UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES ET TECHNOLOGIES

EA 4245 Cellules dendritiques, Immunomodulation et Greffes

THÈSE présentée par :

Roxane LEMOINE

soutenue le : **15 Décembre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François-Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie / Immunologie

PROPRIETES REGULATRICES DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES TRAITEES PAR L'ACIDE MYCOPHENOLIQUE

THÈSE dirigée par :

Mr NIVET Hubert	Professeur / Praticien Hospitalier, HDR, Université François-Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Mr COHEN José	Directeur de Recherche, HDR, Université Pierre et Marie Curie de Paris VI
Mr DURRBACH Antoine	Professeur / Praticien Hospitalier, HDR, Université Paris-Sud XI

JURY :

Mr BARON Christophe	Maître de Conférences, Université François-Rabelais de Tours
Mr COHEN José	Directeur de Recherche, Université Pierre et Marie Curie Paris VI
Mme CUTURI Maria-Cristina	Directeur de Recherche, Université de Nantes
Mr DURRBACH Antoine	Professeur, Université Paris-Sud XI
Mr LEBRANCHU Yvon	Professeur, Université François-Rabelais de Tours
Mr NIVET Hubert	Professeur, Université François-Rabelais de Tours

A mes parents, à Mathieu

Remerciements

Je tiens à saluer ici les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse.

Tout d'abord, Mr Yvon Lebranchu, je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Merci de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès. Je vous remercie également d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse.

Mr Hubert Nivet pour avoir été mon directeur de thèse et pour vos conseils toujours judicieux.

Florence, je tiens à vous remercier sincèrement pour la confiance que vous m'avez accordée pendant ces années et pour votre soutien lors de l'obtention de mon poste d'ATER. J'ai ainsi pu terminer ce travail plus sereinement.

Christophe, « mon encadrant non officiel » pour avoir toujours été présent durant ces trois années de thèse, pour nos discussions parfois interminables, pour m'avoir donnée l'envie de m'investir dans le métier de chercheur malgré ton pessimisme légendaire !!!

Je remercie vivement le Pr Antoine Durrbach et le Dr José Cohen pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteur.

Un merci au Dr Maria-Cristina Cuturi pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Merci aux médecins et infirmières de l'EFS Centre Atlantique de Tours ainsi qu'aux donneurs de sang, à Mr Blondelle et Mme Voileaux pour l'irradiation des cellules.

Une pensée émue à tous ceux qui ont partagé une partie de cette thèse à mes côtés :

- Laurence, un grand merci pour m'avoir appris à différencier les monocytes en cellules dendritiques, tes conseils toujours avisés et ta disponibilité sans faille.

- Delphine, ce fût un plaisir de travailler avec toi pour ton article. J'espère que j'aurai l'occasion de te rendre visite à Québec, au pays du grand froid. Je suis vraiment contente que tu puisses venir assister à ma soutenance de thèse. Merci encore.

- Angélique, Audrey et Caro, merci à vous pour votre bonne humeur perpétuelle, vos encouragements et nos nombreux fous rires.

- Audrey, l'Aveyronnaise du labo. J'arrive enfin à comprendre ton accent ! Merci pour la mise au point du CFSE et pour m'avoir fait découvrir l'aligot.

- Romain, notre délégué en chef. Merci pour les petites soirées improvisées et les viennoiseries le matin, c'était très sympa. Bon courage pour la fin de ta thèse.
- Sylvie, j'aurai aimé que tu puisses voir l'aboutissement de ce travail.
- Cyrille, je compte sur toi pour mes futures visites dans le service de pédiatrie !!!
- Danièle et Bertille, merci pour la gestion des stocks, le nettoyage des hottes et étuves et les tâches quotidiennes que vous avez assurées à ma place ces dernières semaines.
- Mariane, merci pour ta bonne humeur et les petits plats typiquement brésiliens. J'espère un jour avoir l'occasion de te voir danser la samba dans ton beau pays !
- Flo et Olivier, j'ai hâte de vous revoir pour que vous me racontiez votre périple au Pérou. Merci pour vos nombreux conseils pour la préparation de mon futur mariage.

Aux « nouveaux » que je ne connais pas encore très bien, j'espère que vous vous épanouirez dans cette équipe et que vous saurez maintenir cette ambiance conviviale qui est importante pour travailler dans de bonnes conditions.

Merci également à Michelle pour les remboursements « express » des congrès, à Matthias et Jean-Michel de la néphro.

A tous les membres du service d'enseignement de microbiologie, Agnès, Brigitte, Agnès, Fabien, Isabelle, Elodie et tous les moniteurs.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour tous mes amis qui m'ont permis de décompresser le week-end et de me changer les idées : Aurel, Milou et H, Gaëlle et Manu, Mika et Stef, Tomtom et Lulu, Gaël, Coluche, Tétine et Jennifer.

Un grand merci à toute ma famille pour leurs encouragements.

A ma petite sœur adorée, Alexia. Tu as toujours été là pour moi surtout ces dernières semaines qui ont été très éprouvantes pour moi alors merci pour tout.

A mes parents, je vous dédie cette thèse car vous m'avez toujours encouragée et soutenue dans mes choix. Cette thèse en est l'aboutissement. Votre présence et votre confiance sans faille sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

A mon petit ange…

A Mathieu, pour tout l'amour dont tu m'entoures au quotidien. Tu as toujours été présent pour moi malgré mon emploi du temps parfois un peu trop chargé à ton goût. Je n'ai pas de mots assez forts pour te dire ce que je ressens…

Résumé

En transplantation d'organes, la réponse immunitaire de l'hôte contre son donneur reste une cause très importante de perte de greffons. Ainsi, un meilleur contrôle de la réponse allogénique par induction d'une tolérance spécifique reste l'une des priorités en transplantation humaine.

Dans ce travail, nous avons exploré plus précisément l'immunomodulation des cellules dendritiques (DC) pour induire une tolérance spécifique *in vitro* chez l'homme.

Les immunosuppresseurs, initialement développés pour leur action inhibitrice sur les lymphocytes T, affectent aussi les fonctions des cellules dendritiques. Nous avons ainsi étudié les propriétés des cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique (MPA), métabolite actif du mycophénolate mofétil (MMF). Cet immunosuppresseur diminue la capacité des DC à induire des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques allogéniques en diminuant la synthèse d'interféron gamma dans les DC.

De plus, les DC traitées avec du MPA (DC-MPA) sont également capables d'induire des lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs. Ces cellules T régulatrices sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD25, GITR, CTLA-4, CD95 et du facteur de transcription Foxp3 ainsi que par une sécrétion importante d'IL-10 et de TGF-β. Leur activité suppressive est dépendante d'un contact cellulaire et est antigène-spécifique.

D'autre part, nous avons mis en évidence que ces lymphocytes T régulateurs induits (iTreg), outre leur action sur des lymphocytes T $CD4^+$, pouvaient également reprogrammer des DC matures en DC dites semi-matures aux propriétés tolérogènes, suggérant ainsi la grande plasticité des DC.

Enfin, nos résultats démontrent que les Treg induits par des DC-MPA sont capables de diminuer l'expression des protéines associées à la fonction cytotoxique telles que la perforine et les granzymes A et B, de réduire la sécrétion d'IFN-γ par les cellules T $CD8^+$ et d'inhiber leur fonction cytotoxique en réponse à une stimulation allogénique.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* suggèrent que les DC-MPA humaines pourraient être potentiellement utilisés en thérapie cellulaire afin de promouvoir une tolérance d'allogreffe.

Mots-clés : greffe d'organe, cellules dendritiques humaines, acide mycophénolique, tolérance d'allogreffe

Résumé en anglais

In organ transplantation, host immune response against donor still remains a major cause of graft loss. A better control of allogeneic response through the induction of specific tolerance is a major goal in human transplantation.

In this work, we explored more precisely the immunomodulation of dendritic cells (DC) to induce specific tolerance *in vitro* in humans.

Immunosuppressive drugs, initially developed for their ability to inhibit T cells, are also known now to affect dendritic cell functions. We first studied human dendritic cell properties by mycophenolic acid (MPA), active metabolite of mycophenolate mofetil (MMF). This immunosuppressive drug inhibits DC ability to induce allogeneic cytotoxic $CD8^+$ T cells through inhibition of interferon gamma synthesis in dendritic cells.

Moreover, mycophenolic acid-treated dendritic cells (MPA-DC) are also able to induce regulatory $CD4^+$ T lymphocytes. These regulatory T cells are characterized by their expression of CD25, GITR, CTLA-4, CD95 and transcription factor Foxp3 and also by their important secretion of IL-10 and TGF-β. Their suppressive activity is dependent of cellular contact and is antigen-specific.

On the other hand, we demonstrated that these induced-regulatory T cells (iTreg), apart from their action on $CD4^+$ responder T cells, could also reprogram mature DC into semi-mature DC with tolerogenic properties, suggesting the high plasticity of DC.

Interestingly, our results demonstrate that Treg induced by MPA-DC are able to decrease the expression of proteins associated with cytotoxic function such as perforin and granzymes A and B, to reduce IFN-γ secretion by $CD8^+$ T cells and to inhibit their cytotoxic function in response to allogeneic stimulation.

