b). Immunohistology staining showed the presence of numerous leukocytes in the intimal thickening lesions of DST-treated recipients that are absent in vessels of syngeneic or LF15-0195 treated recipients. The leukocytes in the lesions were predominantly macrophages (CD68) and CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 1B).

Henceforth, we will refer to allografts from LF15-0195 treated recipients as tolerated allografts, and to allografts from DST-treated recipients as chronically rejected allografts.

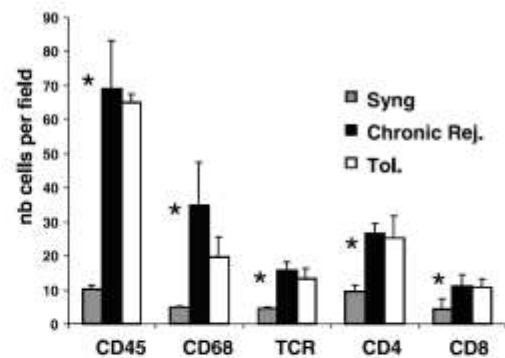


FIGURE 2. Representative histogram of immunohistology staining ($\times 40$) for CD45, CD68, TCR, CD4, CD8 of syngeneic grafts, tolerated allografts (LF15-0195 treated, $n=4$) or chronically rejected allografts (DST-treated, $n=4$; day 100 after transplantation). Data are presented as number of cells counted per field. * $P<0.05$ (Student's *t* test).

Dense Allograft Infiltration and Presence of Alloantibodies in Tolerant Recipients

We assessed both quantitatively and qualitatively the leukocyte infiltration in chronically rejected or tolerated allografts (day 100 after transplantation, $n=4$). Surprisingly, we observed that tolerated allografts display a leukocyte infiltrate in the myocardium, as dense as the one observed in chronically rejected allografts (CD45) (Fig. 2). Moreover, the composition of this infiltrate is quite similar, with a majority of monocytes/macrophages (CD68), and the presence of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (TCR, CD4, and CD8; Fig. 2).

We previously demonstrated that during the 20-day LF15-0195 treatment, the production of alloantibody is totally inhibited and is then restored following treatment cessation (4, 5). In contrast, in DST-treated recipients, a strong production of anti-class II alloantibodies has been observed very early after the transplantation (21).

The role of the level and the nature of alloantibodies in the development of chronic rejection is controversial (7, 8, 22, 23). When present at a high level, antidonor MHC class I antibodies have been shown to be deleterious for graft outcome as a result of their activation of endothelial cells (24). In contrast, a predominance of antidonor MHC class II antibodies has been shown to play a role in the induction of allograft tolerance (21) (25). In order to determine whether there is a correlation between the level and nature of alloantibodies and the graft outcome in our models, we compared the level of IgG1 (Th2), IgG2b (Th1), anti-class I and anti-class II alloantibodies in the sera of naïve rats or recipients that had acutely rejected, chronically rejected (DST-treated), or tolerated (LF15-0195 treated) their allografts at day 100 after transplantation, ($n=4$). We observed the same level of antidonor IgG2b (Th1), IgG1 (Th2), anti-class I and anti-class II antibodies in the sera of recipients who had chronically rejected or tolerated their allografts at day 100 after transplantation (Fig. 3A). Nevertheless, this level was lower than that from a recipient who had acutely rejected the allograft at day six after transplantation ($P<0.05$). We observed organized nodular infiltrates of immature and mature B cells and IgM deposits on graft endothelial cells in both chronically rejected and tolerated

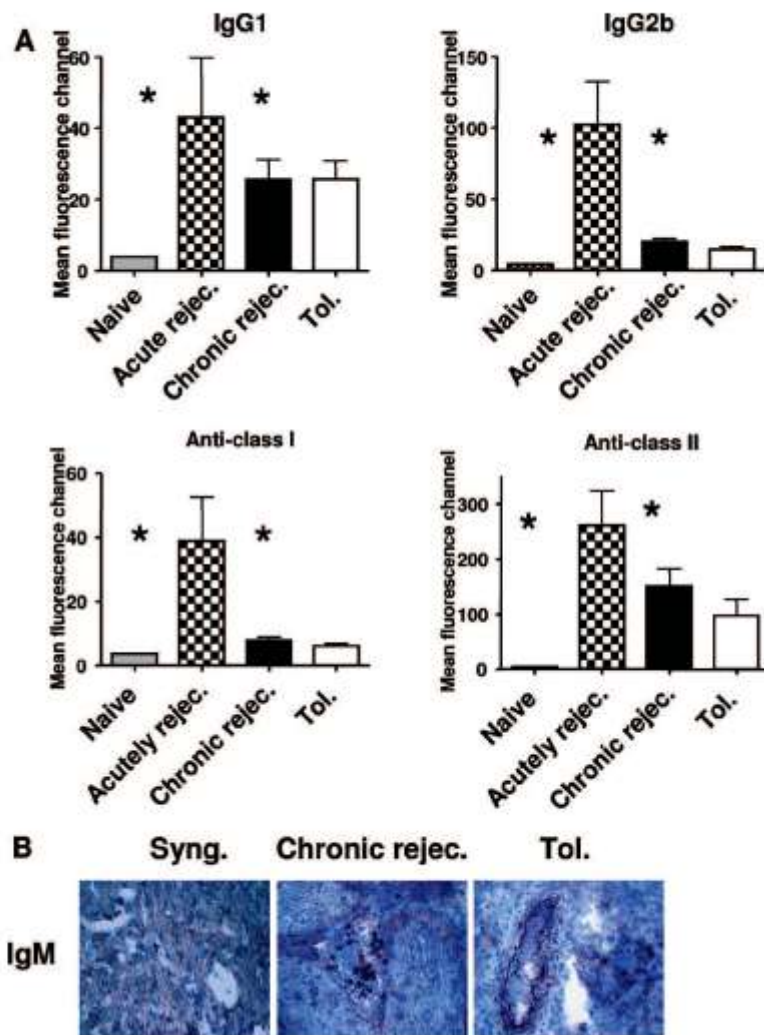


FIGURE 3. (A) Assessment of the IgG1 (Th2), IgG2b (Th1), anti-MHC class I or class II alloantibodies in the sera of naive rats or recipients that acutely rejected, chronically rejected (DST-treated) or tolerated (LF15-0195 treated) their allografts (day 100 after transplantation, $n=4$). LEW.1W donor splenocytes were incubated with diluted sera (1/4) and then with FITC-mouse anti-rat IgG or with mouse anti-rat IgG1 and IgG2b and then with FITC-goat anti-mouse IgG. At the same time, splenocytes were stained with biotin-conjugated Ox33 mAb and revealed by Phycoerythrin-conjugated streptavidin. Cells were collected on a FACS-can and analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences). The analysis was performed by double staining on Ox33⁺ cells (MHC class I and class II positive B cells) and on Ox33⁻ cells (MHC class I positive T cells). Data are expressed in mean fluorescence channel. * $P < 0.05$ (Student's *t* test). (B) representative immunohistology staining for IgM of syngeneic grafts, tolerated allografts (LF15-0195 treated) or chronically rejected allografts (DST-treated) (day 100 after transplantation).

allografts (IgM; Fig. 3B). However, quantitative measurement of total IgG deposits on grafts revealed that tolerated allografts had fewer IgG deposits than chronically rejected allografts (Table 1). The level of alloantibody assessed in the serum may not reflect what happens locally at the graft site.

TABLE 1. Measurement of antidonor immunoglobulin G deposits on chronically rejected (DST-treated, $n=3$) or tolerated (LF15-0195 treated, $n=3$) graft tissues

| Immunoglobulin G deposit | N | Day 100 after transplantation |
|---------------------------------|---|-------------------------------|
| Chronically rejected allografts | 3 | 60,000 \pm 0 |
| Tolerated allografts | 3 | 26,666 \pm 11,547* |

Results are expressed as the highest dilution of mouse anti-rat immunoglobulin G antibodies showing positive labeling (end-titer dilution).

* $P < 0.01$.

These results demonstrate that despite the presence of circulating anti-class I and anti-class II alloantibodies and Ig deposits on the graft in the long-term, tolerated allografts are resistant to the development of chronic rejection.

Strong Expression of Genes Coding for Proinflammatory Mediators and Genes Related to Cytotoxic cells in Tolerated Allografts

By microarray analysis, we observed that compared to syngeneic grafts, both chronically rejected and tolerated allografts expressed high levels of mRNA coding for class I and class II MHC, T cells, monocytes/macrophages, and B cells (data not shown). These results confirmed the abundant infiltration of leukocytes observed in tolerated allografts (Fig. 2). Surprisingly, tolerated allografts expressed high levels of genes coding for proinflammatory mediators compared to syngeneic grafts, including numerous cytokines, chemokines, kinases, adhesion molecules and signaling molecules (More than 100 genes were

upregulated fourfold in tolerated allografts compared to syngeneic grafts; data not shown). Some of these genes were even more expressed in tolerated allografts compared to chronically rejected allografts as CCR4 (2.9-fold), cyclin (2.5-fold), interferon- γ (IFN γ ; 2.3-fold), Ox40L receptor (2.1-fold), CXCL11 (2.1-fold), CXCL10 (2.1-fold), and CD40L receptor (twofold) (Table 2). We observed upexpression of numerous genes related to cytotoxic cell in tolerated allografts compared to chronically rejected allografts as Granzyme A (5.8-fold) and B (2.7-fold), Killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1; 3.9-fold), Cathepsin

G (3.2-fold), Perforin (2.3-fold), and Chymase 1 (1.8-fold; Table 2). To further validate the microarray data in terms of changes in gene expression, certain genes were analyzed by quantitative RT-PCR in syngeneic grafts, chronically rejected or tolerated allografts at day 100 after transplantation (n=3). We observed a strong upregulation of mRNAs coding for IFN γ , Granzyme A, Granzyme B, and KLRG1 in tolerated allografts compared to chronically rejected allografts or syngeneic grafts ($P<0.05$; Fig. 4A). The expression patterns of the genes analyzed by RT-PCR were found to match perfectly with the microarray data. These results indicate that expression of these genes coding for proinflammatory cytokines, chemokines, and related to cytotoxic T cell do not break the tolerance state and are closely associated with tolerance in our model.

TABLE 2. Some of the regulated genes that differentiate tolerated from chronically rejected allografts

| Fold change | Gene name | Category |
|-------------|---------------------------------------|--------------------------|
| +5.8 | Granzyme A | Cytotoxic T cell-related |
| +4.6 | Killer cell originated protein kinase | Cytotoxic T cell-related |
| +4 | Indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO | Cytoprotection |
| +4 | Adrenomedullin receptor | Cytoprotection |
| +3.9 | Killer cell lectin-like rec, KLRG1 | Cytotoxic T cell-related |
| +3.7 | NO synthase | Cytoprotection |
| +3.6 | Apelin | Cytoprotection |
| +3.4 | IL27 p28 subunit | Cytokines |
| +3.2 | Cathepsin G | Cytotoxic T cell-related |
| +2.9 | Tissue Factor Pathway inhibitor 2 | Cytoprotection |
| +2.9 | C-C chemokine receptor type 4 | Chemokines |
| +2.7 | Granzyme B | Cytotoxic T cell-related |
| +2.3 | Perforin | Cytotoxic T cell-related |
| +2.5 | Cyclin A | Proliferation |
| +2.3 | Interferon gamma | Cytokines |
| +2.2 | BclX-L | Cytoprotection |
| +2.1 | OX 40 L receptor | Costimulation |
| +2.1 | CXCL 11 | Chemokines |
| +2.1 | CXCL 10 | Chemokines |
| +2 | Endothelial protein C receptor | Cytoprotection |
| +2 | CD40 L receptor | Costimulation |
| +2 | Granzyme M | Cytotoxic T cell-related |
| +1.8 | Mast cell protease-Chymase 1 | Cytotoxic T cell-related |
| -62.3 | Ig kappa chain V-region | Immunoglobulin |
| -18.9 | Ig gamma heavy chain C-region | Immunoglobulin |
| -10.5 | Ig light chain V-region | Immunoglobulin |
| -4.9 | Ig light chain-related | Immunoglobulin |
| -4.1 | Ig lambda chain V-region | Immunoglobulin |
| -3.9 | Ig M kappa chain V-region | Immunoglobulin |
| -3.3 | Ig J chain | Immunoglobulin |

Data are expressed as fold change: tolerated allografts/chronically rejected allografts.

Specific Expression of Protective Genes and Inhibition of In Situ Immunoglobulin Chain Gene Expression in Tolerated Allografts

Interestingly, we observed by microarray analysis an upregulation of genes related to cytoprotective molecules in tolerated allografts compared to chronically rejected allografts (Table 2). These genes were nitric oxide synthase (NOs; 4-fold), indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO; 4-fold), the adrenomedullin receptor (4-fold), apelin (3.6-fold), interleukin (IL)-27 p28 subunit (3.4-fold), Tissue factor pathway inhibitor-2 (Tfpi-2; 2.9-fold), BclXL (2.2-fold), and endothelial cell protein C receptor (2-fold) (Table 2). We confirmed by quantitative RT-PCR changes in gene expression for endothelial NOs (eNOs), inducible NOs (iNOs), Tfpi 2, and IDO ($P<0.05$; Fig. 4B). Genes coding for eNOs, iNOs and Tfpi 2 were specifically upregulated in tolerated allografts compared to chronically rejected allografts or syngeneic grafts (Fig. 4B).

Moreover, despite the presence of B cells in tolerated allografts, microarray analysis revealed less in situ expression of genes of immunoglobulin chains compared to chronically rejected allografts (3- to 60-fold; Table 2). Quantitative RT-PCR analysis (n=3) confirmed the poor expression of Ig gamma heavy chain C region gene in tolerated allografts compared to syngeneic grafts (4-fold). This contrasted with the strong expression observed in chronically rejected allografts compared to syngeneic grafts (126-fold; Fig. 4B; $P<0.05$).

These results demonstrate upregulation of cytoprotective gene expression and poor in situ immunoglobulin synthesis in tolerated allografts that could explain the protection of the graft from immune system attack and from development of chronic rejection lesions.

DISCUSSION

We previously demonstrated that long-term surviving allografts induced by a short-term treatment with LF15-0195 exhibit no signs of chronic rejection and the specific expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that accumulate in the spleen and in the graft (4-6). We show here that in this same rat allograft combination, DST that prevents the development of acute rejection does not prevent the development of chronic rejection. Long-term surviving heart allografts in DST-treated recipients exhibit histological features typical of chronic rejection, including myocardial fibrosis and varying degrees of vascular damage. We have previously demonstrated in this model the role of regulatory T cells in the prevention of graft loss to acute rejection (26). These regulatory

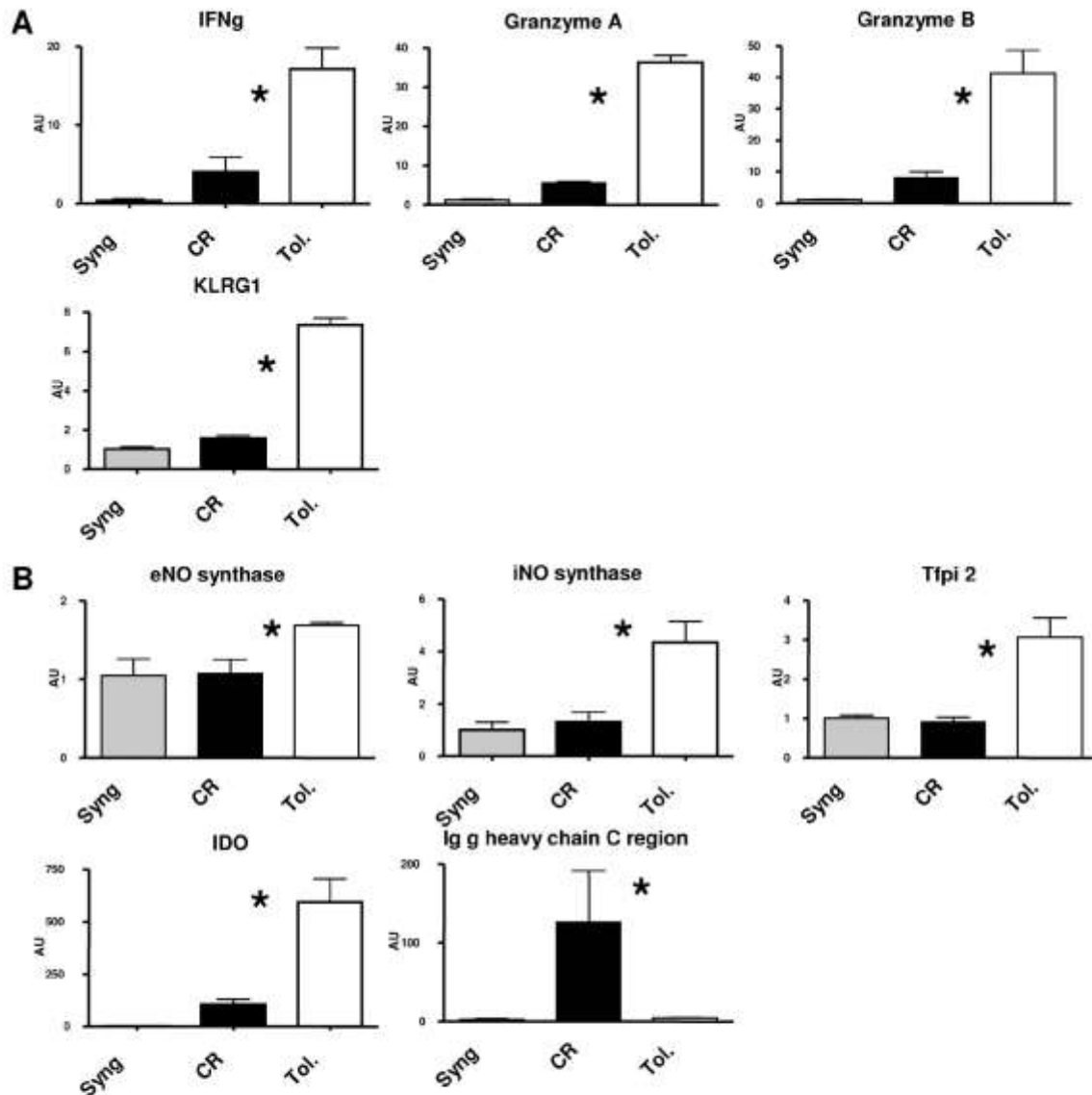


FIGURE 4. Syngeneic grafts, chronically rejected allografts (DST-treated) or tolerated allografts (LF15-0195-treated) were harvested at day 100 after transplantation and mRNA expression for (A) $\text{INF}\gamma$, Granzyme A, Granzyme B, KLRG1 and (B) eNOs, iNOs, Ttpi2, IDO, and Ig heavy-chain C region was analyzed by quantitative RT-PCR as described in the Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SD of the gene/HPRT transcript ratio for three animals in each group and expressed as relative expression compared to the reference syngeneic grafts (value = 1). $P < 0.05$ (Student's *t* test).