These results taken together suggest that human MPA-DC could be use in cellular therapy in order to promote allograft tolerance.

Mots clés: organ transplantation, human dendritic cells, mycophenolic acid, allograft tolerance

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 5
Résumé en anglais 6
Table des matières 7
Liste des tableaux 10
Liste des figures 11
Liste des abréviations 13
Introduction 15
Revue bibliographique 18
I. LES CELLULES DENDRITIQUES 19
1. Généralités 19
2. Classification des cellules dendritiques humaines 20
2.1 Les cellules dendritiques myéloïdes 20
2.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes 21
2.3 Les cellules de Langerhans 21
2.4 Les cellules dendritiques dermiques et interstitielles 22
2.5 Les cellules dendritiques thymiques 22
2.6 Les cellules dendritiques folliculaires 23
2.7 Les cellules dendritiques associées aux muqueuses 23
3. Ontogénie des cellules dendritiques 24
4. Modèles de différenciation des cellules dendritiques *in vitro* 25
4.1 A partir de cellules souches $CD34^+$ 25
4.2 A partir de monocytes 25
5. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée 26
5.1 Récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMP 27
5.2 Activation par des molécules endogènes (DAMP) 30
5.3 Activation par des cytokines inflammatoires 31
5.4 Activation par l'engagement du CD40 31
5.5 Voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques 32
6. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative 36
6.1 Capture des antigènes 36

6.2 Apprêtement des antigènes 37
6.3 Migration des cellules dendritiques 41
II. LES LYMPHOCYTES T 42
1. Les différentes sous-populations de lymphocytes T 42
2. L'activation du lymphocyte T 43
2.1 Le récepteur des cellules T : TCR 44
2.2 Les molécules de co-stimulation 46
2.3 La synapse immunologique 51
3. Orientation de la réponse immune 53
3.1 La réponse Th1 54
3.2 La réponse Th2 54
3.3 La réponse Th17 54
3.4 La réponse T régulatrice 55
3.5 Plasticité des sous-populations de cellules T 55
III. IMMUNOLOGIE DE GREFFE 58
1. Les différentes voies d'alloreconnaissance 59
1.1 La voie de présentation directe 59
1.2 La voie de présentation indirecte 61
1.3 La voie de présentation semi-directe 62
2. Les différents types de rejet 62
2.1 Le rejet hyperaigu 62
2.2 Le rejet aigu 63
2.3 Le rejet chronique 64
3. Les immunosuppresseurs 65
3.1 L'acide mycophénolique 66
3.2 La rapamycine 68
4. La tolérance immune 71
4.1 Les mécanismes généraux 71
4.2 Les lymphocytes T régulateurs 74
4.3 Les cellules dendritiques tolérogènes 90
IV. OBJECTIFS DE L'ETUDE 95
Travaux personnels 96

1. L'acide mycophénolique inhibe la capacité des cellules dendritiques humaines à induire des lymphocytes T CD8$^+$ allogéniques cytotoxiques via l'inhibition de la synthèse d'IFN-γ dans les DC 97
2. Les cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique induisent des cellules T régulatrices 127
3. Les lymphocytes T CD4$^+$ régulateurs induits reprogramment des DC matures en DC semi-matures avec des propriétés tolérogènes 136
4. Les lymphocytes T CD4$^+$ régulateurs induits inhibent la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8$^+$ 160
Participation à d'autres travaux 177
1. L'acide mycophénolique affecte différemment la maturation des cellules dendritiques induite par le Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) et le Lipopolysaccharide (LPS) 178
2. Les cellules dendritiques traitées par un surnageant de probiotique BbC50sn induisent des lymphocytes T CD4$^+$ régulateurs 211
Conclusion 215
Annexe 218
Bibliographie 222
Résumé 257
Résumé en anglais 257

Liste des tableaux

Tableau I: Résumé des caractéristiques des cellules dendritiques tolérogènes..... 93

Liste des figures

Figure 1: Les différents types de PRR exprimés par les cellules dendritiques..... 27
Figure 2: Les différentes voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques..... 34
Figure 3: Apprêtement des antigènes endogènes par les molécules du CMH de classe I (d'après Vyas *et al.*, Nature Review Immunol 2008)..... 39
Figure 4: Apprêtement des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe II (d'après Heath and Carbone Nature Review Immunol 2001) 40
Figure 5 : Voies de signalisation impliquées dans l'activation du lymphocyte T (d'après Schwartzberg *et al.*, Nature Review Immunol 2005)..... 45
Figure 6: Expression des molécules de co-stimulation de la famille B7-CD28 et TNF-TNFR par les cellules dendritiques et les lymphocytes T 46
Figure 7: Molécules impliquées dans la synapse immunologique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T 52
Figure 8: Orientation de la réponse immune T CD4$^+$ 53
Figure 9: Les différentes voies d'alloreconnaissance 59
Figure 10: Modèle de rejet aigu 64
Figure 11: Modèle de rejet chronique 65
Figure 12: mTOR et la rapamycine régulent la fonction des APC (d'après Thomson *et al.*, Nature Review Immunol 2009) 69
Figure 13: Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs (d'après Vignali *et al.*, Nature Review Immunol 2008) 84
Figure 14: Génération de DC tolérogènes *in vitro* (d'après Morelli *et al.*, Nature Review Immunol 2007)..... 92
Figure 15: Les iTreg inhibent la prolifération des LT CD8$^+$ dans une MLR allogénique via un contact cellulaire. 168
Figure 16: Analyse phénotypique des LT CD8$^+$ après co-culture avec des iTreg ou des Teff...... 169
Figure 17: Les iTreg augmentent la synthèse de l'IL-4, IL-5 et IL-10 et diminuent la production des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IFN-γ. 171
Figure 18: Les iTreg inhibent la fonction cytotoxique des cellules T CD8$^+$..... 172
Figure 19: Les iTreg inhibent fortement l'expression des molécules associées aux granules cytotoxiques des cellules T CD8$^+$..... 173

Liste des annexes

Annexe 1: Bibliographie personnelle 219

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Ag : Antigène
APC : Antigen Presenting Cells
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BbC50sn: surnageant de Bifidobacterium breve C50
BCR : B Cell Receptor
BDCA: Blood Dendritic Cell Antigen
CD : Classe de Différenciation
CFSE : CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester
CLIP: Class II associated Invariant chain Peptide
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CREB: cAMP element response binding protein
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4
DAMP : Damaged Associated Molecular Patterns
DC : Dendritic cells utilisé pour Cellule Dendritique
DC-SIGN: Dendritic Cell Specific Intracellular adhesion molecule Grabbing non-Integrin
dsRNA : ARN double brin
ELISA : Enzyme Linked Immonosorbant Assay
ERK: Extracellular signal-Related Kinase
Flt3 : FMS-like tyrosine kinase 3
Foxp3 : Forkhead box p3
GITR : Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GSK3: glycogen synthase kinase-3
GVHD: graft versus host disease
HLA: human leukocyte antigen
HSP : Heat Shock protein
ICAM : Inter Cellular Adhesion Molecule
ICOS : Inducible T cell CO-Stimulator
IFN : interferon
Ig : Immunoglobuline
IKK: IKB kinase
IL : InterLeukine
ILT3: immunoglobulin-like transcript 3

IMF: Intensité Moyenne de Fluorescence
IMPDH: inosine monophosphate dehydrogenase
IRAK : Interleukin 1 Receptor Associated Kinase
ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LPS : LipoPolySaccharide
MAPK : Mitogen –Activated Protein Kinases
MLR: mixed leukocyte reaction
MMF: Mycophenolate Mofetil
MPA: Acide Mycophénolique
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
Myd88: Myeloid differentiation primary response gene (88)
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-κB : Nuclear Factor κB
NK : natural killer
NLR : NOD Like Receptor
NOD : Nucleotide Oligomerization Domain
OLS : Organe Lymphoïde secondaire
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS : phosphate buffered saline
pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde
PDL-1 : Programmed Death 1 Ligand
PGE2 : ProstaGlandine E2
PI3K : PhosphatidylInositol 3-Kinase
PMA : Phorbol Myristic Acetate
PRR : Pathogen Recognition Receptor
RE : Réticulum Endoplasmique
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF : sérum de veau fœtal
TAP : Transporter Associated with antigen Processing
TCR : T cell receptor
TGF-β : Transforming Growth Factor β
Th : T helper
TLR : Toll Like Receptor
TNF-α : Tumor Necrosis Factor α

Introduction

La transplantation d'organes est la seule issue thérapeutique pour beaucoup de pathologies qui entraînent une perte de fonction irréversible d'organes vitaux. Les progrès majeurs réalisés au cours des 20 dernières années ont abouti à une augmentation significative du nombre de patients pouvant avoir accès à une transplantation. Ainsi, en 2008, 4620 greffes ont été réalisées en France dont 2937 transplantations rénales.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux progrès ont été réalisés grâce notamment à une technique de greffe de mieux en mieux maîtrisée et des résultats en termes de durée et de qualité de vie en constante progression. En effet, le rejet aigu d'allogreffe est maintenant contrôlé de manière très efficace pour la majorité des patients comme en témoigne les taux de survies des greffons extrêmement bons dans les trois premières années qui suivent la transplantation. Ce progrès a été principalement obtenu grâce au développement de très nombreux médicaments immunosuppresseurs chimiques et biologiques.