T cells may be inefficient to control effector cells involved in the development of chronic rejection as suggested in another rat allograft model (27). Therefore, the mechanisms of regulation involved in long-term allograft survival in these two models seem to be different: one is sufficient to lead to long-term tolerance while the other is insufficient and leads to the development of chronic rejection.

The comparison of tolerated allografts with allografts developing chronic rejection, revealed a state of accommoda-

tion of the grafts in tolerant recipients. Accommodation is known as the absence of humoral-mediated injury and the continued functioning of a graft, despite the presence of antidonor antibodies, and is characterized by the upregulation of cytoprotective molecules (12). We showed that tolerated allografts exhibit strong infiltration and a marked expression of a number of genes for molecules usually considered as pro-inflammatory factors (including chemokines, cytokines, and cytotoxicity- or activation-related genes). High expres-

sion of these "proinflammatory" genes may therefore not be necessarily considered as predictive or as diagnosis of graft failure (28). Expression of these genes in tolerated allografts could reflect the presence of both effector cells and regulatory T cells. Indeed, several studies demonstrated that tolerance involves a dynamic immune response in which an equilibrium between allospecific regulatory T cells and effector cells is reached (3).

We found a strong expression of cytotoxicity-related genes in tolerated allografts. Local protection of the organ could be the reason for accumulating cytotoxic T leukocytes (CTLs) in the graft. For example, large numbers of specific CD8⁺ T cells have been found in the livers of patients chronically infected with the hepatitis C virus who are unable to clear the virus (29, 30). As in our model, this accumulation of CTLs may reflect the resistance of hepatocytes to the CTLs by the production of protective molecules. We observed a specific expression in tolerated allografts of an inhibitory receptor expressed by CD8⁺ T cells, the KLRG1 receptor that modulates CD8⁺ cell function. KLRG-1 is expressed by memory CD8⁺ T cells that exhibit an impaired proliferative and cytotoxic capacity (31, 32). These infiltrating CTLs may be neutralized and therefore unable to destroy the graft. Alternatively, strong expression of these cytotoxicity-related genes could reflect the presence of specific regulatory T cells in tolerated allografts. Indeed, we previously demonstrated the accumulation of potent CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells at the graft site (6) and it has been shown that Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells express high levels of granzymes, KLRG1 and CCR4 (33, 34), genes that we found to be upexpressed in tolerated allografts.

We identified numerous of cytoprotective molecules upexpressed in tolerated allografts compared to chronically rejected allografts or syngeneic grafts: Adrenomedullin and NO synthase are anti-inflammatory factors that inhibit endothelial cell apoptosis and reduce oxidative stress (35–38). Apelin is thought to be expressed by endothelial cells and to play a counterregulatory role against vasopressor stimulation by inducing NO production (39). Endothelial cell protein C receptor and Tspi-2 are critical players in the control of thrombosis and atherosclerosis (40, 41). Endothelial cell protein C receptor has been shown to be expressed at too low levels on endothelial cells overlying atherosclerotic plaques in coronary arteries thus favoring local thrombus formation (42). Interaction of protein C with this receptor induces expression of inhibitor of apoptosis protein (43). We observed upexpression of Bcl-XL in tolerated allografts, another cytoprotective and antiapoptotic molecule found to be upregulated in accommodated grafts (12, 44). We found IDO and IFN γ strongly upregulated in tolerated allografts. IDO can be produced by endothelial cells and IFN γ strongly stimulates its functional expression (45). IDO activity is thought to induce apoptosis or anergy of T cells and plays an important role in tolerance to antigens (45). Finally, we found the p28 subunit of IL27 to be upregulated in tolerated allografts. The IL27p28 subunit that composes IL27, with the Epstein-Barr-virus-induced molecule 3 molecule (EBI3), is secreted by antigen-presenting cells and has a role in limiting the intensity of immune responses (46). Therefore, our results demonstrate that accommodation of the grafts is characterized by the upregulation of numerous cytoprotective molecules. These molecules may represent novel diagnostic markers for

protected grafts and possibly provide novel targets for future therapeutic interventions.

Interestingly, what differentiates tolerated allografts from chronically rejected allografts is the poor in situ-antibody production in tolerated allografts. This could be the reason for the reduced total alloantibody deposits observed in tolerated allografts compared to those observed in chronically rejected allografts. Lymphoid neogenesis with the presence of plasmacytes organized in clusters has been described in cardiac allografts undergoing chronic rejection and the presence of B cells and antibody deposits is strongly correlated with reduced graft survival rate (9). We observed the presence of B cells in tolerated allografts; however, our results show that they poorly express the immunoglobulin chain gene. Intra-graft B cells may be inhibited by regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells that accumulate at the graft site (6, 47). This local limitation of graft in situ alloantibody production could be important for the accommodation state and the prevention of chronic rejection. Indeed, some studies suggest that exposure of endothelial cells to high concentrations of alloantibody may have a detrimental effect on graft survival by stimulating cell proliferation and vascular lesions, whereas low concentrations of alloantibody may be beneficial to graft survival by upregulating antiapoptotic proteins in the graft and promoting a state of accommodation (24, 48).

We previously showed that LF15-0195 treatment inhibits alloantibody production, which is then restored after treatment cessation (4, 5). Graft accommodation may develop upon reaccumulation of alloantibody as the graft acquires resistance to alloantibody-mediated damage. Graft acceptance has been observed in kidney transplantation across the ABO barrier despite the reappearance of circulating alloantibodies after transplantation (16). The induction of accommodation to the graft to a discordant blood type and the comprehension of the mechanisms involved would be crucial as ABO incompatibility and human leukocyte antigen sensitization remain the two largest barriers to optimal utilization of organs from live donors (16). Moreover, systematic induction of accommodation in xenotransplantation setting would help to overcome the lack of organs (13).

It has been shown that alloantigen presentation by vascular endothelium to CD4⁺ T cells activates and induces CD4⁺ 25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells, which can inhibit proliferation of alloreactive T cells both in vitro and in vivo (49).

In our model, graft endothelial cells producing protective molecules, which may suppress helper and cytotoxic T cells may be responsible for the expansion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and may play an important role in the maintenance of long-term tolerance.

In conclusion, we have demonstrated the induction of vascular accommodation as an underlying mechanism for inhibition of chronic rejection and long-term graft survival in a fully allogeneic cardiac transplant model. These findings are clinically relevant since rapid production of alloantibody after transplantation may have a detrimental effect on graft survival by stimulating cell proliferation and increasing risk of chronic rejection. Conversely, the transient inhibition of alloantibody production after transplantation may be beneficial to graft survival by upregulating antiapoptotic proteins in the graft. This study suggests the importance of developing strategies to

partly inhibit antibody production, while at the same time inducing regulatory T cells for transplantation tolerance.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claire Usal, Helga Smit, Emmanuel Merieau, and Bernard Martinet for technical assistance in grafting the rats. We thank Patrick Dutartre and Fournier laboratories for supplying LF15-0195.

REFERENCES

- Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005; 352(13): 1371.
- Libby P, Pober J. Chronic rejection. *Immunity* 2001; 14: 387.
- Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(3): 199.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, et al. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant* 2002; 2: 745.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, et al. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 2002; 168: 5058.
- Heslan JM, Beriou G, Le Ludec JB, et al. Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vbeta7-TCR rearrangements in tolerated allografts. *Transplantation* 2005; 80(10): 1476.
- Rose EA, Smith CR, Petrossian GA, et al. Humoral immune responses after cardiac transplantation: correlation with fatal rejection and graft atherosclerosis. *Surgery* 1989; 106(2): 203.
- Dunn MJ, Crisp SJ, Rose ML, et al. Anti-endothelial antibodies and coronary artery disease after cardiac transplantation. *Lancet* 1992; 339(8809): 1566.
- Rifle G, Mousson C, Martin L, et al. Donor-specific antibodies in allograft rejection: clinical and experimental data. *Transplantation* 2005; 79 (3 Suppl): S14.
- Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, et al. Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am J Transplant* 2005; 5(3): 510.
- Platt JL, Vercellotti GM, Dalmaso AP, et al. Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol Today* 1990; 11(12): 450.
- Koch CA, Khalpey ZI, Platt JL. Accommodation: preventing injury in transplantation and disease. *J Immunol* 2004; 172(9): 5143.
- Tabata T, de Perrot M, Keshavjee S, et al. Accommodation after lung xenografting from hamster to rat. *Transplantation* 2003; 75(5): 607.
- Miyatake T, Koyamada N, Hancock WW, et al. Survival of accommodated cardiac xenografts upon retransplantation into cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* 1998; 65(12): 1563.
- Tanabe K, Takahashi K, Sonda K, et al. Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation: a single-center experience. *Transplantation* 1998; 65(2): 224.
- Warren DS, Zachary AA, Sonnenday CJ, et al. Successful renal transplantation across simultaneous ABO incompatible and positive cross-match barriers. *Am J Transplant* 2004; 4(4): 561.
- Semiletova NV, Shen XD, Baibakov B, et al. Inhibition of chronic rejection by antibody induced vascular accommodation in fully allogeneic heart allografts. *Transplantation* 2005; 80(11): 1535.
- Ono K, Lyndsey ES. Improved technic of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968; 57: 225.
- Souillou J-P, Blandin F, Günther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984; 38: 63.
- Louvet C, Heslan JM, Merieau E, et al. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 2004; 78(9): 1259.
- Cuturi MC, Josien R, Cantarovich D, et al. Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody responses in allograft tolerance in adult rats. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1627.
- Kerman RH, Susskind B, Kerman DH, et al. Anti-HLA antibodies detected in posttransplant renal allograft recipient sera correlate with chronic rejection. *Transplant Proc* 29 (1-2): 1515, 1997.
- Park WD, Grande JP, Ninova D, et al. Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. *Am J Transplant* 2003; 3(8): 952.
- Jin YP, Jindra PT, Gong KW, et al. Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. *Transplantation* 2005; 79 (3 Suppl): S19.
- Degauque N, Lair D, Dupont A, et al. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells. *J Immunol* 2006; 176(7): 3915.
- Vignes C, Chiffolleau E, Douillard P, et al. Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8+ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *J Immunol* 2000; 165(1): 96.
- Koshihara T, Kitade H, Van Damme B, et al. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 2003; 76(3): 588.
- Matsui Y, Saiura A, Sugawara Y, et al. Identification of gene expression profile in tolerizing murine cardiac allograft by costimulatory blockade. *Physiol Genomics* 2003; 15(3): 199.
- Racanello V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003; 24(8): 456.
- He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(10): 5692.
- Ito M, Maruyama T, Saito N, et al. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2006; 203(2): 289.
- Colonna M. Cytolytic responses: cadherins put out the fire. *J Exp Med* 2006; 203(2): 261.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004; 21(4): 589.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22(3): 329.
- Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Chorny A, Delgado M. Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut* 2006; 55(6): 824.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96(1): 60.
- Xia CF, Yin H, Borlongan CV, et al. Postischemic infusion of adrenomedullin protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and promoting angiogenesis. *Exp Neurol* 2006; 197(2): 521.
- Kato J, Tsuruda T, Kita T, et al. Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(12): 2480.
- Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279(25): 26274.
- Chand HS, Foster DC, Kiesel W. Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb Haemostasis* 2005; 94(6): 1122.
- Herman MP, Sukhova GK, Kiesel W, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107(9): 1117.
- Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, et al. Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 2001; 159(3): 797.
- Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, et al. Gene expression profile of anti-thrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(14): 11199.
- Badrichani AZ, Stroka DM, Bilbao G, et al. Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest* 1999; 103(4): 543.
- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(10): 762.
- Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(7): 521.
- Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175(7): 4180.
- Oluwole SF, Tezuka K, Wasfie T, et al. Humoral immunity in allograft rejection. The role of cytotoxic alloantibody in hyperacute rejection and enhancement of rat cardiac allografts. *Transplantation* 1989; 48(5): 751.
- Krupnick AS, Gelman AE, Barchet W, et al. Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogenic CD4+25+ Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175(10): 6265.

The FASEB Journal article fj.08-128173. Published online May 6, 2009.

The FASEB Journal • Research Communication

Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates

A. Moreau,* M. Hill,^{†,‡,§} P. Thébaud,^{†,‡,§} J. Y. Deschamps,^{||} E. Chiffolleau,^{†,‡,§} C. Chauveau,^{†,‡,§} P. Moullier,* I. Anegón,^{†,‡,§} B. Alliot-Licht,^{†,‡,§,||} and M. C. Cuturi,^{†,‡,§,||,2}

*INSERM U649, CHU Hotel-Dieu, Nantes, France; [†]INSERM U643, Nantes, France; [‡]CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, France; [§]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; and ^{||}Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Service d'Urgence, Nantes, France

ABSTRACT Clinical translation of dendritic cell (DC)-based cell therapy requires preclinical studies in nonhuman primates (NHPs). The aim of this work was to establish the *in vitro* conditions for generation of NHP tolerogenic DCs (Tol-DCs), as well as to analyze the molecular mechanisms by which these cells could control an immune response. Two populations of NHP bone marrow-derived DCs (BMDCs) were obtained: adherent and nonadherent. Although both populations displayed a quite similar phenotype, they were very different functionally. We characterized the adherent BMDCs as Tol-DCs that were poor stimulators of T cells and actively inhibited T-cell proliferation, whereas the nonadherent population displayed immunogenic properties *in vitro*. Interestingly, the anti-inflammatory and immunosuppressive enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) was up-regulated in Tol-DCs, compared to the immunogenic BMDCs. We demonstrated that HO-1 mediates the immunosuppressive properties of Tol-DCs *in vitro* (in NHPs and rats) and that HO-1 is involved in the *in vivo* tolerogenic effect of Tol-DCs in a rat model of allotransplantation. In conclusion, here we characterized the *in vitro* generation of NHP Tol-DCs. Furthermore, we showed for the first time that HO-1 plays a role in the active inhibition of T-cell responses by rat and NHP Tol-DCs.—Moreau, A., Hill, M., Thébaud, P., Deschamps, J. Y., Chiffolleau, E., Chauveau, C., Moullier, P., Anegón, I., Alliot-Licht, B., Cuturi M. C. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J.* 23, 000–000 (2009). www.fasebj.org

Key Words: immune tolerance • cell therapy • macaque

DENDRITIC CELLS (DCs) COMPRISE a heterogeneous system of leukocytes that orchestrate effector and tolerogenic immune responses (1, 2). It is now recognized that tolerance induction by DCs is not always related to the absence of stimulatory properties (3).