Cependant, ces traitements appliqués de manière chronique et en association dépriment l'ensemble du système immunitaire du receveur. Cette action est très efficace mais dénuée de spécificité pour les antigènes du greffon et est à l'origine d'effets secondaires graves à long terme comme l'augmentation d'infections opportunistes et l'apparition de cancers (viro-induits notamment). D'autre part, la diminution nette de l'incidence du rejet aigu n'a pas pour autant permis d'enrayer la survenue du rejet chronique avec notamment la perte d'un tiers des greffons durant les 10 premières années post-transplantation. Le mécanisme est assez simple mais difficile à combattre puisque les traitements actuels n'arrivent pas à le maîtriser efficacement : l'inflammation qui règne au niveau du greffon provoque une fibrose des vaisseaux dont les parois s'épaississent lentement. L'irrigation devient alors insuffisante et les fonctions de l'organe se détériorent.

Il apparaît donc important de reconsidérer les stratégies actuelles d'immuno-intervention afin d'induire une tolérance immunitaire spécifique vis-à-vis des alloantigènes du greffon. Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes conduisant au développement de la tolérance immunitaire ainsi que ceux impliqués dans le développement des lésions du rejet chronique permettra de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques mieux ciblées.

Parmi les cellules du système immunitaire impliquées dans le rejet, les cellules dendritiques jouent un rôle capital. Ce sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles caractérisées par une grande plasticité qui leur permet à la fois de générer des réponses immunitaires effectrices pour éliminer les pathogènes et d'induire une tolérance périphérique selon les signaux qu'elles perçoivent. La grande plasticité des cellules dendritiques fait de la manipulation de ces cellules un champ d'investigation pour une

potentielle thérapie cellulaire par des DC pro-tolérogènes afin de moduler la réponse immune. Un des moyens de bloquer la maturation des cellules dendritiques et/ou de les rendre tolérogènes est l'utilisation d'immunosuppresseurs. En effet, en plus de leur effet inhibiteur sur l'activation et / ou la prolifération des lymphocytes T, de nombreuses études ont montré ces dernières années que la plupart de ces molécules avaient une action directe sur les cellules présentatrices d'antigène. Parmi ces agents pharmacologiques, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'acide mycophénolique (MPA) sur les cellules dendritiques humaines *in vitro*. Le MPA est le métabolite actif du mycophénolate mofétil (MMF) qui est un immunosuppresseur couramment utilisé en transplantation. Nous avons ainsi montré au sein du laboratoire que les cellules dendritiques traitées au MPA présentaient une morphologie particulière, sécrétaient peu d'IL-12 mais beaucoup d'IL-10 et pouvaient induire l'anergie des lymphocytes T $CD4^+$ (Lagaraine et al., 2005). Nous avons dans un premier temps approfondi l'étude des caractéristiques des cellules dendritiques humaines traitées par le MPA *in vitro* en analysant les voies de signalisation impliquées dans la maturation et particulièrement celle des MAPK. Nous avons ensuite déterminé dans ce travail de thèse si les cellules dendritiques traitées par le MPA pouvaient modifier la fonction cytotoxique des lymphocytes T $CD8^+$ et induire des lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs. Enfin, nous avons analysé l'action de ces cellules T $CD4^+$ régulatrices sur d'autres cellules immunitaires, à savoir les cellules dendritiques et les lymphocytes T $CD8^+$.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse seront exposés après une revue bibliographique. Les cellules dendritiques et les lymphocytes T seront tout d'abord décrits. Nous nous intéresserons ensuite à l'immunologie de greffe et plus particulièrement aux différentes voies d'alloreconnaissance et au concept de la tolérance immune. Enfin, la dernière partie de ce travail sera consacrée à une conclusion générale.

L'intérêt de notre travail a donc été de générer des cellules régulatrices (DC et lymphocytes T) pour une utilisation potentielle en thérapie cellulaire en vue d'induire une tolérance spécifique du greffon.

Revue bibliographique

I. LES CELLULES DENDRITIQUES

1. Généralités

Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigène professionnelles, capables d'activer des lymphocytes T naïfs. Grâce à leurs récepteurs (PRRs pour Pattern Recognition Receptors) reconnaissant des motifs conservés de micro-organismes (PAMPs pour Pathogen Associated Molecular Patterns), elles jouent le rôle de « sentinelles » en périphérie. Leur capacité à capturer et présenter les antigènes à leur surface leur permet d'activer ensuite les lymphocytes T. Les cellules dendritiques font donc le lien entre immunité innée et immunité adaptative.

Les cellules dendritiques sont présentes dans l'organisme sous deux états : immature et mature. Les cellules dendritiques immatures, présentes au niveau de la majorité des tissus, jouent le rôle de « sentinelles ». Grâce à leur importante capacité d'endocytose, elles captent les antigènes. Cette étape génère des signaux qui rendent les cellules dendritiques matures ; elles perdent alors leur capacité d'endocytose, apprêtent les antigènes et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent aux lymphocytes T naïfs ou mémoires des peptides dérivés de ces antigènes conjointement avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'activation des lymphocytes T découle de la double reconnaissance CMH/peptide par le complexe TCR et de l'interaction entre les molécules de co-stimulation présentes à la surface des cellules dendritiques et celles exprimées par les cellules T.

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immune effectrice mais sont également impliquées dans l'induction et le maintien de la tolérance immunitaire. Il existe plusieurs populations de cellules dendritiques, classées selon leur origine et leur localisation. L'orientation de la réponse immunitaire dépend de l'état d'activation des cellules dendritiques mais aussi de la sous-population considérée. La majeure partie de ce chapitre sera consacrée aux cellules dendritiques myéloïdes humaines qui ont fait l'objet de ce travail de thèse.

2. Classification des cellules dendritiques humaines

Les cellules de Langerhans, présentes au niveau de la peau, ont été les premières cellules dendritiques découvertes en 1868 par Paul Langerhans. A cette époque, elles étaient considérées comme des terminaisons nerveuses (Rossi and Young, 2005). Ce n'est qu'une centaine d'années plus tard, en 1973 que Steinman et Cohn identifient des cellules avec une morphologie semblable dans la rate de souris et les baptisent « cellules dendritiques » compte-tenu de leur morphologie particulière en forme d'arbre ou de dendrites (du grec « dendron » signifiant arbre) (Steinman and Cohn, 1973). Les cellules dendritiques sont présentes dans le sang, la lymphe, le thymus et les organes lymphoïdes secondaires mais également dans des tissus non lymphoïdes comme l'épiderme, le derme, les poumons, l'intestin, le cœur, le foie et les reins. Cependant, leur faible fréquence dans l'organisme (1 à 2% des leucocytes) et le manque de marqueurs spécifiques ont rendu difficile leur caractérisation (Hart, 1997; Sato and Fujita, 2007). Néanmoins, l'émergence de techniques de différenciation et de culture *ex vivo* et l'apparition d'anticorps monoclonaux spécifiques ont permis de mieux les étudier ces dernières années (Banchereau et al., 2000).

Les cellules dendritiques humaines sont des leucocytes dérivés de la moelle osseuse (Katz et al., 1979; Rossi and Young, 2005). A ce jour, aucun marqueur spécifique de la « lignée » dendritique n'a été identifié, elles sont donc « lin^- ». Dans les organes lymphoïdes, on distingue les cellules dendritiques myéloïdes dites « conventionnelles » ($CD11c^+$) des cellules dendritiques plasmacytoïdes ($CD11c^-$). Les différentes sous-populations de cellules dendritiques sont donc classées selon leur localisation et l'expression différentielle de plusieurs marqueurs de surface (Sato and Fujita, 2007).

2.1 Les cellules dendritiques myéloïdes

Les cellules dendritiques myéloïdes humaines dites « conventionnelles » expriment les molécules du CMH de classe II. On distingue deux sous-populations de cellules dendritiques dans le sang périphérique : les $CD4^+$, $CD1a^+$, $CD11c^{high}$, BDCA-1/$CD1c^+$ (0,6% des cellules mononucléées du sang périphérique : PBMC) et les $CD4^+$, $CD1a^-$, $CD11c^{low}$, BDCA-3/$CD141^+$ (<0,05% des PBMC) (Sato and Fujita, 2007). Ces cellules dendritiques ont la capacité de stimuler les lymphocytes T (Ito et al., 1999).

Après une brève description des différentes populations de cellules dendritiques, ce chapitre sera ensuite consacré aux cellules dendritiques myéloïdes.

2.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ont été découvertes en 1958 par Lennert et Remmele, dans les zones T des ganglions lymphatiques (Lennert and Remmele, 1958). Cependant à cette époque, elles étaient considérées comme des cellules plasmacytoïdes à cause de leur ressemblance aux plasmocytes puis plus tard comme des cellules T plasmacytoïdes. Cependant, ces cellules n'expriment pas de marqueurs spécifiques des lymphocytes B ni des plasmocytes. Après la découverte de marqueurs de la lignée myélo-monocytaire, ces cellules ont été appelées « monocytes plasmacytoïdes » ; mais ce n'est qu'en 1999 que les travaux de Siegal et collaborateurs et de Cella et collaborateurs, ont définitivement identifié les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires (Colonna et al., 2004; McKenna et al., 2005). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines sont caractérisées par le phénotype suivant : $CD4^+$, $CD45RA^+$, $ILT3^+$, $ILT1^-$, $BDCA\text{-}2^+$, $BDCA\text{-}4^+$, $HLA\text{-}DR^{++}$, $CD33^-$, $CD62L^+$ (Colonna et al., 2004; Rossi and Young, 2005). Contrairement aux cellules dendritiques myéloïdes, elles n'expriment pas CD11c mais sont $CD123^{high}$.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont les cellules les plus productrices d'IFN-α de l'organisme, ce qui leur confère un rôle majeur dans la réponse anti-virale. Elles reconnaissent les ADN et ARN viraux grâce aux Toll Like Receptors (TLR) 7 et 9. Elles pourraient également intervenir dans les réponses anti-tumorales (McKenna et al., 2005). *In vitro*, elles passent de l'état immature à mature en présence d'IL-3 et de CD40L (Colonna et al., 2004). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont capables d'orienter la réponse immunitaire vers Th1 ou Th2 (Ito et al., 2004) ; certaines études montrent qu'elles peuvent également induire de la tolérance *in vivo* (Ito et al., 2007).

2.3 Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont situées dans l'épiderme, les muqueuses et l'épithélium pulmonaire où elles forment un réseau dense grâce à leurs longs prolongements cytoplasmiques (Rossi and Young, 2005). Elles expriment des molécules qui leur sont spécifiques : la Langerhine, une lectine de type C qui jouerait un rôle dans la présentation des

antigènes glycopeptidiques (Mizumoto and Takashima, 2004) et la E-cadherine, une molécule d'adhésion permettant leur rétention dans l'épiderme (Tang et al., 1993). Les cellules de Langerhans sont les seules cellules dendritiques possédant des structures cytoplasmiques appelées granules de Birbeck. Il s'agit d'endosomes lamellaires organisés en strates ayant la forme de raquette de tennis ou de baguette. Les cellules de Langerhans expriment également d'autres molécules caractéristiques de cellules dendritiques comme le CD1a qui leur permettrait de présenter les antigènes lipidiques (Hunger et al., 2004; Mizumoto and Takashima, 2004). Bien que particulières, les cellules de Langerhans, sont de vraies cellules présentatrices d'antigène professionnelles : après capture d'un antigène, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires tout en effectuant leur maturation afin de stimuler les lymphocytes T (Hemmi et al., 2001).

2.4 Les cellules dendritiques dermiques et interstitielles

Les cellules dendritiques dermiques et interstitielles complètent la fonction « sentinelle » exercée par les cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme. Elles se situent dans le derme, les plaques de Peyer de l'intestin et des poumons, le cœur (associées à de petits capillaires), le foie et les reins (Hart and McKenzie, 1988; Prickett et al., 1988). Elles expriment fortement les récepteurs liés à l'endocytose ainsi que les récepteurs de chimiokines inflammatoires (de Heer et al., 2005; Hart and McKenzie, 1988). On distingue les cellules dendritiques dermiques des autres cellules interstitielles par leur expression du facteur de coagulation XIIIa.

2.5 Les cellules dendritiques thymiques

On distingue deux populations de cellules dendritiques thymiques : les conventionnelles (cDC thymiques) et les plasmacytoïdes (pDC thymiques). Les cDC thymiques de phénotype $CD11c^{+}$ HLA-DR^{+} $CD45RA^{low}$ $CD83^{+}$ $CD4^{+}$ sont retrouvées dans la médulla ainsi qu'au niveau de la jonction cortico-médullaire (Wu and Shortman, 2005). Elles semblent impliquées dans la sélection négative des lymphocytes T auto-réactifs par présentation des antigènes du Soi (Shortman et al., 1998; Sprent and Webb, 1995). Les pDC thymiques sont HLA-DR^{low}, $CD45RA^{+}$, $CD11c^{-}$ et $CD123^{+}$. Elles sont également présentes dans le cortex (Sprent and Webb, 1995; Wu and Shortman, 2005). Leur rôle dans le thymus reste assez mal compris. Il semble peu probable qu'elles jouent un rôle dans la sélection

négative des lymphocytes T étant donné leur faible expression des molécules de CMH de classe II (Wu and Shortman, 2005). Quelques études montrent qu'elles pourraient cependant induire des lymphocytes T régulateurs (Martin and Bayley, 2002; Moseman et al., 2004).

2.6 Les cellules dendritiques folliculaires

Les cellules dendritiques folliculaires sont présentes principalement dans les follicules primaires riches en cellules B et dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. Contrairement aux autres cellules dendritiques, elles ont une origine stromale (mésenchymateuse et non hématopoéïtique) (Hart, 1997; van Nierop and de Groot, 2002). De même, elles ne présentent pas l'antigène par les molécules du CMH de classe II. Par contre, elles peuvent présenter les antigènes natifs grâce aux récepteurs de la fraction Fc des immunoglobulines FcγRIIb (CD32) et FcεRII (CD23) ainsi qu'aux récepteurs du complément CR2 (CD21) et CR1 (CD35) (Liu et al., 1997; van Nierop and de Groot, 2002). Elles sécrètent également la chimiokine CXCL13, ce qui facilite le recrutement des lymphocytes B. Les cellules dendritiques folliculaires auraient un rôle central dans l'activation et la sélection des lymphocytes B au niveau du centre germinatif et dans le maintien de la mémoire immunologique.

2.7 Les cellules dendritiques associées aux muqueuses

Les cellules dendritiques des muqueuses résident dans les plaques de Peyer, dans les muqueuses du tractus respiratoire et intestinal, la cavité orale, l'appareil uro-génital et dans le mucus des membranes (Hart, 1997; Iwasaki, 2007; Johansson and Kelsall, 2005). Ces cellules participent principalement au maintien de la tolérance orale mais aussi à la lutte contre les pathogènes (Iwasaki, 2007; Johansson and Kelsall, 2005). Contrairement au modèle murin, les sous-populations de cellules dendritiques des muqueuses chez l'Homme sont peu caractérisées du fait de leur faible accessibilité. Néanmoins, elles sont principalement définies par leur forte expression du CMH de classe II et par leur capacité allo-stimulatrice (Johansson and Kelsall, 2005).

3. Ontogénie des cellules dendritiques

Les travaux de recherche concernant les cellules dendritiques ont été abondants ces dernières années. Ainsi, les différentes sous-populations, les fonctions et les localisations des cellules dendritiques humaines sont clairement établies alors que leur origine précise et leurs précurseurs restent mal connus.

Les cellules dendritiques sont des leucocytes issus de la moelle osseuse, à l'exception des cellules dendritiques folliculaires qui ont une origine stromale (Rossi and Young, 2005). A cause de leurs similitudes fonctionnelles avec les monocytes, les cellules dendritiques ont été originairement considérées comme appartenant à la lignée myéloïde. Ce concept a été renforcé par la génération de cellules dendritiques myéloïdes à partir de monocytes et de cellules souches $CD34^+$ (Caux et al., 1996a; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Toutefois, des études effectuées chez la souris ont montré que des cellules dendritiques pouvaient avoir une origine lymphoïde. En effet, Wu *et al* ont différencié des $CD4^-CD8^-CD3^-CD44^+CD25^+$ murins en cellules dendritiques alors qu'elles sont incapables de se différencier en cellules myéloïdes (Wu et al., 1996).

Ainsi, le processus de différenciation en cellules dendritiques semble complexe, d'autant plus que d'autres études soulignent que des cellules dendritiques murines myéloïdes et plasmacytoïdes peuvent être générées à partir de précurseurs myéloïdes et lymphoïdes exprimant le Flt3 (FMS-like tyrosine kinase-3) (D'Amico and Wu, 2003; Karsunky et al., 2003). Enfin, il semblerait que des cellules dendritiques plasmacytoïdes puissent se différencier en cellules dendritiques myéloïdes conventionnelles suite à une infection virale (Zuniga et al., 2004).

Contrairement aux autres cellules de la lignée hématopoïétique telles que les cellules B, NK, T, les monocytes ou encore les neutrophiles, la différenciation en cellules dendritiques semble donc plus complexe et flexible. Ces observations ont conduit au concept de plasticité fonctionnelle des précurseurs avec une rétention prolongée du potentiel myéloïde. Ce modèle suggère que toutes les DC peuvent se différencier à divers stades, les sous-populations de DC étant générées par l'influence de l'environnement local sur les précurseurs relativement plastiques (Shortman and Naik, 2007). Cette plasticité des précurseurs permettrait la présence de cellules dendritiques dans l'organisme dans toutes les situations.

4. Modèles de différenciation des cellules dendritiques *in vitro*

Les cellules dendritiques sont présentes en faible proportion dans l'organisme : elles représentent environ 1 à 2% des leucocytes. Il est donc difficile de les isoler en quantité suffisante pour pouvoir les étudier. Des méthodes de différenciation de cellules dendritiques *in vitro* ont été développées : soit à partir de cellules souches $CD34^+$ issues de la moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical soit à partir de monocytes du sang périphérique.