Instead, DCs can use active mechanisms to induce tolerance, such as expression of membrane-bound inhibitory molecules (B7-H1, PD-L1/2, and ILT3/4), immunosuppressive cytokines (IL-10 and TGF- β), or the tryptophan-catabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (1, 2). We hypothesized that, in addition to those molecules, heme oxygenase-1 (HO-1) (4) might mediate active immune suppression by tolerogenic DCs (Tol-DCs). In fact, HO-1 is a heme-catabolizing enzyme that has been described as an anti-inflammatory (4) and immunosuppressive molecule (5, 6). We have recently shown that overexpression of HO-1 in DCs inhibits their capacity to trigger effector immune responses (5). However, it remains to be determined whether HO-1⁺ DCs could also actively inhibit effector immune responses *in vitro* and *in vivo*. It has been shown that on systemic HO-1 induction, impaired skin (7) and neuroinflammation (8) are associated with increased HO-1 levels in antigen-presenting cells (APCs). However, a direct demonstration that HO-1⁺ DCs actively inhibit T-cell responses is still lacking.

Understanding the molecular pathways used by DCs to regulate immune responses and knowledge of the biology of the *in vitro*-generated Tol-DCs will help rationalize the use of Tol-DCs as therapeutic tools. In fact, there is an increasing interest in *in vivo* applications of Tol-DCs in cell-based therapy for prevention of immune-mediated damage (1). Furthermore, to perform preclinical studies, the characterization of Tol-DCs in nonhuman primates (NHPs) is needed.

Here, we establish an *in vitro* protocol for generation of NHP bone marrow-derived Tol-DCs. We show that HO-1 mediates the active immunosuppressive properties in NHP and rat Tol-DCs *in vitro*. *In vivo*, we

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: INSERM U643 CHU Hotel-Dieu, 30 Bd. Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01 France. E-mail: maria-cristina.cuturi@univ-nantes.fr
doi: 10.1096/fj.08-128173

demonstrate that HO-1 activity is needed to prolong rat allograft survival on injection of HO-1⁺ Tol-DCs. This work characterizes NHP Tol-DCs and shows that HO-1 is a critical molecular pathway used by DCs to actively modulate immune responses.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) were purchased from BioPrim (Baziège, France), and rats were from the Centre d'Élevage Janvier (Genest-Saint-Isle, France). All animals were used for experimentation in accordance with our institutional and national ethical guidelines.

Generation of bone marrow DCs (BMDCs)

Rat and macaque DCs were generated from bone marrow precursors. Briefly, after red blood cell lysis, macaque cells (1×10^6 cells/ml) were cultured in complete medium (9) supplemented with 1% macaque serum (collected in our animals) and 100 U/ml recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Novartis, Basel, Switzerland). On d 3, the supernatant was replaced by fresh medium containing GM-CSF. On d 7, the nonadherent and adherent cells were harvested. Rat BMDCs were generated as described previously (10).

Phenotyping by FACS

The phenotypic profiles of the two populations of macaque BMDCs (adherent and nonadherent) were analyzed using mouse antibodies (Abs) against human antigens cross-reacting with the cynomolgus macaque. Matching isotype control mouse Abs were included. BMDCs were stained using anti-HLA-DR PE/APC (clone L243), anti-CD86 APC (clone 2331), anti-CD14 FITC (clone M5E2), and anti-CD11b PE (clone ICRF44) (BD Pharmingen; Le Pont de Claix, France); anti-CD11c FITC (clone 3.9; Clinisciences, Montrouge, France), anti-CD80 PE (clone M24; Innogenetics, Gent, Belgium); anti-CD68 FITC (clone F7135; Dako Trappes, France), and anti-DCsign (clone 120507; R&D Systems; Lille, France). For CD68 staining, cells were first permeabilized before incubation with CD68-FITC Ab. Cells were analyzed using a FACSCalibur with Cellquest 3.1f software (BD Pharmingen).

HO-1 staining

BMDCs (20,000 cells) were cytocentrifuged onto microscopic glass slides and dried overnight at room temperature. Cells were also fixed in acetone, permeabilized, and stained with an anti-HO-1 primary mAb (HO-1-1; Stressgen, San Diego, CA, USA), followed by a secondary FITC-Ab (donkey-anti-mouse-IgG; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Matching isotype control mouse Abs were included. Representative photographs of HO-1 staining were taken with a Nikon 950 digital camera ($\times 630$; Nikon, Tokyo, Japan).

Cell extracts and Western blot analysis

Western blot analysis was performed as described previously (11). Briefly, cell protein extracts were boiled, electrophoresed on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, and blotted. Membranes were blocked and incubated with a

mouse anti-human HO-1 Ab (Stressgen) or a mouse anti- β -tubulin mAb (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase-labeled secondary Abs (Jackson ImmunoResearch), and detection was performed by enhanced chemoluminescence (Amersham, Dübendorf, Switzerland). Quantification of HO-1 was performed by densitometry analysis of HO-1 signals after normalization with β -tubulin.

Mixed lymphocyte reaction (MLR) assay

Irradiated adherent and nonadherent BMDCs were cocultured with allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (1×10^5 cells) at different ratios in a 5-d MLR. PBMCs were isolated from peripheral blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Cocultures of 1×10^5 allogeneic PBMCs with graded doses of irradiated BMDCs (BMDC:PBMC ratios of 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, and 1:64) were performed in triplicate in 96-well U-bottom plates. After 5 d, PBMC proliferation was measured by [³H]thymidine uptake during the last 9 h and was expressed as counts per minute (cpm) measured in a liquid scintillation counter (Betaplate; Wallac, Oy, Finland).

Lymphocyte inhibition assay

Allogeneic MLRs were performed between PBMCs (1×10^5) from two different macaques (one of which was irradiated) or between 1×10^5 T cells from LEW.1W rats and 5×10^4 irradiated splenic DCs from LEW.1A rats. Graded doses of adherent BMDCs provided from third-party macaques or LEW.1A rats were added to these MLRs and cultured for 3 d. Macaque or rat adherent BMDCs were either left untreated or preincubated with 50 μ M of tin-protoporphyrin (SnPP; Frontier Scientific, Carnforth, UK), an inhibitor of HO-1 activity, for 2 h, and then washed. Next, adherent BMDCs were irradiated. Responder T-cell proliferation was measured by [³H]thymidine uptake and was expressed as cpm.

Rat heart transplantation

LEW.1W rats served as heart donors and LEW.1A rats as recipients (RT1u and RT1a, respectively, complete major histocompatibility complex mismatch). Heterotopic cardiac allografts were performed as described previously (10). Recipients were untreated or injected with 7×10^6 syngeneic Tol-DCs on the day before transplantation. A group of allograft recipients receiving syngeneic Tol-DCs were treated by intraperitoneal injections of SnPP (60 μ g/kg) once every 4 d (6). As a control, heart allograft recipients received only intraperitoneal injections of SnPP (60 μ g/kg).

Statistical analysis

A 2-tailed unpaired *t* test with 95% confidence intervals was performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Mean values were considered statistically different at values of $P < 0.05$.

RESULTS

Adherent and nonadherent NHP BMDCs share the same phenotype but differ in the expression of HO-1

We first generated and characterized macaque BMDCs. We have recently reported that generation of Tol-DCs

from BM in rats is able to prolong allograft survival *in vivo* (10). We differentiated NHP BM cells into Tol-DCs according to the protocol used in rodents (12). At the end of the macaque BM culture, as in the rat system, two populations were identified: one consisted of large irregularly shaped adherent clusters (adherent population), and another consisted of individual nonadherent cells (data not shown). In rats, only the adherent BMDC population was shown to induce low T-cell proliferation *in vitro* and was able to prolong organ graft survival *in vivo* (10).

The analysis of the DC phenotype of both macaque populations revealed that they displayed a quite similar phenotype. The majority of the cells expressed CD45 (~80%), HLA-DR, and CD11b. Less than 5% of the cells expressed CD83, CD20, CD56, and CD34 (data not shown). In the adherent population, expression of HLA-DR was higher (83 ± 3.2) than in the nonadherent one (67.5 ± 6.3 ; $P < 0.05$). It is worth noting that neither adherent nor nonadherent BMDCs produced detectable levels of IL-12p70 (data not shown). To more precisely characterize the DC populations, we analyzed the expression of different markers (CD80, CD86, CD11c, CD11b, CD14, CD68, and DCsign) on the HLA-DR gated cells. These results are shown in Fig. 1A.

The phenotypes of the HLA-DR⁺ cells in the two cell populations were similar, with ~40 to 60% of CD80, ~80% of CD86 and CD11c, ~95% of CD11b, ~65% of CD14, and <10% of DCsign. The major difference is the expression of CD68, which represents ~60% of HLA-DR⁺ cells in the ADH population and <30% in the non-ADH population. Thus, in contrast to rats, the membrane phenotype using conventional DC markers in the adherent population did not differ significantly from the nonadherent one.

We therefore analyzed HO-1 expression in both BMDC populations to further characterize their phenotype. We observed that the adherent BMDCs showed a higher level of intracellular HO-1 staining compared to the nonadherent cells (Fig. 1B). The quantitative differences were confirmed by Western blot analysis (Fig. 1C). Quantification of HO-1 protein by this technique showed 3-fold higher HO-1 in adherent BMDCs than in nonadherent BMDCs when the means \pm SD of 3 independent experiments were analyzed (graph in Fig. 1C). HO-1⁺ cells were found among both CD68⁺ and CD68⁻ cells (data not shown). Indeed, HO-1 expression appears as a major phenotypic difference between adherent and nonadherent NHP BMDCs. We then aimed to study the function of these two populations of cells.

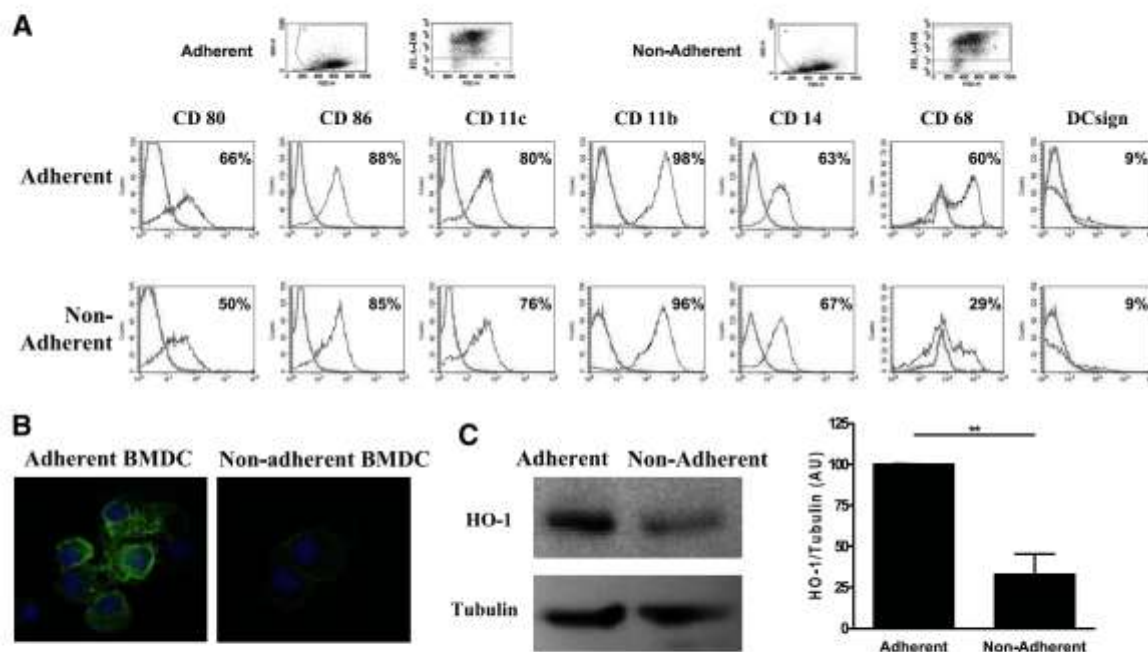


Figure 1. Phenotype of macaque BMDCs generated in the presence of GM-CSF. *A*) Adherent and nonadherent NHP BMDCs were gated on live cells (morphological parameters) and HLA-DR⁺ cells (top dot plots). Black lines in histograms show expression of different markers in adherent and nonadherent BMDCs gated on live HLA-DR⁺ cells. Markers used were CD80, CD86, CD11c, CD11b, CD14, CD68, or DCsign. Gray lines represent isotype controls. Numbers within quadrants indicate percentage of positive cells. Data are representative of 2 experiments using different macaques. *B*) Representative photographs of HO-1 staining in adherent and nonadherent BMDCs ($\times 630$). Matching isotype control mouse Abs were included. *C*) Analysis of the presence and quantities of HO-1 by Western blot analysis. Expression of HO-1 was normalized to tubulin expression in two populations of BMDCs. Graph shows means \pm SD of densitometry study of HO-1/tubulin ratio from 3 independent experiments using different macaques. $^{**}P < 0.01$.

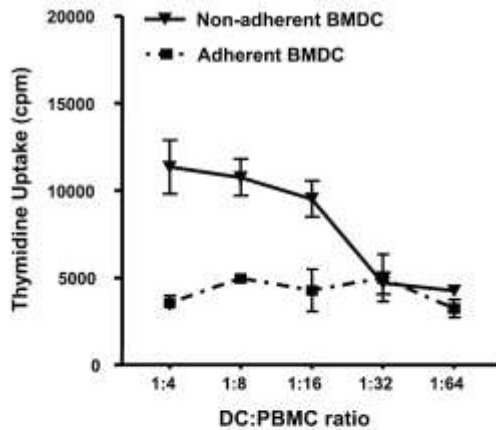


Figure 2. T-cell stimulation capacity of NHP BMDCs. Irradiated adherent and nonadherent BMDCs were cocultured with allogeneic PBMCs at different ratios in a 5-d MLR. PBMC proliferation was measured by [³H]thymidine uptake (cpm). Data are representative of ≥ 3 independent experiments using different macaques.

HO-1⁺ adherent NHP BMDCs are poor stimulators of allogeneic T cells

BMDCs were analyzed for their ability to induce proliferation of allogeneic PBMCs (Fig. 2). Although the expression of HLA-DR was higher in the adherent cells, and the expression of costimulatory molecules was similar in adherent and nonadherent BMDCs, their capacity to induce T-cell proliferation was clearly different. As shown in Fig. 2, a very low degree of PBMC proliferation was induced by adherent BMDCs, whereas the nonadherent cells were effective inducers of allogeneic T-cell proliferation. Indeed, the functional characterization established that HO-1⁺ adherent BMDCs

are poor stimulators of allogeneic T cells. These observations are in agreement with our previous results in rats and humans, showing that HO-1⁺ DCs are poor inducers of T-cell proliferation (5).

Immunomodulatory effect of adherent NHP BMDCs

So far, we have characterized NHP BMDC populations, showing that HO-1⁺ adherent BMDCs are poor stimulators of T cells. We next asked whether these cells were able to inhibit a T-cell response and whether HO-1 could be implicated in this function. We used an *in vitro* inhibition assay in which adherent BMDCs were tested for their capacity to inhibit an allogeneic MLR performed between two different macaque PBMCs (Fig. 3A). The addition of adherent BMDCs decreased MLR proliferation (Fig. 3A), indicating that, in addition to being poor stimulators, adherent BMDCs can also actively impair T-cell responses and could therefore be described as Tol-DCs. We next analyzed the role for HO-1 in this effect. We performed the same MLR-suppression assay with Tol-DCs that had previously been treated with SnPP, a selective inhibitor of HO-1 enzymatic activity (13). The Tol-DCs were pretreated with SnPP, then washed and added to the MLRs. This SnPP pulse treatment has been previously described by Taille *et al.* (14). We used this pulse inhibition in order to inhibit HO-1 only in Tol-DCs and not in the stimulatory APCs present in the MLRs, and similar results were obtained using the inhibitor directly in the MLR culture (data not shown). As shown in Fig. 3B, the T-cell proliferation inhibition induced by Tol-DCs was abolished by HO-1 inhibition in macaques (Fig. 3B). The same result was observed at different DC:MLR ratios (Supplemental Fig. 1). These observations show that HO-1 is involved in the immunomodulatory effect of Tol-DCs.