4.1 A partir de cellules souches $CD34^+$

Les cellules souches $CD34^+$ peuvent être isolées de la moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical du nouveau-né pour obtenir des cellules dendritiques *in vitro*. La culture de ces cellules avec du GM-CSF (« Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor ») et du TNF-α (Tumor Necrosis Factor alpha) entraîne leur différenciation en deux sous-populations de cellules dendritiques (Caux et al., 1996a). La première population ressemble aux cellules de Langerhans : elles expriment CD1a, E-Cadhérine, et contiennent des granules de Birbeck. Cette voie est dépendante de la présence de TGF-β (« Transforming Growth Factor β ») confirmant les données sur les souris déficientes en TGF-β qui ne possèdent pas de cellules de Langerhans (Borkowski et al., 1996). La seconde population ressemble aux cellules dendritiques interstitielles ou dermiques (Caux et al., 1996a; Shortman and Liu, 2002). Les cellules de Langerhans peuvent également être obtenues à partir de cellules $CD34^+$ traitées avec de l'IL-3 et du TNF-α (Caux et al., 1996b).

Les cellules souches $CD34^+$ sont capables de se différencier en cellules dendritiques interstitielles $CD11c^+/CD1a^-/CD1c^-$, en présence de Flt3L, d'IL-6, d'IL-3 et de SCF (facteur de croissance de cellules souches, « stem cell factor ») (Fadilah et al., 2007). L'utilisation d'IL-4, de Flt3L, de GM-CSF et de SCF favorise aussi l'émergence de cellules dendritiques interstitielles (Ward et al., 2006).

4.2 A partir de monocytes

Chez l'Homme, les monocytes sont les précurseurs les plus fréquemment utilisés pour obtenir des cellules dendritiques *in vitro*. Lorsqu'ils sont cultivés pendant plusieurs jours en

présence de GM-CSF et d'IL-4, ils se différencient en cellules dendritiques myéloïdes immatures (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Notons que l'IL-4 peut être remplacée par l'IL-13 (Alters et al., 1999). L'addition de TGF-β lors de la différenciation de monocytes cultivées avec du GM-CSF et de l'IL-4 induit des cellules ressemblant aux cellules de Langerhans (Geissmann et al., 1998). La culture de monocytes en présence de GM-CSF, d'IL-4 et d'IFN-β ou de GM-CSF, de TNF-α et de flt3 ou de GM-CSF, d'IL-3 et de flt3 favorise l'émergence de cellules dendritiques plasmacytoïdes (Brawand et al., 2002; Gilliet et al., 2002; Huang et al., 2001).

La maturation de ces cellules dendritiques est caractérisée par l'augmentation de l'expression de CD83, des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II. Ce phénomène est obtenu après stimulation des cellules dendritiques immatures par des produits bactériens tels que le LPS (lipopolysaccharide), des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α ou par des cocktails de cytokines composés de TNF-α + IL-1β + IL-6 + PGE2 (Lee et al., 2002a; Sato and Fujita, 2007) ou via le CD40L (dimère ou trimère de CD40L soluble ou interaction avec un lymphocyte T activé) (Caux et al., 1994).

5. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée

L'immunité innée est un mécanisme ancien de défense contre les pathogènes. Elle constitue la première ligne de défense durant la période critique suivant l'exposition de l'hôte à un pathogène grâce 1) à la mobilisation précoce des cellules phagocytaires et du complément et 2) à la collecte et à l'interprétation des informations contenues dans l'environnement, fonction assurée essentiellement par les DC qui pourront ensuite informer l'immunité adaptative en stimulant des cellules possédant un récepteur TCR (« T Cell Receptor ») et BCR (« B Cell Receptor »), afin de développer une réponse immune spécifique d'antigènes et d'élaborer une mémoire immunitaire.

Pour exercer pleinement ces fonctions d'initiation de la réponse immune, la DC doit recevoir des signaux lui permettant de déclencher un processus moléculaire de reprogrammation et d'activation génique appelé processus de maturation.

On distingue 4 grandes familles de molécules capables d'induire des signaux de maturation vers la DC : les motifs conservés associés aux pathogènes (PAMP), les molécules

associées aux dommages cellulaires (DAMP), les cytokines synthétisées par les cellules de l'environnement où se déclenche la réponse immune qui peuvent donc provenir des cellules épithéliales, des cellules de l'immunité innée ou des fibroblastes et enfin l'engagement du CD40 à la surface de la DC.

5.1 Récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMP

La détection des pathogènes microbiens par les cellules du système immunitaire inné repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires conservés de ces micro-organismes appelés Profils Moléculaires Associés aux Pathogènes ou PAMPs (Akira and Hemmi, 2003). Ces structures hautement conservées ne sont exprimées que par les micro-organismes et sont essentiels à leur survie, limitant ainsi l'apparition de mutants qui pourraient échapper à la reconnaissance. Les motifs les plus connus sont les composants des bactéries tels que le LPS (LipoPolySaccharide) des Gram-, le peptidoglycane des Gram+, les motifs CpG non méthylés caractéristiques du génome bactérien ou encore les ARN double brin des virus. Ces PAMPs sont reconnus par des récepteurs spécifiques appelés récepteurs de reconnaissance de profil moléculaire ou PRR (« Pattern Recognition Receptor »). Les PRR sont actuellement regroupés en 4 grandes familles : les TLR (« Toll Like Receptor »), les lectines de type C, les récepteurs « Scavenger » ainsi que les récepteurs intracellulaires NLR («NOD Like Receptor ») et RLH (« RIG Like Receptor »). **(Figure 1).**

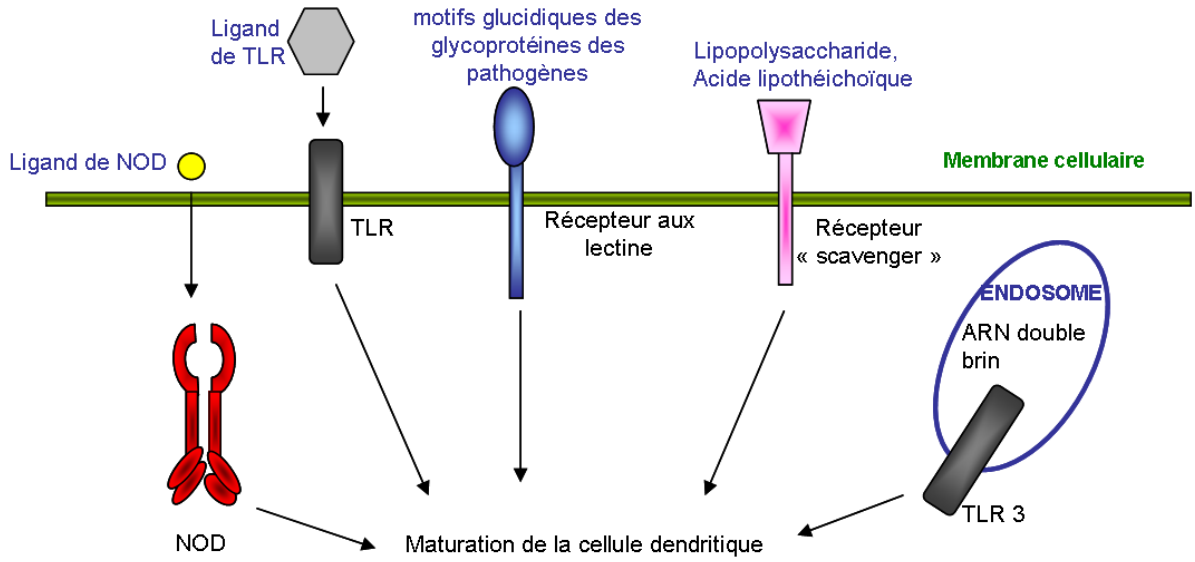


Figure 1: Les différents types de PRR exprimés par les cellules dendritiques

5.1.1 Les TLR

Les récepteurs « Toll » ont été initialement découverts chez la Drosophile. En 1996, Hoffmann et son équipe montrent que ce récepteur participe à l'immunité anti-fongique (Medzhitov, 2001). Des homologues de Toll ont ensuite été identifiés chez l'Homme et ont été appelés TLR pour « Toll Like Receptors » (Medzhitov et al., 1997). La famille des TLR décrite chez les mammifères compte actuellement 10 membres chez l'Homme et 13 chez la souris. Ces TLR sont des récepteurs soit de surface, soit intracytoplasmiques qui vont reconnaître des motifs moléculaires distincts de composants microbiens (Takeda and Akira, 2005). Citons comme exemple le TLR4 qui reconnaît le LPS (Medzhitov et al., 1997; Poltorak et al., 1998), le TLR9 pour l'ADN bactérien riche en motif non méthylés (CpG) (Hemmi et al., 2000) et le TLR3 pour les ARN doubles brins (mimés dans les études *in vitro* par le poly I :C) (Alexopoulou et al., 2001). De plus, ce spectre de reconnaissance est élargi par la capacité de certains de ces TLR à former des hétérodimères (TLR 1 + 2 ; TLR 2 + 6). Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont ancrés dans la membrane cytoplasmique alors que les TLR 3, 7, 8 et 9, intracellulaires, se situent au niveau des endosomes (Ahmad-Nejad et al., 2002; Heil et al., 2003). Les TLR ne sont pas exprimés de façon homogène sur toutes les cellules dendritiques. Ainsi, les cellules dendritiques myéloïdes expriment les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 (Ito et al., 2005; Pulendran, 2004; Seya et al., 2005) alors que les cellules dendritiques plasmacytoïdes expriment les TLR 1, 6, 7, 9 et 10 (Hornung et al., 2002; Ito et al., 2005; Krug et al., 2001; Rothenfusser et al., 2002). Les répertoires de TLR exprimés par ces deux types de cellules dendritiques sont donc complémentaires.

Après engagement d'un TLR avec son ligand, les protéines adaptatrices MyD88 et TIRAP/MAL s'associent au domaine TIR (« Toll/IL-1R domain » ayant une grande homologie avec le récepteur de l'IL-1) et initient la formation d'un complexe de signalisation impliquant les protéines IRAKs (kinases associées aux récepteurs des interleukines). Ce processus permet alors l'activation des voies de la famille des MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase ») comme JNK (Jun N terminal kinase) et p38MAPK ainsi que celle du facteur de transcription NF-κB (Kawai and Akira, 2007; Medzhitov, 2001). Tous ces effets ont une influence importante sur la stimulation et la différenciation des cellules T (Reis e Sousa et al., 2001).

5.1.2 Les lectines de type C

Les lectines de type C (CLR) participent à la réponse innée par leur capacité à se lier aux motifs glucidiques des glycoprotéines du soi et des pathogènes (Rossi and Young, 2005). Ces récepteurs, exprimés par les cellules dendritiques, sont spécialisés dans la capture et l'apprêtement de l'antigène. Parmi les lectines de type C, on retrouve le récepteur au mannose (CD206), DEC-205 (CD205), la Langherine (CD207), DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing non-integrin) (CD209), BDCA-2 (Blood Dendritic Cell Antigen) et la dectine-1 (Kanazawa, 2007). L'activation et la maturation des cellules dendritiques entraînent principalement une diminution de l'expression de ces récepteurs de capture antigénique. Toutefois, l'expression du CD205 peut être augmentée dans les cellules dendritiques dermiques (Ebner et al., 2004; Rossi and Young, 2005). Ces molécules ont par ailleurs de nombreuses autres fonctions. Par exemple, DC-SIGN est aussi une molécule d'adhésion qui interagit avec ICAM2 (« Inter Cellular Adhesion Molecule ») pour faciliter la migration des DC (Geijtenbeek et al., 2000a), ou avec MAC1/CD11b pour participer à l'activation des neutrophiles par la DC (van Gisbergen et al., 2005) ou avec ICAM3 pour participer à l'activation du lymphocyte T (Geijtenbeek et al., 2000b).

5.1.3 Les récepteurs "Scavanger"

Les récepteurs « Scavenger » également appelés « récepteurs éboueurs » en français se lient aux composants des parois des bactéries $Gram^+$ et $Gram^-$ (lipopolysaccharides, acides lipoteichoïques). Ils interviennent également dans l'élimination des cellules apoptotiques. Les récepteurs Scavenger sont impliqués dans l'adhésion des cellules sur lesquels ils sont exprimés mais aussi dans l'endocytose et la phagocytose des antigènes (Gordon, 2002).

5.1.4 Les récepteurs intracellulaires de type NOD

Il existe deux autres familles de récepteurs qui sont impliqués dans la reconnaissance intracellulaire des PAMP dérivés notamment des virus et des bactéries : les récepteurs NLR («NOD Like Receptor ») et les récepteurs RLH (« RIG Like Receptor »). Contrairement aux TLR qui sont liés à la membrane cellulaire, les NLR et les RLH sont des protéines cytosoliques qui reconnaissent la présence de PAMP intracellulaires.

Les deux premiers membres de la famille des NLR qui ont été décrits sont NOD1 (« Nucleotide Oligomerization Domain ») et NOD2 (Inohara et al., 1999; Ogura et al., 2001).

La famille des NLR compte actuellement à la fois des molécules NOD mais aussi des membres du clan NALP (« NACHT/LRR/Pyd-containing Proteins ») (Martinon and Tschopp, 2005). L'implication des protéines NOD dans l'immunité anti-microbienne a été récemment décrite grâce à l'étude de souris déficientes en molécules NOD. Les souris déficientes en NOD1 ont une plus forte susceptibilité aux infections par *Helicobacter pylori* (Viala et al., 2004) alors qu'une diminution de la clairance de *Listeria monocytogenes* est observée chez les souris déficientes en NOD2 (Kobayashi et al., 2005). Les récepteurs NOD reconnaissent les pathogènes grâce à leur domaine LRR (« Leucin Rich Repeat ») riche en leucine et à leur domaine CARD ((« CAspase Recruitment Domain ») qui permettent la transduction du signal d'activation (Inohara et al., 2003). Les agonistes de TLR ainsi que ceux des NLR peuvent agir en synergie dans l'induction de la maturation des cellules dendritiques (Fritz et al., 2005; Tada et al., 2005). L'engagement des récepteurs NOD par leur ligand induit, de ce fait l'activation de NF-κB et de p38MAPK (Opitz et al., 2006). Ces deux récepteurs intracellulaires peuvent agir en synergie avec les TLR pour l'activation de la cellule dendritique (Tada et al., 2005).

Parmi les RLH, on retrouve les deux membres principaux, RIG-I (ou DDX58) et MDA5 (ou Helicard) qui partagent deux domaines N terminaux CARD suivis d'un domaine RNA hélicase. Ces récepteurs ont aussi été décrits comme étant importants dans la reconnaissance des ARN simple-brins (ARNsb) positifs ou négatifs. La reconnaissance de l'ARN viral par ces protéines induit la production d'interféron de type I *via* l'activation de NF-κB (Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2004).

5.2 Activation par des molécules endogènes (DAMP)

Des signaux provenant des cellules mortes ou de lysats cellulaires sont capables d'induire la maturation des DC (Gallucci et al., 1999). Les molécules capables d'induire ces signaux sont appelées DAMP pour Damage Associated Molecular Pattern (Seong and Matzinger, 2004). Parmi ces DAMP, on retrouve les protéines de stress ou HSP (« Heat Shock Proteins »), la protéine HMGB1 («High Mobility Group Box 1») qui est libérée par les cellules nécrotiques, la β défensine (peptide anti-microbien) ou encore certains composants de la matrice extracellulaire comme l'acide hyaluronique et l'acide urique (Biragyn et al., 2002; Lotze and Tracey, 2005; Rock et al., 2005; Srivastava and Maki, 1991). Ces molécules sont,

soit exprimées de façon constitutive et libérées par les cellules nécrotiques ou soit induites lors d'un stress cellulaire en réponse à l'infection par exemple.

Plusieurs études ont ainsi montré que la protéine HMGB1 pouvait induire la migration et l'activation des cellules dendritiques humaines (Dumitriu et al., 2005; Dumitriu et al., 2007; Messmer et al., 2004; Yang et al., 2007a). L'activation des cellules dendritiques par HMGB-1 entraîne une up-régulation de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II, une augmentation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-1α, IL-6, IL-12 et TNF-α et des chimiokines CCL19, CXCL8 et CXCL12. Ces DC acquièrent la capacité à stimuler la prolifération de lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques promouvant ainsi une réponse immune adaptative spécifique (Yang et al., 2007a). L'amplitude de la réponse semble équivalente à celle induite par le LPS, les CpG ou encore la molécule CD40L (Messmer et al., 2004).

5.3 Activation par des cytokines inflammatoires

Lors d'une infection, les agents pathogènes activent directement les cellules dendritiques mais également indirectement par des facteurs tissulaires inflammatoires produits par les cellules en réponse à l'invasion des pathogènes. Ainsi, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF-α suite à la reconnaissance des pathogènes. La PGE2 (Prostaglandine E2) et les interférons peuvent être libérés par les cellules Natural Killers (NK). Ces cytokines peuvent entraîner la maturation des cellules dendritiques humaines et murines (Jonuleit et al., 1997). D'autre part, les interférons de type I, comme l'interféron alpha (IFN-α), produits suite à une infection virale par les pDC par exemple, peuvent également activer d'autres DC (Siegal et al., 1999). Par ailleurs, des cellules NK activées peuvent aussi induire la maturation des mo-DC par un mécanisme nécessitant la production d'IFN-γ et un contact cellulaire (Gerosa et al., 2002).

5.4 Activation par l'engagement du CD40

Des interactions cellule / cellule sont aussi capables d'activer les DC. Par exemple, l'engagement du CD40 par la molécule CD40L (CD154) exprimée sur les lymphocytes activés, est important pour la pleine maturation des DC. La molécule CD40 est une glycoprotéine membranaire de la famille des récepteurs au TNF, exprimée sur les

lymphocytes B, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales, certains lymphocytes T activés et les précurseurs hématopoïétiques (Quezada et al., 2004). Son ligand, CD40L, est exprimé sur les lymphocytes T et les lymphocytes B activés ainsi que sur les plaquettes activées. Par ailleurs, durant la réponse inflammatoire, CD40L est également induit à la surface des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des macrophages (Quezada et al., 2004). L'activation des DC par l'engagment du CD40 entraîne la production de cytokines inflammatoires, l'augmentation des molécules de CMH-II et l'augmentation de la survie des DC (van Kooten and Banchereau, 2000). D'autre part, des études ont montré que des anticorps agonistes de CD40 induisaient une autoimmunité systémique ou abolissaient l'état de tolérance et que cet effet était lié à l'action sur les cellules dendritiques (Ichikawa et al., 2002; Roth et al., 2002; Sotomayor et al., 1999). Ces travaux indiquent donc que l'organisme peut passer assez aisément de l'état de tolérance à celui d'immunité et que le statut des DC joue un rôle important dans le maintien de cet équilibre *in vivo*.