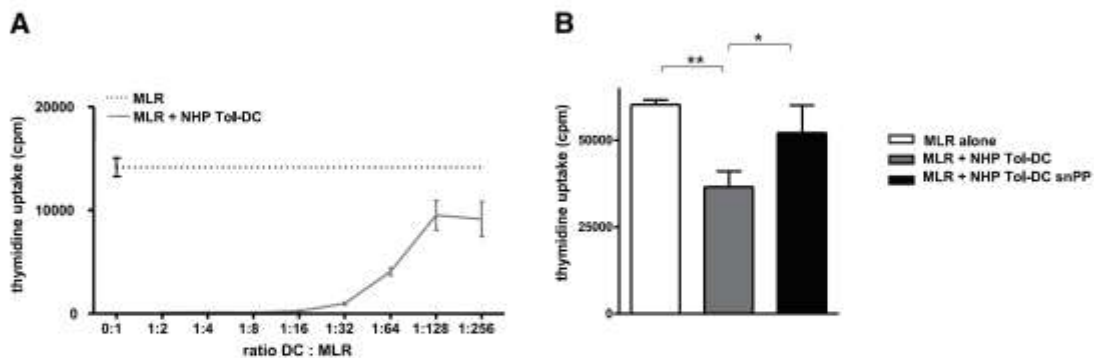


Figure 3. Immunomodulatory effect of adherent BMDCs (Tol-DCs) *in vitro* in macaques. Role of HO-1. **A)** Graded doses of irradiated Tol-DCs (gray line) provided from third-party macaques were added to an allogeneic MLR and cultured for 3 d. MLRs were performed between PBMCs from 2 macaques (one of which was irradiated). T-cell proliferation was measured by [³H] thymidine uptake (cpm). Dotted line indicates MLR baseline. Data are representative of 12 experiments using 12 DC preparations from different macaques. **B)** Macaque Tol-DCs were preincubated with 50 μ M SnPP (an inhibitor of HO-1 activity) (black histogram) for 2 h or not (gray histogram). Next, Tol-DCs were irradiated and added to an allogeneic MLR at a BMDC:PBMC ratio of 1:64 and cultured for 3 d. Responder cell proliferation was measured by [³H] thymidine uptake (cpm). Open histogram represents MLR baseline. Data are representative of ≥ 3 experiments using cells from different animals. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Role of HO-1 *in vivo* in the immunomodulatory effect of syngeneic Tol-DCs in a transplantation model in rats

To test the role of HO-1-expressing DCs in an *in vivo* relevant model of organ transplantation, we performed experiments in rats. We first verified that the *in vitro* effect of HO-1 in rat Tol-DCs was similar to that obtained in macaques. The rat BMDCs used here were generated using a protocol previously reported by us (10). Moreover, rat BMDCs used here displayed the same immature phenotype as the one previously reported (10). As observed in macaques, the addition of rat adherent BMDCs (Tol-DCs) in an allogeneic MLR led to inhibition of T-cell proliferation (Fig. 4A). Furthermore, treatment of rat Tol-DCs with SnPP prevented the inhibition of T-cell proliferation mediated by Tol-DCs (Fig. 4B). After confirming that HO-1 was implicated in tolerogenic effects of Tol-DCs *in vitro*, in order to assess the role of HO-1 in the suppressive activity of Tol-DCs *in vivo*, we used a previously described model of prolongation of heart allograft survival by the administration of syngeneic Tol-DCs in rats (10). Allograft survival of recipients treated with an intravenous injection of Tol-DCs 1 d before transplantation was compared to that observed following treatment with SnPP to block HO-1 production. As shown in

Fig. 4C, the prolongation of allograft survival due to Tol-DC treatment ($n=12$) was totally abrogated by the administration of SnPP ($n=4$) ($P<0.05$). Note that the injection of SnPP without Tol-DC (Fig. 4C) did not modify the kinetics of graft rejection as compared to untreated rats. These data demonstrate that HO-1 is implicated in the prolongation of allograft survival mediated by Tol-DCs *in vivo*.

DISCUSSION

DC-based therapy is a promising approach for reestablishment or induction of antigen-specific tolerance in order to prevent graft rejection and graft-*vs*-host disease, or to treat autoimmune disorders (1). For this purpose, DCs differentiated *in vitro* can be manipulated with different immune modulators, such as IL-10, TGF- β , prostaglandin E2, the antioxidant molecule N-acetyl-L-cysteine, or the vitamin D3 metabolite 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (1). The tolerogenic potential of DCs can also be enhanced through gene transfer strategies or even by treating them *ex vivo* with immunosuppressive drugs (1). However, the origins of DC precursors, as well as the molecular strategy used to differentiate them into DCs, constitute the first variables susceptible of manipulation when "building" a

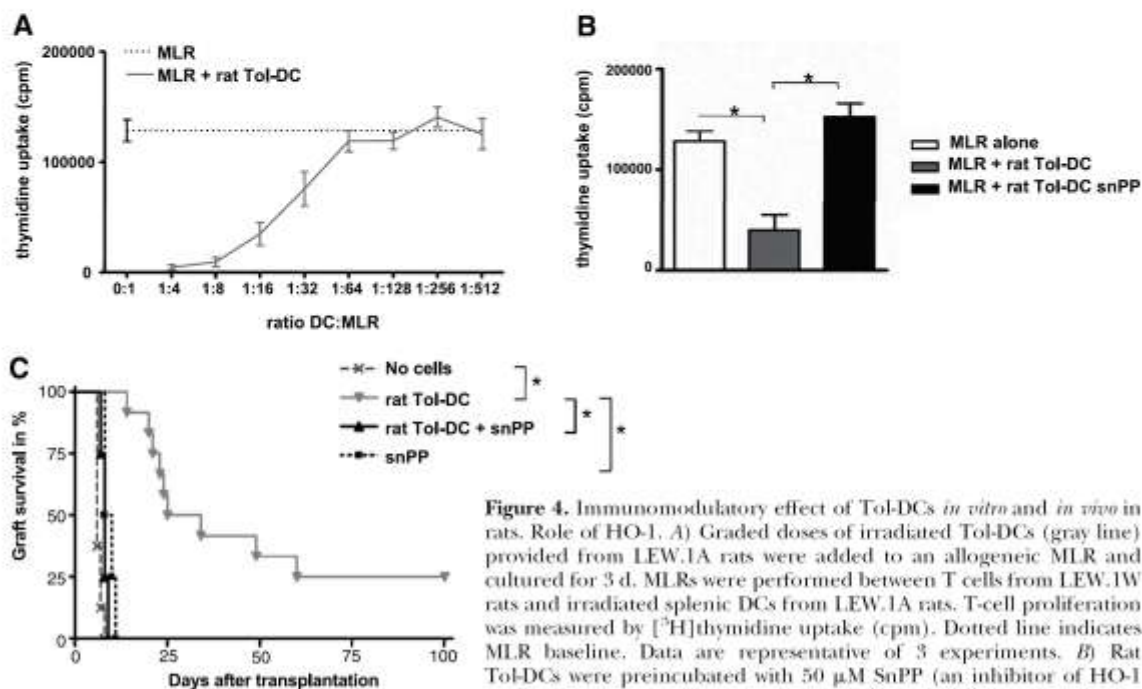


Figure 4. Immunomodulatory effect of Tol-DCs *in vitro* and *in vivo* in rats. Role of HO-1. **A)** Graded doses of irradiated Tol-DCs (gray line) provided from LEW.1A rats were added to an allogeneic MLR and cultured for 3 d. MLRs were performed between T cells from LEW.1W rats and irradiated splenic DCs from LEW.1A rats. T-cell proliferation was measured by [3 H]thymidine uptake (cpm). Dotted line indicates MLR baseline. Data are representative of 3 experiments. **B)** Rat Tol-DCs were preincubated with 50 μ M SnPP (an inhibitor of HO-1 activity) for 2 h or not (gray histogram). Next, BMDCs were irradiated and added to an allogeneic MLR at a BMDC:T-cell ratio of 1:32 and cultured for 3 d. Responder cell proliferation was measured by [3 H]thymidine uptake (cpm). Open histogram represents MLR baseline. Data are representative of ≥ 3 experiments using cells from different animals. **C)** Heterotopic cardiac allografts were performed as described previously. Recipients were untreated (no cells; $n=8$) or injected with syngeneic Tol-DCs the day before transplantation (rat Tol-DCs; $n=12$). A group of allograft recipients receiving Tol-DCs were treated by intraperitoneal injections of SnPP once every 4 d (rat Tol-DC+SnPP; $n=4$). As a control, heart allograft recipients received only intraperitoneal injections of SnPP (SnPP; $n=4$). * $P < 0.05$.

Tol-DC. In murine models, Tol-DCs are usually differentiated from bone marrow progenitors. In contrast, most articles dealing with human or NHP DCs use blood monocytes as DC precursors. Interestingly, autologous hematopoietic stem cell or bone marrow transplantation for the treatment of autoimmune diseases is being studied in clinical trials for several years with positive results (15). Herein, we characterized NHP DCs with HO-1-dependent tolerogenic capacities issued from bone marrow progenitors. Our previous work has shown that NHP monocyte-derived DCs (generated with GM-CSF as in the present work) display a mature phenotype and are potent activators of allogeneic T cells (9). Moreover, the present work has also established that GM-CSF-based DC differentiation is superior to GM-CSF + IL-4 in generating Tol-DCs (not shown). It is worth noting that mouse BMDCs generated *in vitro* with GM-CSF have been reported to prolong allograft survival (12). In agreement with our results, monocyte-derived human DCs generated *in vitro* with GM-CSF were recently reported to actively inhibit T cells, whereas GM-CSF + IL-4-generated DCs were immunogenic (16). Given these results and the findings presented here, one could speculate that one of the optimal conditions for *in vitro* generation of human Tol-DCs should include bone marrow precursors and GM-CSF-induced differentiation.

We have previously shown that rat adherent BMDCs display tolerogenic properties and are able to prolong allograft survival (10, 17). Rat and NHP tolerogenic BMDCs were selected by their expression of class II molecules and on functional criteria, independently of the expression of costimulatory molecules. In the conditions selected for each species, both rat and NHP-adherent BMDC are poor stimulators of allogeneic T cells and actively inhibit T-cell responses. However, NHP adherent BMDCs display a more mature phenotype (increased CD80 and CD86) as compared to rat adherent BMDC. Nevertheless, neither rat nor NHP adherent BMDCs produce detectable levels of IL-12p70 in the culture supernatant. In agreement with our observations, Lutz and Schuler (18) have proposed that despite the level of costimulation molecule expression (immature or semimature BMDCs), tolerogenic or regulatory DCs fail in producing IL-12p70.

In addition to the characterization of the conditions for *in vitro* generation of Tol-DCs, establishing the molecular mechanisms by which these cells actively inhibit immune responses is also a critical issue. It is worth noting that neither inhibition of iNOS or TGF- β nor the IL-10 blockade could impair the immunoregulatory properties of adherent BMDCs (Supplemental Figs. 2 and 3), suggesting that those molecules do not play a significant role in the tolerogenic effect of adherent BMDCs.


Here, we showed that HO-1 is involved in the tolerogenic properties of NHP adherent BMDCs (*in vitro*) and rat adherent BMDCs (*in vitro* and *in vivo*). HO-1 has been classically considered as a cytoprotective and anti-inflammatory enzyme. Nevertheless, a role for

HO-1 in modulation of adaptive immune responses was already suggested by the fact that overexpression of HO-1, or administration of its enzymatic products, prolongs allograft survival in rats (19–21). Moreover, a predominance of Th1-type cytokine secretion has been reported in splenocytes from HO-1^{-/-} mice after polyclonal stimulation of T cells, implying that HO-1 activity is important in modulation of lymphocyte activation (22). Conflicting data have been reported concerning a role for HO-1 in the suppressive properties of regulatory T cells (23, 24). Nevertheless, it has been shown that CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells from HO-1^{-/-} mice do not show impaired regulatory properties as compared to HO-1^{+/+} mice (23). In this framework, expression of HO-1 by the orchestrators of adaptive immune responses, DCs, has opened a whole new perspective in the study of the immunoregulatory properties of HO-1. Indeed, our group has shown that HO-1 impairs the immune stimulatory capacities of DCs (5), and the activity of CD4⁺CD25⁺ Treg in mice is dependent on the expression of HO-1 by DCs (25). HO-1 expression by APCs has been associated to diminished skin (7), graft ischemia-reperfusion (26), and neuroinflammation (8) on systemic HO-1 induction. It has recently been shown that pharmacologic HO-1 inducers can modulate DC biology independently of HO-1 activity (27). However, we and others have observed that HO-1 gene transfer inhibits DC maturation, demonstrating that HO-1 indeed modulates DC maturation (unpublished results and ref. 7). Nevertheless, these works have not directly shown that HO-1⁺ DCs are able to actively modulate adaptive immune responses.

In the present work, we supply evidence showing that HO-1⁺ DCs can actively regulate adaptive immune responses *in vitro* and *in vivo*. We have previously shown that HO-1 overexpression can impair the allostimulatory capacities of DCs by inhibiting LPS-induced DC maturation (5). In this sense, note that HO-1-expressing adherent BMDCs and HO-1-negative nonadherent BMDCs display the same pattern of CD80 and CD86 costimulatory molecule expression. This observation suggests that endogenous HO-1 expression is not modulating the expression of costimulatory molecules. We analyzed the adherent HO-1-expressing BMDC phenotype on HO-1 inhibition. Supplemental Fig. 4 shows that HO-1 inhibition does not modify phenotypic markers in resting or in LPS-treated BMDCs. These observations are in agreement with our previously published results (5), showing that although HO-1 overexpression renders DCs refractory to LPS-induced maturation, endogenous HO-1 inhibition through SnPP did not modify DC phenotype. Therefore, the HO-1-dependent tolerogenic properties of adherent BMDCs described here are not due to lack of costimulation, in agreement with the proposed active inhibition of T cells by HO-1-expressing Tol-DCs. One of these active mechanisms could be Treg expansion. We studied this point by culturing purified allogeneic CD4⁺CD25⁺ Treg with adherent BMDCs (Supplemental Fig. 5). Our results show that adherent BMDCs poorly induced prolifera-

tion of purified Treg, suggesting that HO-1 does not play a role in the stimulation and expansion of Treg. Those results suggest that the inhibition of T cells mediated by tolerogenic BMDCs is not due to the Treg expansion. We therefore believe that HO-1-expressing BMDCs could actively inhibit T cells through the already described effects of the HO-1 enzymatic products biliverdin/bilirubin (21, 28) and CO (29, 30) on T-cell proliferation.

Therefore, HO-1⁺ DCs appear as interesting candidates for cell-based therapy protocols in order to treat immune-mediated damage, such as autoimmunity, graft rejection, or even immunological clearance of transgene products in the gene therapy field. NHP preclinical models are needed to rationalize this kind of immune intervention. The present work has identified and characterized a nonadherent population of immature HO-1⁺ NHP BMDCs. Note that we did not observe significant differences between the phenotypes of the immunosuppressive adherent BMDCs and the immunostimulatory nonadherent BMDCs. However, HO-1 expression was clearly increased in adherent BMDCs compared to nonadherent BMDCs. We have shown, *in vitro*, that these cells can actively regulate lymphocyte responses in an HO-1-dependent manner. Ongoing studies are trying to adjust a protocol in order to use these cells *in vivo* in NHP in order to modulate adaptive immune responses. The fact that the immunosuppressive properties of NHP adherent BMDCs depend on HO-1 constitutes important mechanistic information that will condition the search of adjuvant treatments. In fact, systemic induction of HO-1 has been shown to have synergistic effects with other strategies, such as donor blood-specific transfusion (DST) (31) or even immunosuppressive drugs, such as cyclosporine A (32). It is worth noting that in contrast to systemic HO-1 induction, modulation of immune responses by HO-1⁺ DCs is a controlled system in which antigen specificity can be more easily manipulated, for instance, by antigen loading of Tol-DCs. Therefore, the tool "HO-1⁺ DC" combines the powerful immune regulatory properties of HO-1 with the strategic place of DCs in orchestrating immune responses.

In summary, the present work has established that GM-CSF-generated NHP adherent BMDCs actively inhibit T cells. Tolerogenic properties of NHP adherent BMDCs (*in vitro*) and rat adherent BMDCs (*in vitro* and *in vivo*) depend on HO-1 activity. 

REFERENCES

- Morelli, A. E., and Thomson, A. W. (2007) Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 610–621
- Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685–711
- Reis e Sousa, C. (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 476–483
- Ryter, S. W., Alam, J., and Choi, A. M. (2006) Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* **86**, 583–650
- Chauveau, C., Remy, S., Royer, P. J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F. X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., Josien, R., Cuturi, M. C., and Anegeon, I. (2005) Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* **106**, 1694–1702
- Chabannes, D., Hill, M., Merieau, E., Rossignol, J., Brion, R., Souillou, J. P., Anegeon, I., and Cuturi, M. C. (2007) A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* **110**, 3691–3694
- Listopad, J., Asadullah, K., Sievers, C., Ritter, T., Meisel, C., Sabat, R., and Docke, W. D. (2007) Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. *Exp. Dermatol.* **16**, 661–670
- Chora, A. A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T. F., Cardoso, S., Ho, P. P., Lee, L. Y., Sobel, R. A., Steimman, L., and Soares, M. P. (2007) Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J. Clin. Invest.* **117**, 438–447
- Moreau, A., Chiffolleau, E., Beriou, G., Deschamps, J. Y., Heslan, M., Ashton-Chess, J., Rolling, F., Josien, R., Moullier, P., Cuturi, M. C., and Alliot-Licht, B. (2008) Superiority of bone marrow-derived dendritic cells over monocyte-derived ones for the expansion of regulatory T cells in the macaque. *Transplantation* **85**, 1351–1356
- Peche, H., Trinite, B., Martinet, B., and Cuturi, M. C. (2005) Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am. J. Transplant.* **5**, 255–267
- Hill, M., Pereira, V., Chauveau, C., Zagani, R., Remy, S., Tesson, L., Mazal, D., Ubbilos, L., Brion, R., Asghar, K., Mashreghi, M. F., Kotsch, K., Moffett, J., Doebis, C., Scifert, M., Boczkowski, J., Osinaga, E., and Anegeon, I. (2005) Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J.* **19**, 1957–1968
- Lutz, M. B., Suri, R. M., Niimi, M., Ogilvie, A. L., Kukunich, N. A., Rossner, S., Schuler, G., and Austyn, J. M. (2000) Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1813–1822
- Rosenberg, D. W., Drummond, G. S., and Kappas, A. (1989) The *in vitro* and *in vivo* inhibition of intestinal heme oxygenase by tin-protoporphyrin. *Pharmacology* **39**, 224–229
- Taille, C., El-Benna, J., Lanone, S., Dang, M. C., Ogier-Denis, E., Aubier, M., and Boczkowski, J. (2004) Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J. Biol. Chem.* **279**, 28681–28688
- Griffith, L. M., Pavletic, S. Z., Tyndall, A., Bredeson, C. N., Bowen, J. D., Childs, R. W., Gratwohl, A., van Laar, J. M., Mayes, M. D., Martin, R., McSweeney, P. A., Muraro, P. A., Openshaw, H., Saccardi, R., Sandmaier, B. M., Forman, S. J., and Nash, R. A. (2005) Feasibility of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disease: position statement from a National Institute of Allergy and Infectious Diseases and National Cancer Institute-Sponsored International Workshop, Bethesda, MD, March 12 and 13, 2005. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11**, 862–870
- Chitra, S., Santambrogio, L., and Stern, L. J. (2008) GM-CSF in the absence of other cytokines sustains human dendritic cell precursors with T cell regulatory activity and capacity to differentiate into functional dendritic cells. *Immunol. Lett.* **116**, 41–54
- Beriu, G., Peche, H., Guillonnet, C., Merieau, E., and Cuturi, M. C. (2005) Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. *Transplantation* **79**, 969–972
- Lutz, M. B., and Schuler, G. (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–449
- Braudeau, C., Bouchet, D., Tesson, L., Iyer, S., Remy, S., Buelow, R., Anegeon, I., and Chauveau, C. (2004) Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther.* **11**, 701–710
- Akamatsu, Y., Haga, M., Tyagi, S., Yamashita, K., Graca-Souza, A. V., Ollinger, R., Czismadia, E., May, G. A., Ifedigbo, E., Otterbein, L. E., Bach, F. H., and Soares, M. P. (2004) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from

- transplant associated ischemia reperfusion injury. *FASEB J.* **18**, 771–772
21. Yamashita, K., McDaid, J., Ollinger, R., Tsui, T. Y., Berberat, P. O., Ushewa, A., Csizmadia, E., Smith, R. N., Soares, M. P., and Bach, F. H. (2004) Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J.* **18**, 765–767
 22. Kapturczak, M. H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T. M., Atkinson, M. A., and Agarwal, A. (2004) Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am. J. Pathol.* **165**, 1045–1053
 23. Zelenay, S., Chora, A., Soares, M. P., and Demengeot, J. (2007) Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function. *Int. Immunol.* **19**, 11–18
 24. Choi, B. M., Pae, H. O., Jeong, Y. R., Kim, Y. M., and Chung, H. T. (2005) Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 1066–1071
 25. George, J. F., Braun, A., Brusko, T. M., Joseph, R., Bolisetty, S., Wasserfall, C. H., Atkinson, M. A., Agarwal, A., and Kapturczak, M. H. (2008) Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *Am. J. Pathol.* **173**, 154–160
 26. Kosch, K., Martins, P. N., Klenz, R., Janssen, U., Gerstmayr, B., Denuier, A., Reutzel-Selke, A., Kuckelkorn, U., Tullius, S. G., and Volk, H. D. (2007) Heme oxygenase-1 anchors ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2049–2063
 27. Mashreghi, M. F., Klenz, R., Knosalla, I. S., Gerstmayr, B., Janssen, U., Buelow, R., Jozkowicz, A., Dulak, J., Volk, H. D., and Kosch, K. (2008) Inhibition of dendritic cell maturation and function is independent of heme oxygenase 1 but requires the activation of STAT3. *J. Immunol.* **180**, 7919–7930
 28. Haga, Y., Tempero, M. A., and Zetterman, R. K. (1996) Unconjugated bilirubin inhibits in vitro cytotoxic T lymphocyte activity of human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1317**, 65–70
 29. Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., Kim, Y. M., Chung, K. R., and Chung, H. T. (2004) Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J. Immunol.* **172**, 4744–4751
 30. Song, R., Mahidhara, R. S., Zhou, Z., Hoffman, R. A., Seol, D. W., Flavell, R. A., Billiar, T. R., Otterbein, L. E., and Choi, A. M. (2004) Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J. Immunol.* **172**, 1220–1226
 31. Yamashita, K., Ollinger, R., McDaid, J., Sakahama, H., Wang, H., Tyagi, S., Csizmadia, E., Smith, R. N., Soares, M. P., and Bach, F. H. (2006) Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *FASEB J.* **20**, 776–778
 32. Lee, D. Y., Lee, S., Nam, J. H., and Byun, Y. (2006) Minimization of immunosuppressive therapy after islet transplantation: combined action of heme oxygenase-1 and PEGylation to islet. *Am. J. Transplant.* **6**, 1820–1828

Received for publication January 21, 2009.

Accepted for publication April 9, 2009.

BIBLIOGRAPHIE

- Afzali, B., R. I. Lechler and M. P. Hernandez-Fuentes (2007). "Allorecognition and the alloresponse: clinical implications." Tissue Antigens **69**(6): 545-56.
- Albert, M. L., M. Jegathesan and R. B. Darnell (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." Nat Immunol **2**(11): 1010-7.
- Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." Nature **392**(6671): 86-9.
- Alexander, S. I., N. Smith, M. Hu, D. Verran, A. Shun, S. Dorney, A. Smith, B. Webster, P. J. Shaw, A. Lammi and M. O. Stormon (2008). "Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased-donor liver transplant." N Engl J Med **358**(4): 369-74.
- Ali, A., M. Garroville, M. X. Jin, M. A. Hardy and S. F. Oluwole (2000). "Major histocompatibility complex class I peptide-pulsed host dendritic cells induce antigen-specific acquired thymic tolerance to islet cells." Transplantation **69**(2): 221-6.
- Aliberti, J., C. Reis e Sousa, M. Schito, S. Hieny, T. Wells, G. B. Huffnagle and A. Sher (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells." Nat Immunol **1**(1): 83-7.
- Aliberti, J., J. G. Valenzuela, V. B. Carruthers, S. Hieny, J. Andersen, H. Charest, C. Reis e Sousa, A. Fairlamb, J. M. Ribeiro and A. Sher (2003). "Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells." Nat Immunol **4**(5): 485-90.
- Anderson, G., K. M. Partington and E. J. Jenkinson (1998). "Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus." J Immunol **161**(12): 6599-603.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist and D. Mathis (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." Science **298**(5597): 1395-401.
- Antonyamy, M. A., W. C. Fanslow, F. Fu, W. Li, S. Qian, A. B. Troutt and A. W. Thomson (1999). "Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors." J Immunol **162**(1): 577-84.
- Appay, V., J. J. Zaunders, L. Papagno, J. Sutton, A. Jaramillo, A. Waters, P. Easterbrook, P. Grey, D. Smith, A. J. McMichael, D. A. Cooper, S. L. Rowland-Jones and A. D. Kelleher (2002). "Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo." J Immunol **168**(11): 5954-8.
- Armstrong, H. E., E. M. Bolton, I. McMillan, S. C. Spencer and J. A. Bradley (1987). "Prolonged survival of actively enhanced rat renal allografts despite accelerated

- cellular infiltration and rapid induction of both class I and class II MHC antigens." J Exp Med **165**(3): 891-907.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." J Exp Med **184**(2): 387-96.
- Ashton-Chess, J., M. Giral, S. Brouard and J. P. Soulillou (2007). "Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation." Transplantation **84**(10): 1215-9.
- Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman and F. Powrie (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." J Exp Med **190**(7): 995-1004.
- Atochina, O., T. Daly-Engel, D. Piskorska, E. McGuire and D. A. Harn (2001). "A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism." J Immunol **167**(8): 4293-302.
- Auchincloss, H., Jr., R. Lee, S. Shea, J. S. Markowitz, M. J. Grusby and L. H. Glimcher (1993). "The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3373-7.
- Baan, C. C., B. J. van der Mast, M. Klepper, W. M. Mol, A. M. Peeters, S. S. Korevaar, A. H. Balk and W. Weimar (2005). "Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells." Transplantation **80**(1): 110-7.
- Bachmann, M. F., B. R. Wong, R. Josien, R. M. Steinman, A. Oxenius and Y. Choi (1999). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation." J Exp Med **189**(7): 1025-31.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." Nat Rev Immunol **5**(4): 296-306.
- Banerjee, D. K., M. V. Dhodapkar, E. Matayeva, R. M. Steinman and K. M. Dhodapkar (2006). "Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients." Blood **108**(8): 2655-61.
- Bardel, E., F. Larousserie, P. Charlot-Rabiega, A. Coulomb-L'Hermine and O. Devergne (2008). "Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35." J Immunol **181**(10): 6898-905.

- Barker, C. F. and R. E. Billingham (1977). "Immunologically privileged sites." Adv Immunol **25**: 1-54.
- Battaglia, M., A. Stabilini, B. Migliavacca, J. Horejs-Hoeck, T. Kaupper and M. G. Roncarolo (2006). "Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients." J Immunol **177**(12): 8338-47.
- Batten, M., J. Li, S. Yi, N. M. Kljavin, D. M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F. J. de Sauvage and N. Ghilardi (2006). "Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells." Nat Immunol **7**(9): 929-36.
- Belghith, M., J. A. Bluestone, S. Barriot, J. Megret, J. F. Bach and L. Chatenoud (2003). "TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes." Nat Med **9**(9): 1202-8.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach and D. L. Sacks (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity." Nature **420**(6915): 502-7.
- Bendelac, A., M. N. Rivera, S. H. Park and J. H. Roark (1997). "Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function." Annu Rev Immunol **15**: 535-62.
- Benichou, G., P. A. Takizawa, C. A. Olson, M. McMillan and E. E. Sercarz (1992). "Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection." J Exp Med **175**(1): 305-8.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-1.
- Benoist, C. and D. Mathis (1989). "Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur?" Cell **58**(6): 1027-33.
- Beriou, G., H. Peche, C. Guillonnet, E. Merieau and M. C. Cuturi (2005). "Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression." Transplantation **79**(8): 969-72.
- Bernabei, P., E. M. Coccia, L. Rigamonti, M. Bosticardo, G. Forni, S. Pestka, C. D. Krause, A. Battistini and F. Novelli (2001). "Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death." J Leukoc Biol **70**(6): 950-60.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-8.

- Biocca, S., I. Filesi, R. Mango, L. Maggiore, F. Baldini, L. Vecchione, A. Viola, G. Citro, G. Federici, F. Romeo and G. Novelli (2008). "The splice variant LOXIN inhibits LOX-1 receptor function through hetero-oligomerization." J Mol Cell Cardiol **44**(3): 561-70.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot and J. C. Howard (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-95.
- Boitard, C., R. Yasunami, M. Dardenne and J. F. Bach (1989). "T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice." J Exp Med **169**(5): 1669-80.
- Bolton, E. M., J. A. Gracie, J. D. Briggs, J. Kampinga and J. A. Bradley (1989). "Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat." J Exp Med **169**(6): 1931-46.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." J Exp Med **196**(12): 1627-38.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky and P. Bousso (2000). "Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion." Immunity **13**(6): 829-40.
- Brandle, D., J. Joergensen, G. Zenke, K. Burki and R. P. Hof (1998). "Contribution of donor-specific antibodies to acute allograft rejection: evidence from B cell-deficient mice." Transplantation **65**(11): 1489-93.
- Brent, L. and P. B. Medawar (1967). "Cellular immunity and the homograft reaction." Br Med Bull **23**(1): 55-60.
- Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol **6**(1): 33-43.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Brunner, T., R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware and et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." Nature **373**(6513): 441-4.
- Bugeon, L., M. C. Cuturi, J. Paineau, I. Anegon and J. P. Souillou (1993). "Similar levels of granzyme A and perforin mRNA expression in rejected and tolerated heart allografts in donor-specific tolerance in rats." Transplantation **56**(2): 405-8.
- Buhler, L. H., T. R. Spitzer, M. Sykes, D. H. Sachs, F. L. Delmonico, N. Tolckoff-Rubin, S. L. Saidman, R. Sackstein, S. McAfee, B. Dey, C. Colby and A. B. Cosimi (2002).

- "Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease." Transplantation **74**(10): 1405-9.
- Campos, L., A. Naji, B. C. Deli, J. H. Kern, J. I. Kim, C. F. Barker and J. F. Markmann (1995). "Survival of MHC-deficient mouse heterotopic cardiac allografts." Transplantation **59**(2): 187-91.
- Carrier, Y., J. Yuan, V. K. Kuchroo and H. L. Weiner (2007). "Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice." J Immunol **178**(1): 179-85.
- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt and J. Banchereau (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." J Exp Med **184**(2): 695-706.
- Cayabyab, M., J. H. Phillips and L. L. Lanier (1994). "CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes." J Immunol **152**(4): 1523-31.
- Cederbom, L., H. Hall and F. Ivars (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." Eur J Immunol **30**(6): 1538-43.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." J Exp Med **184**(2): 747-52.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera and N. Suci-Foca (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." Nat Immunol **3**(3): 237-43.
- Chen, W., M. S. Ford, K. J. Young, M. I. Cybulsky and L. Zhang (2003a). "Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival." J Immunol **170**(4): 1846-53.
- Chen, W., M. S. Ford, K. J. Young and L. Zhang (2003b). "Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice." Transplant Proc **35**(7): 2479-80.

- Chen, W., M. S. Ford, K. J. Young and L. Zhang (2004). "The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses." Cell Mol Immunol **1**(5): 328-35.
- Chen, W., D. Zhou, J. R. Torrealba, T. K. Waddell, D. Grant and L. Zhang (2005). "Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells." J Immunol **175**(5): 3409-16.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-40.
- Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (2002a). "Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation." Am J Transplant **2**(8): 745-57.
- Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (2002b). "Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment." J Immunol **168**(10): 5058-69.
- Ciubotariu, R., Z. Liu, A. I. Colovai, E. Ho, S. Itescu, S. Ravalli, M. A. Hardy, R. Cortesini, E. A. Rose and N. Suci-Foca (1998). "Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts." J Clin Invest **101**(2): 398-405.
- Cobbold, S. P., R. Castejon, E. Adams, D. Zelenika, L. Graca, S. Humm and H. Waldmann (2004). "Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants." J Immunol **172**(10): 6003-10.
- Coenen, J. J., H. J. Koenen, E. van Rijssen, A. Kasran, L. Boon, L. B. Hilbrands and I. Joosten (2007). "Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells." Bone Marrow Transplant **39**(9): 537-45.
- Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-9.
- Colonna, M., J. Samaridis and L. Angman (2000). "Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells." Eur J Immunol **30**(2): 697-704.
- Colovai, A. I., Z. Liu, R. Ciubotariu, S. Lederman, R. Cortesini and N. Suci-Foca (2000). "Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells." Transplantation **69**(7): 1304-10.