5.5 Voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques

L'engagement des ligands de TLR et du récepteur au TNF-α induit la maturation des cellules dendritiques par l'activation de nombreuses molécules de transduction impliquées dans les différentes voies de signalisation comme celles de NF-κB ou des MAPK.

5.5.1 Transduction par les TLR

L'engagement des TLR entraîne une signalisation qui est contrôlée majoritairement par la molécule adaptatrice MyD88 (« Myeloid Differentiation primary response protein 88 ») (**Figure 2**) qui contient un domaine TIR et un domaine de mort DD (« Death Domain ») (Medzhitov et al., 1998). La signalisation induite dépend de deux voies : une voie dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 et d'une autre voie indépendante de MyD88 (Akira and Takeda, 2004). Myd88 est une des cinq molécules adaptatrices ayant une activité prépondérante dans la transduction de signaux induits par les TLR. Myd88 peut s'associer à tous les TLR à l'exception du TLR3 et est indispensable à la synthèse d'IL-6 et d'IL-12p40 (Kaisho and Akira, 2006). Elle possède un domaine TIR lui permettant d'interagir avec le

TLR et un domaine de mort menant au recrutement de kinases associées aux récepteurs de l'IL-1 (IRAK). Ainsi le recrutement d'IRAK-4 par Myd88 induit celui d'IRAK-1 entraînant par la suite sa liaison avec la molécule TRAF-6 (« TNFR-Associated Factor-6 »). Le complexe TRAF-6/IRAK-1 se désengage ensuite de son récepteur pour interagir avec le complexe TAK1 (« TGFβ-Associated Kinase-1 »), TAB1 (« TAK-1 Binding protein-1 ») et TAB2 situé au niveau de la membrane plasmique. IRAK-1 est ensuite dégradé puis le complexe restant subit une translocation dans le cytosol où il se lie avec des ligases ubiquitine : UBC13 (« UBiquitin-Conjugating enzyme-13 ») et UEV1A (« Ubiquitin-conjugating Enzyme E2 Variant 1 »). Ceci mène à l'ubiquitinylation de TRAF-6 induisant l'activation de TAK1. Cette dernière conduit à l'activation d'IKK (« Inhibitor of nuclear factor-KB-Kinase2) qui va à son tour phosphoryler les IκBs. Cette phosphorylation mène à la dégradation d'IκB et à la libération de NF-κB (Akira and Takeda, 2004). Cette voie de signalisation résulte aussi en l'activation des MAPK dont p38MAPK (Kaisho and Akira, 2006), JNK (« c-Jun N-terminal Kinase »), et ERK (« Extracellular signal Related Kinase »). En effet, le complexe TAK-1/TAB1/TAB2 permet aussi de phosphoryler la MKK4/7 (« Map Kinase Kinase ») qui va ensuite activer JNK. L'activation de p38MAPK est induite par la phosphorylation en amont de MKK3/6 par TRAF-6 (Akira and Takeda, 2004; Kaisho and Akira, 2006). Les TLR activent aussi la MAPKKK : Cot/Tpl2 entraînant ainsi l'activation de MEK1/2 qui va à son tour phosphoryler ERK. Les TLR agissent enfin sur la voie PI3K (« Kinase PI3 ») par la formation d'un complexe entre Myd88 et PI3K. Ce complexe va ensuite induire la phosphorylation de PIP2 (Phosphatidylinositol biphosphate) en PIP3 menant à l'activation de PDK-1 puis à celle d'Akt (Hazeki et al., 2007).

L'engagement des ligands de TLR3 et TLR4 induit le recrutement de molécules de transduction indépendantes de Myd88 mais nécessitant une autre molécule adaptatrice TRIF (« TIR domain containing Adapter Protein inducing IFN »). TRIF induit l'activation de TRAF-6 ou de RIP-1 (receptor interacting protein-1) entraînant l'activation des IKK afin d'activer NF-κB. Par ailleurs, TRIF interagit également avec IKKε et TBK-1 (TANK-binding kinase 1) phosphorylant ainsi le facteur de transcription IRF3 (« Interferon Regulatory Factor 3 ») nécessaire à la production d'IFN-β (Kaisho and Akira, 2006).

5.5.2 Transduction par le récepteur au TNF

Les effets du TNFα (« Tumor Necrosis Factor alpha ») peuvent être régulés par deux récepteurs distincts exprimés à la surface TNF-R1 et TNF-R2 mais seul le TNF-R1 semble

impliqué dans les changements fonctionnels et phénotypiques des cellules dendritiques (Sallusto et al., 1995) (**figure 2**). Le TNF-R1 est exprimé à la surface des cellules sous forme de trimère. La liaison du TNFα au TNF-R1 permet la fixation de la protéine TRADD (« TNFR-Associated DD protein »), protéine cytoplasmique contenant une région DD. TRADD est à l'origine de la transduction de signaux via le recrutement de deux autres protéines : RIP-1 (« Receptor-Interacting Protein »), contenant une région DD et TRAF-2. Ensuite le complexe TRADD/TRAF-2/RIP-1 se désengage de son récepteur. RIP-1 recrute alors MEKK-3 (« MAPK Kinase Kinase ») et TAK-1 menant à la dégradation d'IκB permettant ainsi la translocation nucléaire de NF-κB. Par ailleurs, ce complexe active MEK-4 et MEK-6 participant de ce fait à l'activation de p38MAPK et de JNK (Bradley, 2008; Kyriakis, 1999). Le TNF-R1 active aussi d'autres voies de signalisation dont Ras-Raf-MEK1-ERK et PI3K mais les mécanismes impliqués restent actuellement mal connus. La PI3K semble phosphoryler PIP2 en PIP3. Ce dernier active PDK-1, une enzyme induisant la phosphorylation d'Akt et PDK-2 qui va aussi aboutir à la phosphorylation d'Akt en passant par l'activation du complexe mTOR (« mammalian Target Of Rapamicin »). Les voies ERK et PI3K sont préférentiellement engagées dans la survie et la prolifération cellulaire (Bradley, 2008).

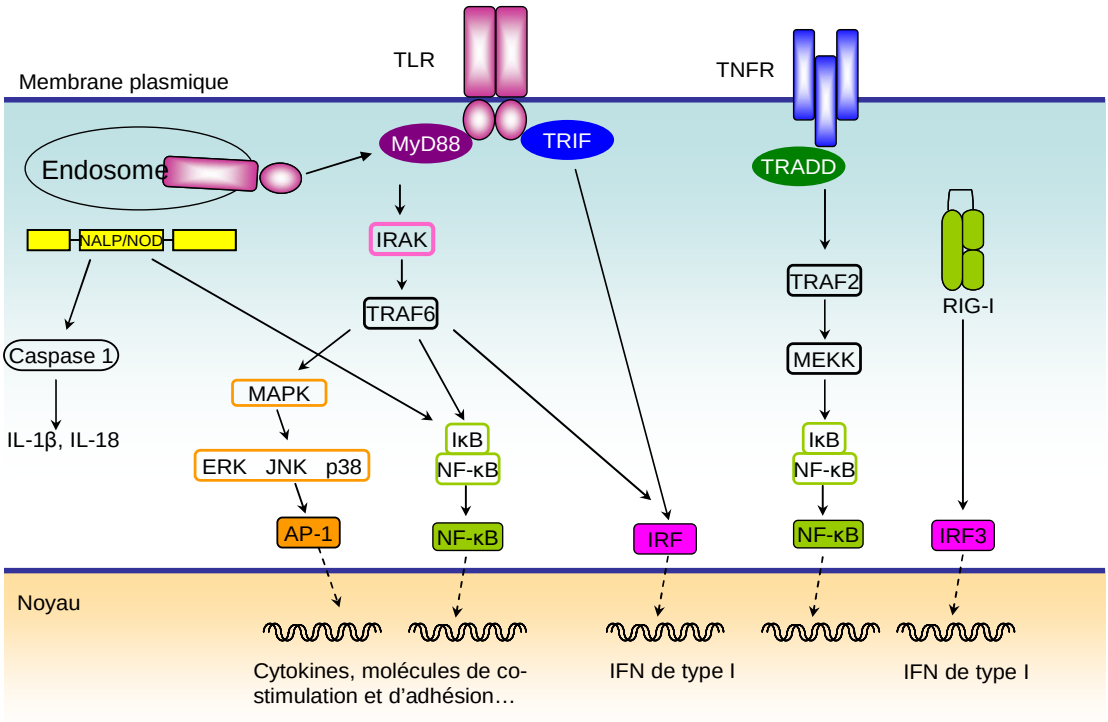


Figure 2: Les différentes voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques

5.5.3 La voie NF-kappa B

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'activation de la voie NF-κB dans les cellules dendritiques tels que les ligands de TLR (Takeda et al., 2003), les ligands des récepteurs NOD (Inohara et al., 2003), les cytokines dont IL-1 (Vakkila et al., 2008) ou le TNFα (Bradley, 2008) ou encore des molécules de co-stimulation CD40L (Kawai and Akira, 2007; Vakkila et al., 2008). Cette activation mène à l'expression de nombreux gènes impliqués dans la maturation de la cellule dendritique en induisant l'expression des molécules de co-stimulation et les molécules du CMH (Ardeshna et al., 2000; Rescigno et al., 1998; Yoshimura et al., 2001), la sécrétion de cytokines dont l'IL-12 et le TNF-α (Jayakumar et al., 2008; Vakkila et al., 2008; Yoshimura et al., 2001).