- Colovai, A. I., M. Mirza, G. Vlad, S. Wang, E. Ho, R. Cortesini and N. Suci-Foca (2003). "Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients." Hum Immunol **64**(1): 31-7.
- Cortesini, R., E. Renna-Molajoni, P. Cinti, R. Pretagostini, E. Ho, P. Rossi and N. Suci-Foca Cortesini (2002). "Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells." Hum Immunol **63**(11): 1010-8.
- Cosmi, L., F. Liotta, E. Lazzeri, M. Francalanci, R. Angeli, B. Mazzinghi, V. Santarlasci, R. Manetti, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2003). "Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes." Blood **102**(12): 4107-14.
- Cresswell, P., A. L. Ackerman, A. Giodini, D. R. Peaper and P. A. Wearsch (2005). "Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation." Immunol Rev **207**: 145-57.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2002). "CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy." Curr Opin Immunol **14**(6): 771-8.
- Dalloul, A. H., E. Chmouzis, K. Ngo and W. P. Fung-Leung (1996). "Adoptively transferred CD4+ lymphocytes from CD8 -/- mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts." J Immunol **156**(11): 4114-9.
- Dantal, J. and J. P. Soulillou (2005). "Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation." N Engl J Med **352**(13): 1371-3.
- Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." Nat Immunol **9**(12): 1347-55.
- Degauque, N., D. Lair, A. Dupont, A. Moreau, G. Roussey, F. Moizant, F. X. Hubert, C. Louvet, M. Hill, F. Haspot, R. Josien, C. Usal, B. Vanhove, J. P. Soulillou and S. Brouard (2006). "Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells." J Immunol **176**(7): 3915-22.
- Denk, A., T. Wirth and B. Baumann (2000). "NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival." Cytokine Growth Factor Rev **11**(4): 303-20.
- Derbinski, J., J. Gabler, B. Brors, S. Tierling, S. Jonnakuty, M. Hergenahn, L. Peltonen, J. Walter and B. Kyewski (2005). "Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels." J Exp Med **202**(1): 33-45.

- Devergne, O., M. Birkenbach and E. Kieff (1997). "Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12041-6.
- Dhodapkar, M. V., K. M. Dhodapkar and A. K. Palucka (2008). "Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance." Cell Death Differ **15**(1): 39-50.
- Dhodapkar, M. V. and R. M. Steinman (2002). "Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans." Blood **100**(1): 174-7.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.
- Dickneite, G., H. U. Schorlemmer, P. Walter, J. Thies and H. H. Sedlacek (1986). "The influence of (+/-)-15-deoxyspergualin on experimental transplantation and its immunopharmacological mode of action." Behring Inst Mitt(80): 93-102.
- dPalucka, A. K., H. Ueno, J. W. Fay and J. Banchereau (2007). "Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells." Immunol Rev **220**: 129-50.
- Du, W., F. S. Wong, M. O. Li, J. Peng, H. Qi, R. A. Flavell, R. Sherwin and L. Wen (2006). "TGF-beta signaling is required for the function of insulin-reactive T regulatory cells." J Clin Invest **116**(5): 1360-70.
- Ducrocy, P., O. Micheau, S. Perruche, L. Dubrez-Daloz, D. de Fornel, P. Dutartre, P. Saas and E. Solary (2003). "LF 15-0195 immunosuppressive agent enhances activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level." Blood **101**(1): 194-201.
- Duplan, V., G. Beriou, J. M. Heslan, C. Bruand, P. Dutartre, L. T. Mars, R. S. Liblau, M. C. Cuturi and A. Saoudi (2006). "LF 15-0195 treatment protects against central nervous system autoimmunity by favoring the development of Foxp3-expressing regulatory CD4 T cells." J Immunol **176**(2): 839-47.
- Essery, G., M. Feldmann and J. R. Lamb (1988). "Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes." Immunology **64**(3): 413-7.
- Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell and F. Powrie (2005). "T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **201**(5): 737-46.
- Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre and P. Puccetti (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." Nat Immunol **4**(12): 1206-12.

- Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle and M. F. Neurath (2004). "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7." J Immunol **172**(9): 5149-53.
- Ferrero, I., W. Held, A. Wilson, F. Tacchini-Cottier, F. Radtke and H. R. MacDonald (2002). "Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage." Blood **100**(8): 2852-7.
- Fink, P. J. and M. J. Bevan (1978). "H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity." J Exp Med **148**(3): 766-75.
- Fischer, K., S. Voelkl, J. Heymann, G. K. Przybylski, K. Mondal, M. Laumer, L. Kunz-Schughart, C. A. Schmidt, R. Andreesen and A. Mackensen (2005). "Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells." Blood **105**(7): 2828-35.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-6.
- Ford McIntyre, M. S., K. J. Young, J. Gao, B. Joe and L. Zhang (2008). "Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression." J Immunol **181**(4): 2271-5.
- Ford, M. S., K. J. Young, Z. Zhang, P. S. Ohashi and L. Zhang (2002). "The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo." J Exp Med **196**(2): 261-7.
- Frauwirth, K. A. and C. B. Thompson (2002). "Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation." J Clin Invest **109**(3): 295-9.
- Frey, A. B. and T. D. Rao (1999). "NKT cell cytokine imbalance in murine diabetes mellitus." Autoimmunity **29**(3): 201-14.
- Fu, F., Y. Li, S. Qian, L. Lu, F. D. Chambers, T. E. Starzl, J. J. Fung and A. W. Thomson (1997). "Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors induce T cell hyporesponsiveness in vitro and prolong the survival of vascularized cardiac allografts." Transplant Proc **29**(1-2): 1310.
- Fukaura, H., S. C. Kent, M. J. Pietrusewicz, S. J. Khoury, H. L. Weiner and D. A. Hafler (1996). "Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients." J Clin Invest **98**(1): 70-7.
- Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze and J. J. Lafaille (2002). "Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function." J Exp Med **196**(6): 851-7.

- Garrovillo, M., A. Ali, H. A. Depaz, R. Gopinathan, O. O. Oluwole, M. A. Hardy and S. F. Oluwole (2001). "Induction of transplant tolerance with immunodominant allopeptide-pulsed host lymphoid and myeloid dendritic cells." Am J Transplant **1**(2): 129-37.
- Garrovillo, M., A. Ali and S. F. Oluwole (1999). "Indirect allorecognition in acquired thymic tolerance: induction of donor-specific tolerance to rat cardiac allografts by allopeptide-pulsed host dendritic cells." Transplantation **68**(12): 1827-34.
- Gavanescu, I., B. Kessler, H. Ploegh, C. Benoist and D. Mathis (2007). "Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4583-7.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." Immunology **18**(5): 723-37.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1971). "Infectious immunological tolerance." Immunology **21**(6): 903-14.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.
- Gill, T. J., 3rd, H. W. Kunz, D. N. Misra and A. L. Hassett (1987). "The major histocompatibility complex of the rat." Transplantation **43**(6): 773-85.
- Gokmen, M. R., G. Lombardi and R. I. Lechler (2008). "The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation." Curr Opin Immunol **20**(5): 568-74.
- Goldrath, A. W. and M. J. Bevan (1999). "Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire." Nature **402**(6759): 255-62.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol **174**(4): 1783-6.
- Gotter, J., B. Brors, M. Hergenbahn and B. Kyewski (2004). "Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters." J Exp Med **199**(2): 155-66.
- Goubier, A., B. Dubois, H. Gheit, G. Joubert, F. Villard-Truc, C. Asselin-Paturel, G. Trinchieri and D. Kaiserlian (2008). "Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance." Immunity **29**(3): 464-75.
- Gowans, J. L. (1977). "Cellular mediators of allograft immunity." Transplant Proc **9**(1): 685-90.
- Green, D. R. and D. R. Webb (1993). "Saying the 'S' word in public." Immunol Today **14**(11): 523-5.
- Green, E. A., L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran and R. A. Flavell (2003). "CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10878-83.

- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1996). "A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses." Immunol Today **17**(9): 410-4.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004a). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." Immunity **21**(4): 589-601.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004b). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." Blood **104**(9): 2840-8.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
- Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-67.
- Guillonneau, C., M. Hill, F. X. Hubert, E. Chiffolleau, C. Herve, X. L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Menoret, A. Saoudi, B. Le Mauff, R. Josien, M. C. Cuturi and I. Anegon (2007). "CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase." J Clin Invest **117**(4): 1096-106.
- Hackstein, H., T. Taner, A. J. Logar and A. W. Thomson (2002). "Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells." Blood **100**(3): 1084-7.
- Hackstein, H., T. Taner, A. F. Zahorchak, A. E. Morelli, A. J. Logar, A. Gessner and A. W. Thomson (2003). "Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo." Blood **101**(11): 4457-63.
- Hall, B. M., S. Dorsch and B. Roser (1978). "The cellular basis of allograft rejection in vivo. I. The cellular requirements for first-set rejection of heart grafts." J Exp Med **148**(4): 878-89.
- Hall, B. M., M. E. Jelbart, K. E. Gurley and S. E. Dorsch (1985). "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. Mediation of specific suppression by T helper/inducer cells." J Exp Med **162**(5): 1683-94.
- Handel, A., A. Yates, S. S. Pilyugin and R. Antia (2007). "Gap junction-mediated antigen transport in immune responses." Trends Immunol **28**(11): 463-6.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-32.

- 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. Souillou 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**(10): 2339-48.
- Hawiger, D., R. F. Masilamani, E. Bettelli, V. K. Kuchroo and M. C. Nussenzweig (2004). "Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo." Immunity **20**(6): 695-705.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, R. Tibbott, F. Salcido Ochoa, M. J. James, F. M. Marelli-Berg and R. I. Lechler (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." J Immunol **173**(8): 4828-37.
- Heslan, J. M., G. Beriou, J. B. Le Luduec, C. Guillonnet, I. Anegon, J. P. Souillou, M. C. Cuturi and E. Chiffoleau (2005). "Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vbeta7-TCR rearrangements in tolerated allografts." Transplantation **80**(10): 1476-84.
- Heslan, J. M., K. Renaudin, P. Thebault, R. Josien, M. C. Cuturi and E. Chiffoleau (2006). "New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance." Transplantation **82**(9): 1185-93.
- Higuchi, M., D. Zeng, J. Shizuru, J. Gworek, S. Dejbakhsh-Jones, M. Taniguchi and S. Strober (2002). "Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion." J Immunol **169**(10): 5564-70.
- Hollander, G. A., S. Zuklys, E. Forster and W. Krenger (1999). "On costimulatory signals and T cell tolerance: relevance for transplantation immunity." Transplant Proc **31**(1-2A): 25S-31S.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.
- Hsu, F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman and R. Levy (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." Nat Med **2**(1): 52-8.
- Huang, C. A., Y. Fuchimoto, R. Scheier-Dolberg, M. C. Murphy, D. M. Neville, Jr. and D. H. Sachs (2000). "Stable mixed chimerism and tolerance using a nonmyeloablative preparative regimen in a large-animal model." J Clin Invest **105**(2): 173-81.
- Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake and D. A. Vignali (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." Immunity **21**(4): 503-13.

- Ito, J., T. Yamashita, K. Takahashi, H. Horinishi, T. Nakamura, T. Takeuchi and H. Umezawa (1986). "Anti-leukemic activity of 15-deoxyspergualin against N-butyl-N-nitrosourea-induced autochthonous rat leukemia." J Antibiot (Tokyo) **39**(10): 1488-90.
- Jameson, J., D. Witherden and W. L. Havran (2003). "T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets." Curr Opin Immunol **15**(3): 349-53.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-6.
- Janeway, C. A., Jr. and K. Bottomly (1994). "Signals and signs for lymphocyte responses." Cell **76**(2): 275-85.
- Jiang, S., O. Herrera and R. I. Lechler (2004). "New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **16**(5): 550-7.
- Jiang, S., S. Tugulea, G. Pennesi, Z. Liu, A. Mulder, S. Lederman, P. Harris, R. Cortesini and N. Suci-Foca (1998). "Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro." Hum Immunol **59**(11): 690-9.
- Jondal, M., R. Schirmbeck and J. Reimann (1996). "MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens." Immunity **5**(4): 295-302.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-22.
- Josien, R., M. Heslan, S. Brouard, J. P. Souillou and M. C. Cuturi (1998). "Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion." Blood **92**(12): 4539-44.
- Kabelitz, D., T. Pohl and K. Pechhold (1993). "Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes." Immunol Today **14**(7): 338-9.
- Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." Nature **369**(6475): 31-7.
- Kamradt, T. and N. A. Mitchison (2001). "Tolerance and autoimmunity." N Engl J Med **344**(9): 655-64.
- Kanazawa, N. (2007). "Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells." J Dermatol Sci **45**(2): 77-86.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, R. B. Colvin, J. Powelson, J. Eason, T. Kozlowski, M. Sykes, R. Monroy, M. Tanaka and D. H. Sachs (1995). "Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys." Transplantation **59**(2): 256-62.

- Kempe, S., P. Heinz, E. Kokai, O. Devergne, N. Marx and T. Wirth (2009). "Epstein-barr virus-induced gene-3 is expressed in human atheroma plaques." Am J Pathol **175**(1): 440-7.
- Khan, Q., J. M. Penninger, L. Yang, L. E. Marra, I. Kozieradzki and L. Zhang (1999). "Regulation of apoptosis in mature alphabeta+CD4-CD8- antigen-specific suppressor T cell clones." J Immunol **162**(10): 5860-7.
- Kishimoto, K., S. Sandner, J. Imitola, M. Sho, Y. Li, P. B. Langmuir, D. M. Rothstein, T. B. Strom, L. A. Turka and M. H. Sayegh (2002). "Th1 cytokines, programmed cell death, and alloreactive T cell clone size in transplant tolerance." J Clin Invest **109**(11): 1471-9.
- Klatt, A. R., G. Klinger, D. Zech, B. Paul-Klausch, J. H. Renno, J. Schmidt, G. Malchau and K. Wielckens (2007). "RNAi in primary human chondrocytes: efficiencies, kinetics, and non-specific effects of siRNA-mediated gene suppression." Biologicals **35**(4): 321-8.
- Kleinschek, M. A., A. M. Owyang, B. Joyce-Shaikh, C. L. Langrish, Y. Chen, D. M. Gorman, W. M. Blumenschein, T. McClanahan, F. Brombacher, S. D. Hurst, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2007). "IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation." J Exp Med **204**(1): 161-70.
- Ko, S., A. Deiwick, M. D. Jager, A. Dinkel, F. Rohde, R. Fischer, T. Y. Tsui, K. L. Rittmann, K. Wonigeit and H. J. Schlitt (1999). "The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat." Nat Med **5**(11): 1292-7.
- Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani and G. Schuler (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." J Exp Med **184**(2): 741-6.
- Komesli, S., C. Dumas and P. Dutartre (1999). "Analysis of in vivo immunosuppressive and in vitro interaction with constitutive heat shock protein 70 activity of LF08-0299 (Tresperimus) and analogues." Int J Immunopharmacol **21**(5): 349-58.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." Nature **448**(7152): 484-7.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-95.
- Krensky, A. M., A. Weiss, G. Crabtree, M. M. Davis and P. Parham (1990). "T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection." N Engl J Med **322**(8): 510-7.

- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig and H. von Boehmer (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." Nat Immunol **6**(12): 1219-27.
- Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen and W. Zou (2006). "Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells." J Immunol **177**(1): 40-4.
- Kurts, C., R. M. Sutherland, G. Davey, M. Li, A. M. Lew, E. Blanas, F. R. Carbone, J. F. Miller and W. R. Heath (1999). "CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12703-7.
- Kyewski, B., J. Derbinski, J. Gotter and L. Klein (2002). "Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye." Trends Immunol **23**(7): 364-71.
- Lafferty, K. J., L. Andrus and S. J. Prowse (1980). "Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses." Immunol Rev **51**: 279-314.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, B. T. Konieczny and Y. Inoue (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." Nat Med **6**(6): 686-8.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-40.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2001). "Regulation of T cell immunity by dendritic cells." Cell **106**(3): 263-6.
- Laurence, A., C. M. Tato, T. S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R. B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E. M. Shevach and J. O'Shea J (2007). "Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation." Immunity **26**(3): 371-81.
- Lazetic, S., C. Chang, J. P. Houchins, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1996). "Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits." J Immunol **157**(11): 4741-5.
- Le Berre, L., S. Bruneau, J. Nault, K. Renaudin, F. Buzelin, C. Usal, H. Smit, T. Condamine, J. P. Soulillou and J. Dantal (2009). "Induction of T regulatory cells attenuates idiopathic nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **20**(1): 57-67.
- Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman and W. E. Paul (1990). "Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells." J Exp Med **172**(3): 921-9.
- Lebreton, L., E. Jost, B. Carboni, J. Annat, M. Vaultier, P. Dutartre and P. Renaut (1999). "Structure-immunosuppressive activity relationships of new analogues of 15-deoxyspergualin. 2. Structural modifications of the spermidine moiety." J Med Chem **42**(23): 4749-63.

- Lechler, R., J. G. Chai, F. Marelli-Berg and G. Lombardi (2001). "The contributions of T-cell energy to peripheral T-cell tolerance." Immunology **103**(3): 262-9.
- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells." J Exp Med **155**(1): 31-41.
- Lechler, R. I., G. Lombardi, J. R. Batchelor, N. Reinsmoen and F. H. Bach (1990). "The molecular basis of alloreactivity." Immunol Today **11**(3): 83-8.
- Lee, K. M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattry, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson and J. A. Bluestone (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." Science **282**(5397): 2263-6.
- Lee, R. S., M. J. Grusby, L. H. Glimcher, H. J. Winn and H. Auchincloss, Jr. (1994). "Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo." J Exp Med **179**(3): 865-72.
- Leibundgut-Landmann, S., F. Osorio, G. D. Brown and C. Reis e Sousa (2008). "Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses." Blood **112**(13): 4971-80.
- Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini and M. G. Roncarolo (2005). "Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells." Blood **105**(3): 1162-9.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, F. Galbiati, S. Squadrone, R. de Waal Malefyt and M. G. Roncarolo (2001). "IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells." J Immunol **166**(9): 5530-9.
- Levisetti, M. G., P. A. Padrid, G. L. Szot, N. Mittal, S. M. Meehan, C. L. Wardrip, G. S. Gray, D. S. Bruce, J. R. Thistlethwaite, Jr. and J. A. Bluestone (1997). "Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation." J Immunol **159**(11): 5187-91.
- Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol **180**(9): 5916-26.
- Libby, P. and J. S. Pober (2001). "Chronic rejection." Immunity **14**(4): 387-97.
- Lindahl, K. F. and D. B. Wilson (1977). "Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors." J Exp Med **145**(3): 508-22.
- Linsley, P. S. and J. A. Ledbetter (1993). "The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen." Annu Rev Immunol **11**: 191-212.

- Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen and C. C. Goodnow (2003). "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." Nat Immunol **4**(4): 350-4.
- Liu, H., B. Hu, D. Xu and F. Y. Liew (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4." J Immunol **171**(10): 5012-7.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler and J. A. Bluestone (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-11.
- Liu, Y., N. Chen, G. Chen and P. You (2007). "The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation." Transplant Proc **39**(10): 3396-403.
- Liu, Z., Y. K. Sun, Y. P. Xi, A. Maffei, E. Reed, P. Harris and N. Suci-Foca (1993). "Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity." J Exp Med **177**(6): 1643-50.
- Liu, Z., S. Tugulea, R. Cortesini and N. Suci-Foca (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." Int Immunol **10**(6): 775-83.
- Loong, C. C., H. G. Hsieh, W. Y. Lui, A. Chen and C. Y. Lin (2002). "Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection." J Pathol **197**(3): 322-32.
- Lu, L., W. Li, F. Fu, F. G. Chambers, S. Qian, J. J. Fung and A. W. Thomson (1997). "Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival." Transplantation **64**(12): 1808-15.
- Lubberts, E., L. A. Joosten, M. Chabaud, L. van Den Bersselaar, B. Oppers, C. J. Coenen-De Roo, C. D. Richards, P. Miossec and W. B. van Den Berg (2000). "IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion." J Clin Invest **105**(12): 1697-710.
- Lumsden, J. M., J. A. Williams and R. J. Hodes (2003). "Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in vivo." J Immunol **170**(2): 781-7.
- Lundqvist, A., A. Palmborg, M. Pavlenko, J. Levitskaya and P. Pisa (2005). "Mature dendritic cells induce tumor-specific type 1 regulatory T cells." J Immunother **28**(3): 229-35.
- Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol **23**(9): 445-9.
- Malleo, G., E. Mazzon, T. Genovese, R. Di Paola, R. Caminiti, E. Esposito, P. Bramanti and S. Cuzzocrea (2008). "Absence of endogenous interleukin-10 enhanced organ

- dysfunction and mortality associated to zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome." Cytokine **41**(2): 136-43.
- Manavalan, J. S., S. Kim-Schulze, L. Scotto, A. J. Naiyer, G. Vlad, P. C. Colombo, C. Marboe, D. Mancini, R. Cortesini and N. Suci-Foca (2004). "Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity." Int Immunol **16**(8): 1055-68.
- Manavalan, J. S., P. C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yarilina, R. Cortesini, D. Mancini and N. Suci-Foca (2003). "High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells." Transpl Immunol **11**(3-4): 245-58.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. Weaver (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-4.
- Markmann, J. F., H. Bassiri, N. M. Desai, J. S. Odorico, J. I. Kim, B. H. Koller, O. Smithies and C. F. Barker (1992). "Indefinite survival of MHC class I-deficient murine pancreatic islet allografts." Transplantation **54**(6): 1085-9.
- Marsland, B. J., P. Battig, M. Bauer, C. Ruedl, U. Lassing, R. R. Beerli, K. Dietmeier, L. Ivanova, T. Pfister, L. Vogt, H. Nakano, C. Nembrini, P. Saudan, M. Kopf and M. F. Bachmann (2005). "CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells." Immunity **22**(4): 493-505.
- Matzinger, P. and M. J. Bevan (1977). "Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?" Cell Immunol **29**(1): 1-5.
- Mc Dermott, R., U. Ziyhan, D. Spehner, H. Bausinger, D. Lipsker, M. Mommaas, J. P. Cazenave, G. Raposo, B. Goud, H. de la Salle, J. Salamero and D. Hanau (2002). "Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates." Mol Biol Cell **13**(1): 317-35.
- McKenzie, J. L., M. E. Beard and D. N. Hart (1984). "Depletion of donor kidney dendritic cells prolongs graft survival." Transplant Proc **16**(4): 948-51.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**(3): 255-8.
- Mellor, A. L., B. Baban, P. Chandler, B. Marshall, K. Jhaver, A. Hansen, P. A. Koni, M. Iwashima and D. H. Munn (2003). "Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion." J Immunol **171**(4): 1652-5.

- Mellor, A. L. and D. H. Munn (1999). "Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?" Immunol Today **20**(10): 469-73.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-74.
- Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler and M. B. Lutz (2002). "Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity." J Exp Med **195**(1): 15-21.
- Merrill, J. P., J. E. Murray, J. H. Harrison and W. R. Guild (1956). "Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins." J Am Med Assoc **160**(4): 277-82.
- Miller, J., L. Daitch, S. Rath and E. Selsing (1990). "Tissue-specific expression of allogeneic class II MHC molecules induces neither tissue rejection nor clonal inactivation of alloreactive T cells." J Immunol **144**(1): 334-41.
- Min, W. P., D. Zhou, T. E. Ichim, G. H. Strejan, X. Xia, J. Yang, X. Huang, B. Garcia, D. White, P. Dutartre, A. M. Jevnikar and R. Zhong (2003a). "Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance." J Immunol **170**(3): 1304-12.
- Min, W. P., D. Zhou, T. E. Ichim, X. Xia, X. Zhang, J. Yang, X. Huang, B. Garcia, P. Dutartre, A. M. Jevnikar, G. H. Strejan and R. Zhong (2003b). "Synergistic tolerance induced by LF15-0195 and anti-CD45RB monoclonal antibody through suppressive dendritic cells." Transplantation **75**(8): 1160-5.
- Moreau, A., E. Chiffolleau, G. Beriou, J. Y. Deschamps, M. Heslan, J. Ashton-Chess, F. Rolling, R. Josien, P. Moullier, M. C. Cuturi and B. Alliot-Licht (2008). "Superiority of bone marrow-derived dendritic cells over monocyte-derived ones for the expansion of regulatory T cells in the macaque." Transplantation **85**(9): 1351-6.
- Moreau, A., M. Hill, P. Thebault, J. Y. Deschamps, E. Chiffolleau, C. Chauveau, P. Moullier, I. Anegon, B. Alliot-Licht and M. C. Cuturi (2009). "Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates." Faseb J.
- Morgan, M. E., J. H. van Bilsen, A. M. Bakker, B. Heemskerk, M. W. Schilham, F. C. Hartgers, B. G. Elferink, L. van der Zanden, R. R. de Vries, T. W. Huizinga, T. H. Ottenhoff and R. E. Toes (2005). "Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans." Hum Immunol **66**(1): 13-20.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.

- Munn, D. H., M. D. Sharma, J. R. Lee, K. G. Jhaver, T. S. Johnson, D. B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S. J. Antonia, R. Burgess, C. L. Slingluff, Jr. and A. L. Mellor (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." Science **297**(5588): 1867-70.
- Munn, D. H., M. Zhou, J. T. Attwood, I. Bondarev, S. J. Conway, B. Marshall, C. Brown and A. L. Mellor (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." Science **281**(5380): 1191-3.
- Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." Nat Rev Immunol **2**(12): 933-44.
- Nadler, S. G., M. A. Tepper, B. Schacter and C. E. Mazzucco (1992). "Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the Hsp70 family of heat shock proteins." Science **258**(5081): 484-6.
- Nakamura, K., A. Kitani and W. Strober (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." J Exp Med **194**(5): 629-44.
- Nakano, H., M. Yanagita and M. D. Gunn (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **194**(8): 1171-8.
- Neijssen, J., C. Herberts, J. W. Drijfhout, E. Reits, L. Janssen and J. Neefjes (2005). "Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions." Nature **434**(7029): 83-8.
- Nemoto, K., M. Hayashi, F. Abe, T. Nakamura, M. Ishizuka and H. Umezawa (1987). "Immunosuppressive activities of 15-deoxyspergualin in animals." J Antibiot (Tokyo) **40**(4): 561-2.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nat Med **4**(3): 328-32.
- Niedbala, W., X. Q. Wei, B. Cai, A. J. Hueber, B. P. Leung, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2007). "IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells." Eur J Immunol **37**(11): 3021-9.
- Nieuwenhuis, E. E., M. F. Neurath, N. Corazza, H. Iijima, J. Trgovcich, S. Wirtz, J. Glickman, D. Bailey, M. Yoshida, P. R. Galle, M. Kronenberg, M. Birkenbach and R. S. Blumberg (2002). "Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16951-6.

- Nikolic, T., G. M. Dingjan, P. J. Leenen and R. W. Hendriks (2002). "A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics." Eur J Immunol **32**(3): 686-92.
- Nurieva, R., X. O. Yang, Y. Chung and C. Dong (2009). "Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts." J Immunol **182**(5): 2565-8.
- Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten and C. Dong (2007). "Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." Nature **448**(7152): 480-3.
- O'Connell, P. J., W. Li, Z. Wang, S. M. Specht, A. J. Logar and A. W. Thomson (2002). "Immature and mature CD8alpha+ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts." J Immunol **168**(1): 143-54.
- O'Neill, D. W., S. Adams and N. Bhardwaj (2004). "Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer." Blood **104**(8): 2235-46.
- 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**(6): 652-62.
- Oh, G. S., H. O. Pae, B. M. Choi, S. C. Chae, H. S. Lee, D. G. Ryu and H. T. Chung (2004). "3-Hydroxyanthranilic acid, one of metabolites of tryptophan via indoleamine 2,3-dioxygenase pathway, suppresses inducible nitric oxide synthase expression by enhancing heme oxygenase-1 expression." Biochem Biophys Res Commun **320**(4): 1156-62.
- Oida, T., L. Xu, H. L. Weiner, A. Kitani and W. Strober (2006). "TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling." J Immunol **177**(4): 2331-9.
- Olthoff, K. M., T. A. Judge, A. E. Gelman, X. da Shen, W. W. Hancock, L. A. Turka and A. Shaked (1998). "Adenovirus-mediated gene transfer into cold-preserved liver allografts: survival pattern and unresponsiveness following transduction with CTLA4Ig." Nat Med **4**(2): 194-200.
- Ono, K. and E. Lyndsey (1968). "Improved technic of heart transplantation in rats." J. Thorac. Cardiovasc. Surg **57**: 225-229.
- Osorio, F., S. LeibundGut-Landmann, M. Lochner, K. Lahl, T. Sparwasser, G. Eberl and C. Reis e Sousa (2008). "DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers." Eur J Immunol **38**(12): 3274-81.

- 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**(9): 5862-70.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-41.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." Science **299**(5609): 1033-6.
- Paul, W. E. and R. A. Seder (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." Cell **76**(2): 241-51.
- Paust, S., L. Lu, N. McCarty and H. Cantor (2004). "Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10398-403.
- Peche, H., B. Trinite, B. Martinet and M. C. Cuturi (2005). "Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors." Am J Transplant **5**(2): 255-67.
- Penhale, W. J., W. J. Irvine, J. R. Inglis and A. Farmer (1976). "Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells." Clin Exp Immunol **25**(1): 6-16.
- Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, J. L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T. K. McClanahan, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick and R. A. Kastelein (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." Immunity **16**(6): 779-90.
- Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara and E. M. Shevach (2002). "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness." J Exp Med **196**(2): 237-46.
- Pietra, B. A., A. Wiseman, A. Bolwerk, M. Rizeq and R. G. Gill (2000). "CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II." J Clin Invest **106**(8): 1003-10.
- Popov, I. A., E. V. Fedoseyeva, P. L. Orr, M. R. Garovoy and G. Benichou (1995). "Direct evidence for in vivo induction of CD8+ cytotoxic T cells directed to donor MHC class I peptides following mouse allotransplantation." Transplantation **60**(12): 1621-4.

- Powrie, F., J. Carlino, M. W. Leach, S. Mauze and R. L. Coffman (1996). "A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells." J Exp Med **183**(6): 2669-74.
- Pratt, J. R., S. A. Basheer and S. H. Sacks (2002). "Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection." Nat Med **8**(6): 582-7.
- Priatel, J. J., O. Utting and H. S. Teh (2001). "TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells." J Immunol **167**(11): 6188-94.
- Randolph, G. J., J. Ochando and S. Partida-Sanchez (2008). "Migration of dendritic cell subsets and their precursors." Annu Rev Immunol **26**: 293-316.
- Rao, D. A., R. E. Eid, L. Qin, T. Yi, N. C. Kirkiles-Smith, G. Tellides and J. S. Pober (2008). "Interleukin (IL)-1 promotes allogeneic T cell intimal infiltration and IL-17 production in a model of human artery rejection." J Exp Med **205**(13): 3145-58.
- Refaeli, Y., L. Van Parijs, S. I. Alexander and A. K. Abbas (2002). "Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes." J Exp Med **196**(7): 999-1005.
- Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." Nat Rev Immunol **6**(6): 476-83.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa and P. Matzinger (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." Nature **393**(6684): 474-8.
- Rifkin, I. R., E. A. Leadbetter, L. Busconi, G. Viglianti and A. Marshak-Rothstein (2005). "Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease." Immunol Rev **204**: 27-42.
- Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula and M. K. Levings (2001). "Type 1 T regulatory cells." Immunol Rev **182**: 68-79.
- Rothman, J. E. (1989). "Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells." Cell **59**(4): 591-601.
- Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller and A. Y. Rudensky (2008). "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces." Immunity **28**(4): 546-58.
- Ruzek, M. C., J. S. Waire, D. Hopkins, G. Lacorcia, J. Sullivan, B. L. Roberts, S. M. Richards, S. R. Nahill, J. M. Williams, A. Scaria, J. Dzuris, S. Shankara and R. D. Garman (2008). "Characterization of in vitro antimurine thymocyte globulin-induced regulatory T cells that inhibit graft-versus-host disease in vivo." Blood **111**(3): 1726-34.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

- (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., T. Takahashi and Y. Nishizuka (1982). "Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis." J Exp Med **156**(6): 1577-86.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med **182**(2): 389-400.
- Samy, E. T., L. A. Parker, C. P. Sharp and K. S. Tung (2005). "Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4+CD25+ regulatory T cells in the regional lymph node." J Exp Med **202**(6): 771-81.
- Sawitzki, B., C. I. Kingsley, V. Oliveira, M. Karim, M. Herber and K. J. Wood (2005). "IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo." J Exp Med **201**(12): 1925-35.
- Sayegh, M. H. and R. B. Colvin (2003). "Case record of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 8-2003. A 35-year-old man with early dysfunction of a second renal transplant." N Engl J Med **348**(11): 1033-44.
- Sayegh, M. H. and A. M. Krensky (1996). "Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides." Kidney Int Suppl **53**: S13-20.
- Scandling, J. D., S. Busque, S. Dejbakhsh-Jones, C. Benike, M. T. Millan, J. A. Shizuru, R. T. Hoppe, R. Lowsky, E. G. Engleman and S. Strober (2008). "Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation." N Engl J Med **358**(4): 362-8.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." Annu Rev Immunol **21**: 305-34.
- Seino, K. I., K. Fukao, K. Muramoto, K. Yanagisawa, Y. Takada, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, K. Takeda, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Bashuda, H. Yagita and K. Okumura (2001). "Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2577-81.
- Selvaggi, G., C. Ricordi, E. R. Podack and L. Inverardi (1996). "The role of the perforin and Fas pathways of cytotoxicity in skin graft rejection." Transplantation **62**(12): 1912-5.
- Shevach, E. M. (2006). "From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells." Immunity **25**(2): 195-201.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida and S. Sakaguchi (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." Nat Immunol **3**(2): 135-42.

- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Shtrichman, R. and C. E. Samuel (2001). "The role of gamma interferon in antimicrobial immunity." Curr Opin Microbiol **4**(3): 251-9.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Sobanov, Y., A. Bernreiter, S. Derdak, D. Mechtcheriakova, B. Schweighofer, M. Duchler, F. Kalthoff and E. Hofer (2001). "A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex." Eur J Immunol **31**(12): 3493-503.
- Soulillou, J. P., F. Blandin, E. Gunther and V. Lemoine (1984). "Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats." Transplantation **38**(1): 63-7.
- Srivastava, P. K., H. Udono, N. E. Blachere and Z. Li (1994). "Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming." Immunogenetics **39**(2): 93-8.
- Steele, D. J., T. M. Laufer, S. T. Smiley, Y. Ando, M. J. Grusby, L. H. Glimcher and H. Auchincloss, Jr. (1996). "Two levels of help for B cell alloantibody production." J Exp Med **183**(2): 699-703.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**: 271-96.
- Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 351-8.
- Steller, H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." Science **267**(5203): 1445-9.
- Stumhofer, J. S., A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, A. V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C. J. Saris, J. J. O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst and C. A. Hunter (2006). "Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system." Nat Immunol **7**(9): 937-45.
- Suchin, E. J., P. B. Langmuir, E. Palmer, M. H. Sayegh, A. D. Wells and L. A. Turka (2001). "Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question." J Immunol **166**(2): 973-81.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." J Immunol **160**(3): 1212-8.

- Suri-Payer, E. and H. Cantor (2001). "Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells." J Autoimmun **16**(2): 115-23.
- Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English and G. Huston (1990). "IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors." J Immunol **145**(11): 3796-806.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng and L. H. Glimcher (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." Annu Rev Immunol **21**: 713-58.
- Szanya, V., J. Ermann, C. Taylor, C. Holness and C. G. Fathman (2002). "The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7." J Immunol **169**(5): 2461-5.
- Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille and M. L. Dustin (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo." J Exp Med **203**(3): 505-11.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu and S. Sakaguchi (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." Int Immunol **10**(12): 1969-80.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak and S. Sakaguchi (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-10.
- Takeuchi, I., T. Chikaraishi, T. Seki, K. Kanagawa and T. Koyanagi (1998). "Immunological analysis of rat renal transplant recipients exhibiting long-term survival following treatment with 15-deoxyspergualin in the early postoperative phase." Int J Urol **5**(5): 476-81.
- Tau, G. Z., T. von der Weid, B. Lu, S. Cowan, M. Kvatyuk, A. Pernis, G. Cattoretti, N. S. Braunstein, R. L. Coffman and P. B. Rothman (2000). "Interferon gamma signaling alters the function of T helper type 1 cells." J Exp Med **192**(7): 977-86.
- Tepper, M. A., S. G. Nadler, J. M. Esselstyn and K. G. Sterbenz (1995). "Deoxyspergualin inhibits kappa light chain expression in 70Z/3 pre-B cells by blocking lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation." J Immunol **155**(5): 2427-36.
- Thebault, P., T. Condamine, M. Heslan, M. Hill, I. Bernard, A. Saoudi, R. Josien, I. Anegon, M. C. Cuturi and E. Chiffoleau (2007). "Role of IFNgamma in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction ofIDO in endothelial cells." Am J Transplant **7**(11): 2472-82.

- They, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz and S. Amigorena (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." Nat Immunol **3**(12): 1156-62.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo and E. M. Shevach (2004). "Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function." J Immunol **172**(11): 6519-23.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-96.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." J Immunol **164**(1): 183-90.
- Turner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med **190**(11): 1669-78.
- Timmerman, J. M., D. K. Czerwinski, T. A. Davis, F. J. Hsu, C. Benike, Z. M. Hao, B. Taidi, R. Rajapaksa, C. B. Caspar, C. Y. Okada, A. van Beckhoven, T. M. Liles, E. G. Engleman and R. Levy (2002). "Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients." Blood **99**(5): 1517-26.
- Tomita, Y., A. Khan and M. Sykes (1994). "Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen." J Immunol **153**(3): 1087-98.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.
- Trenado, A., M. Sudres, Q. Tang, S. Maury, F. Charlotte, S. Gregoire, M. Bonyhadi, D. Klatzmann, B. L. Salomon and J. L. Cohen (2006). "Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells." J Immunol **176**(2): 1266-73.
- Turka, L. A., P. S. Linsley, H. Lin, W. Brady, J. M. Leiden, R. Q. Wei, M. L. Gibson, X. G. Zheng, S. Myrdal, D. Gordon and et al. (1992). "T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 11102-5.
- Turnquist, H. R., G. Raimondi, A. F. Zahorchak, R. T. Fischer, Z. Wang and A. W. Thomson (2007). "Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic

- CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance." J Immunol **178**(11): 7018-31.
- Uhlig, H. H., J. Coombes, C. Mottet, A. Izcue, C. Thompson, A. Fanger, A. Tannapfel, J. D. Fontenot, F. Ramsdell and F. Powrie (2006). "Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis." J Immunol **177**(9): 5852-60.
- Vadivel, N., S. G. Tullius and A. Chandraker (2007). "Chronic allograft nephropathy." Semin Nephrol **27**(4): 414-29.
- Valladeau, J., V. Duvert-Frances, J. J. Pin, C. Dezutter-Dambuyant, C. Vincent, C. Massacrier, J. Vincent, K. Yoneda, J. Banchereau, C. Caux, J. Davoust and S. Saeland (1999). "The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface." Eur J Immunol **29**(9): 2695-704.
- Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque and S. Saeland (2000). "Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules." Immunity **12**(1): 71-81.
- Valujskikh, A., D. Matesic, A. Gilliam, D. Anthony, T. M. Haqqi and P. S. Heeger (1998). "T cells reactive to a single immunodominant self-restricted allopeptide induce skin graft rejection in mice." J Clin Invest **101**(6): 1398-407.
- van de Berg, P. J., E. M. van Leeuwen, I. J. ten Berge and R. van Lier (2008). "Cytotoxic human CD4(+) T cells." Curr Opin Immunol **20**(3): 339-43.
- Van Kaer, L. (2004). "Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells." Immunol Res **30**(2): 139-53.
- Vanaudenaerde, B. M., L. J. Dupont, W. A. Wuyts, E. K. Verbeken, I. Meyts, D. M. Bullens, E. Dilissen, L. Luyts, D. E. Van Raemdonck and G. M. Verleden (2006). "The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation." Eur Respir J **27**(4): 779-87.
- Vanbuskirk, A., B. L. Crump, E. Margoliash and S. K. Pierce (1989). "A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family." J Exp Med **170**(6): 1799-809.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-89.
- Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm and B. Stockinger (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the

- differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." Nat Immunol **9**(12): 1341-6.
- Verhasselt, V., O. Vosters, C. Beuneu, C. Nicaise, P. Stordeur and M. Goldman (2004). "Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells." Eur J Immunol **34**(3): 762-72.
- Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol **8**(7): 523-32.
- Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez and H. Groux (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." Immunity **18**(5): 605-17.
- Walker, L. S. and A. K. Abbas (2002). "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery." Nat Rev Immunol **2**(1): 11-9.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker and J. A. Bluestone (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." J Exp Med **183**(6): 2541-50.
- Wang, H., K. A. Hosiawa, B. Garcia, J. B. Shum, P. Dutartre, D. J. Kelvin and R. Zhong (2003). "Attenuation of acute xenograft rejection by short-term treatment with LF15-0195 and monoclonal antibody against CD45RB in a rat-to-mouse cardiac transplantation model." Transplantation **75**(9): 1475-81.
- Wang, Z., J. Hong, W. Sun, G. Xu, N. Li, X. Chen, A. Liu, L. Xu, B. Sun and J. Z. Zhang (2006). "Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs." J Clin Invest **116**(9): 2434-41.
- Watanabe, T., M. Yoshida, Y. Shirai, M. Yamori, H. Yagita, T. Itoh, T. Chiba, T. Kita and Y. Wakatsuki (2002). "Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4+ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver." J Immunol **168**(5): 2188-99.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." Immunol Rev **182**: 207-14.
- Weiss, S. and B. Bogen (1991). "MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen." Cell **64**(4): 767-76.
- Wekerle, T., M. H. Sayegh, J. Hill, Y. Zhao, A. Chandraker, K. G. Swenson, G. Zhao and M. Sykes (1998). "Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance." J Exp Med **187**(12): 2037-44.
- Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby and M. E. Brunkow (2001). "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy

- and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurvy." Nat Genet **27**(1): 18-20.
- Willenborg, D. O., S. A. Fordham, M. A. Staykova, I. A. Ramshaw and W. B. Cowden (1999). "IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide." J Immunol **163**(10): 5278-86.
- Wing, K., Z. Fehervari and S. Sakaguchi (2006). "Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells." Int Immunol **18**(7): 991-1000.
- Wong, B. R., R. Josien and Y. Choi (1999). "TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function." J Leukoc Biol **65**(6): 715-24.
- Xia, G., J. He and J. R. Leventhal (2008). "Ex vivo-expanded natural CD4+CD25+ regulatory T cells synergize with host T-cell depletion to promote long-term survival of allografts." Am J Transplant **8**(2): 298-306.
- Xu, L., A. Kitani, I. Fuss and W. Strober (2007). "Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta." J Immunol **178**(11): 6725-9.
- Xystrakis, E., A. S. Dejean, I. Bernard, P. Druet, R. Liblau, D. Gonzalez-Dunia and A. Saoudi (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." Blood **104**(10): 3294-301.
- Yamada, A., T. M. Laufer, A. J. Gerth, C. M. Chase, R. B. Colvin, P. S. Russell, M. H. Sayegh and H. Auchincloss, Jr. (2003). "Further analysis of the T-cell subsets and pathways of murine cardiac allograft rejection." Am J Transplant **3**(1): 23-7.
- Yamagiwa, S., J. D. Gray, S. Hashimoto and D. A. Horwitz (2001). "A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood." J Immunol **166**(12): 7282-9.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba and R. M. Steinman (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." J Exp Med **198**(2): 235-47.
- Yang, H., G. Chen, N. Kanai, J. Shum, B. Garcia, X. Huang, W. Min, Y. Luo, P. Dutartre and R. Zhong (2003a). "Monotherapy with LF 15-0195, an analogue of 15-deoxyspergualin, significantly prolongs renal allograft survival in monkeys." Transplantation **75**(8): 1166-71.
- Yang, J., S. M. Bernier, T. E. Ichim, M. Li, X. Xia, D. Zhou, X. Huang, G. H. Strejan, D. J. White, R. Zhong and W. P. Min (2003b). "LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity." J Leukoc Biol **74**(3): 438-47.

- Yen, D., J. Cheung, H. Scheerens, F. Poulet, T. McClanahan, B. McKenzie, M. A. Kleinschek, A. Owyang, J. Mattson, W. Blumenschein, E. Murphy, M. Sathe, D. J. Cua, R. A. Kastelein and D. Rennick (2006). "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6." J Clin Invest **116**(5): 1310-6.
- Young, K. J., B. DuTemple, M. J. Phillips and L. Zhang (2003). "Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells." J Immunol **171**(1): 134-41.
- Zeiser, R., V. H. Nguyen, A. Beilhack, M. Buess, S. Schulz, J. Baker, C. H. Contag and R. S. Negrin (2006). "Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production." Blood **108**(1): 390-9.
- Zhang, Z. X., L. Yang, K. J. Young, B. DuTemple and L. Zhang (2000). "Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression." Nat Med **6**(7): 782-9.
- Zheng, S. G., J. Wang and D. A. Horwitz (2008). "Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6." J Immunol **180**(11): 7112-6.
- Zhou, D., C. O'Brien, J. Shum, B. Garcia, W. Min, A. M. Jevnikar, P. Dutartre and R. Zhong (2003). "LF 15-0195, a novel immunosuppressive agent prevents rejection and induces operational tolerance in a mouse cardiac allograft model." Transplantation **76**(4): 644-50.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." Blood **112**(5): 1557-69.
- Ziegler, S. F. (2007). "FOXP3: not just for regulatory T cells anymore." Eur J Immunol **37**(1): 21-3.
- Zuklys, S., G. Balciunaite, A. Agarwal, E. Fasler-Kan, E. Palmer and G. A. Hollander (2000). "Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)." J Immunol **165**(4): 1976-83.

Identification et étude de nouveaux médiateurs de la tolérance à l'allogreffe

La connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer le succès de la transplantation d'organes. L'objet de cette thèse a consisté en l'identification et l'étude de nouveaux médiateurs de la tolérance à l'allogreffe chez le rat. Dans un modèle de tolérance induite par un traitement avec le LF15-0195, un analogue de la déoxyspergualine, l'équipe a appliqué la technique de puces à ADN pour identifier les mécanismes associés à la tolérance et a mis en évidence l'expression d'IDO et d'IFN γ . Nous avons montré que les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ accumulées dans le greffon expriment l'IFN γ induisent l'expression d'IDO, une molécule tolérogène, dans les cellules endothéliales de la greffe et que ces deux molécules sont nécessaires à la tolérance. De plus, nous avons identifié CLEC-1, un récepteur lectine de type-C, surexprimé dans les cellules endothéliales et myéloïdes des greffons tolérés. D'autre part, nous avons montré que l'expression de CLEC-1 est diminuée par des stimuli inflammatoires et augmentée par des molécules tolérogènes. En outre, nous avons montré que CLEC-1 diminue la différenciation Th17 en modulant la suppression médiée par les cellules T régulatrices. Le rôle de l'IFN γ a aussi été démontré dans un autre modèle de tolérance induite par l'administration de cellules dendritiques syngéniques immatures en combinaison avec une dose sous-optimale de LF15-0195. Nous avons montré que l'inhibition de l'IFN γ abroge l'induction de tolérance et que les cellules T double négatives étaient responsables de la production d'IFN γ dans la rate des animaux tolérants. D'une façon intéressante, cette production est dépendante de la molécule EBI3 produite par les cellules dendritiques immatures. L'ensemble de ces résultats ont contribué à l'identification de nouveaux médiateurs de la tolérance qui pourront être utilisés comme outils thérapeutiques pour permettre une tolérance à l'allogreffe.

Mots-clé : Tolérance, cellules T régulatrices, CLEC-1, IFN γ , cellules dendritiques, EBI3, allotransplantation

Identification and study of news mediators of allograft tolerance

The understanding of immunological mechanisms leading to allograft tolerance represents a major issue to improve the success of organ transplantation. During my Ph.D, we have investigated news mediators of allograft tolerance in rat. In a model of tolerance induced by treatment with an analog of deoxyspergualin (LF15-0195), the team used DNA microarrays to identify mechanisms linked to tolerance and has observed a high expression of IDO and IFN γ . We have shown that CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells accumulated in allograft expressed IFN γ and induced the expression of IDO in graft endothelial cells. So, these two molecules are necessary to tolerance. Moreover, we have identified CLEC-1, a C-type lectin receptor, as overexpressed in graft endothelial and myeloid cells of tolerated allograft. Then, we have shown that CLEC-1 expression is decreased by inflammatory stimuli and increased by tolerogenic molecules. At last, we have shown that CLEC-1 decreases Th17 differentiation, modulating suppression mediated by regulatory T cells. The role of IFN γ has also been demonstrated in another model of tolerance induced by the injection of autologous immature dendritic cells in combination with a suboptimal treatment with LF15-0195. We have demonstrated that inhibition of IFN γ abrogates induction of tolerance. Moreover, we have shown that double negative T cells are responsible of IFN γ production in the spleen of tolerant recipients. Interestingly, this production is dependent of EBI3 secreting by immature dendritic cells. All of these results contributed to identify new mediators of tolerance which will be able to be used as therapeutic tools to induce allograft tolerance.

Keywords: Tolerance, regulatory T cells, CLEC-1, IFN γ , dendritic cells, EBI3, allograft

THEBAULT Paméla
INSERM U643 – ITERT
CHU hotel-Dieu, 30, Bd Jean Monnet
44093 Nantes Cedex 1