5.5.4 La voie des MAPK

Les MAPK définissent une famille de protéines impliquée dans la transduction de signaux conduisant à la prolifération, à la différenciation, ou encore à l'apoptose de nombreuses cellules. Chez les mammifères, la voie des MAPK joue aussi un rôle important dans la réponse immune en intervenant aussi bien dans l'initiation de la réponse immune innée, dans l'activation de la réponse immune adaptative, que dans la mort cellulaire lorsque la réponse immune est terminée (Dong et al., 2002). Cette famille de protéines peut être divisée en 3 groupes : ERK, JNK, p38MAPK. Ces protéines sont toutes phosphorylées suite à une cascade de phosphorylation d'autres protéines kinases situées en amont dont les MAPKKK (ou MEKK) puis les MAPKK (ou MEK). Les MAPK vont alors, à leur tour, phosphoryler différents substrats en aval tels que des protéines kinases, des facteurs de transcription ou des phospholipases. JNK et p38MAPK sont fortement activés par l'inflammation et les signaux dangers alors qu'ERK est principalement activé par des facteurs de croissance (Dong et al., 2002; Nakahara et al., 2004).

La voie p38MAPK joue un rôle crucial lors de la maturation des cellules dendritiques par le LPS ou par le TNF-α. Son activation participe à l'expression à la surface du CMH de classe II, des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) et de maturation : CD83 (Arrighi et al., 2001). Par ailleurs, elle est aussi impliquée dans la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-12p40, l'IL-12p70 et le TNF-α (Agrawal et al., 2003; Arrighi et al., 2001). Enfin elle contribue à la forte capacité allostimulatrice des cellules dendritiques matures ainsi qu'à la perte de l'endocytose. (Arrighi et al., 2001; Nakahara et al., 2006; Nakahara et al., 2004).

Contrairement à la voie p38MAPK, la voie ERK semble bloquer certaines fonctions des cellules dendritiques matures (Agrawal et al., 2003; Dillon et al., 2004; Nakahara et al., 2006). Quelques données ont été obtenues sur la participation de la voie JNK dans la maturation des cellules dendritiques mais son implication n'est pas clairement définie (Boisleve et al., 2005).

6. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative

Nous venons de voir que les cellules dendritiques sont largement impliquées dans l'immunité innée où elles participent à la reconnaissance des pathogènes grâce à un panel de récepteurs. En outre, les interactions pathogènes / récepteurs participent également activement à l'induction de la réponse immune adaptative contre les antigènes issus de pathogènes (Akira et al., 2006; Janeway and Medzhitov, 2002). Cette reconnaissance « microbienne » par les TLR et autres récepteurs conduit à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires qui vont aboutir à la maturation phénotypique, à la sécrétion de cytokines inflammatoires et de chimiokines et vont augmenter la capacité des cellules dendritiques à présenter l'antigène aux lymphocytes T. C'est lors du phénomène de maturation que les cellules dendritiques migrent de la périphérie où elles ont capturé les antigènes vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont les présenter aux lymphocytes T. C'est pourquoi, les cellules dendritiques contribuent de façon essentielle au phénomène de rejet de greffe puisqu'elles vont présenter les antigènes du greffon du donneur aux lymphocytes T du receveur.

Les cellules dendritiques jouent également un rôle dans l'activation des lymphocytes B et des cellules Natural Killer mais, seule l'activation des lymphocytes T sera décrite car il s'agit de l'interaction principalement étudiée dans ce travail de thèse.

6.1 Capture des antigènes

La capture des antigènes est un évènement clé dans l'induction d'une réponse immune effectrice. Les cellules dendritiques immatures possèdent divers mécanismes permettant la capture des antigènes solubles ou liés à des récepteurs tels que : la phagocytose, la macropinocytose, la micropinocytose et l'endocytose (Banchereau and Steinman, 1998).

La phagocytose permet l'internalisation de particules, de micro-organismes ou de cellules mortes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques de la famille des récepteurs Fc (FcγRI ou CD64, FcγRII ou CD32, FcRIII-CD16) et les récepteurs du complément par un processus dépendant de l'actine. Les antigènes se lient aux récepteurs et sont internalisés par des vésicules recouvertes de clathrine de façon ATP dépendante.

La macropinocytose est un processus endocytaire dépendant de l'actine qui permet la filtration rapide du milieu extracellulaire afin de détecter la présence d'antigènes solubles par invagination de la membrane plasmique. Une cellule dendritique serait ainsi capable d'ingérer la moitié de son volume cellulaire en une heure (Banchereau and Steinman, 1998; Sallusto et al., 1995).

La micropinocytose, comme la macropinocytose, désigne un mécanisme de filtration de l'environnement mais est caractérisée par la formation de petites vésicules d'environ 80nm. Ces vésicules sont créées après invagination de la membrane plasmique et sont souvent tapissées de clathrines (Swanson and Watts, 1995).

L'endocytose ne nécessite pas de filaments d'actine et dépend des protéines Ras (Barbieri et al., 1998). Les récepteurs permettant aux cellules dendritiques de capturer les antigènes par endocytose sont les récepteurs Fc, les lectines de type C comme DEC-205 (CD205), le récepteur au Mannose (CD206) ou DC-SIGN (CD209) ainsi que les récepteurs « Scavenger » (Banchereau and Steinman, 1998).

6.2 Apprêtement des antigènes

Pour induire une réponse immune efficace, il faut que les cellules dendritiques présentent les antigènes qu'elles ont capturés aux lymphocytes T effecteurs $CD4^+$ ou $CD8^+$. Après leur capture, les antigènes subissent un processus intracellulaire d'apprêtement Celui-ci consiste en sa fragmentation en peptides au niveau des compartiments endosomiaux tardifs puis en son chargement sur les molécules du CMH ; les complexes CMH/peptide sont ensuite transportés à la surface de la cellule dendritique pour être présentés aux lymphocytes T. Les peptides dérivés de l'antigène sont présentés en association avec les molécules du CMH de classe I ou de classe II respectivement en fonction de leur origine endogène ou exogène. Cependant, les cellules dendritiques sont capables de présenter les antigènes exogènes avec les molécules du CMH de classe I : c'est le phénomène de « cross présentation » ou « présentation croisée ».

6.2.1 Apprêtement des antigènes endogènes

Les antigènes endogènes sont présentés par les molécules du CMH de classe I. Ces molécules sont constituées d'une chaîne lourde α, glycosylée et polymorphique, constituée de 3 domaines extracellulaires, une région transmembranaire et une région cytoplasmique. Cette chaîne lourde est associée de façon non covalente à une chaîne légère non polymorphique : la β2-microglobuline. Les antigènes endogènes proviennent de la dégradation de protéines endogènes présentes dans le cytoplasme des cellules dendritiques. Ces protéines peuvent appartenir au « Soi » (renouvellement des protéines intracellulaires normales ou tumorales) ou provenir de virus ou de bactéries à développement intracellulaire (**étape 1 de la figure 3**). Les protéines endogènes sont tout d'abord ubiquitinylées (**étape 2 de la figure 3**) puis dégradées en peptides de 8 à 10 acides aminés par le protéasome, un complexe formé de 14 à 17 sous-unités différentes dont la structure ressemble à celle d'un tonneau (**étape 3 de la figure 3**). Les peptides résultant de cette dégradation sont ensuite pris en charge par une « pompe à peptide » située dans la membrane du réticulum endoplasmique granuleux et constituée d'un hétérodimère de TAP (pour « Transporter associated with antigen processing ») : TAP1 / TAP2 (**étape 4 de la figure 3**). Avant le chargement des peptides, les molécules du CMH de classe I sont assemblées dans le RE à l'aide de différentes protéines chaperonnes. Ainsi, les chaînes lourdes sont d'abord associées à la calnexine qui aide au repliement correct de glycoprotéines. L'association des chaînes lourdes avec la β2-microglobuline est accompagnée par le remplacement de la calnexine par une deuxième lectine, la calréticuline, ainsi que par l'entrée en jeu de l'ERp57, une oxydoréductase catalysant probablement la formation des ponts disulfures au sein des chaînes lourdes. Les complexes ainsi formés se lient enfin directement aux pompes TAP, par l'intermédiaire d'une protéine chaperonne spécialisée, la tapasine, constituant ainsi le «complexe de chargement antigénique» des molécules CMH I (**étape 5 de la figure 3**). Une fois l'assemblage terminé, les complexes peptide / CMH I sont transportés à la surface cellulaire par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi pour être présentés aux lymphocytes T $CD8^+$ (Ackerman and Cresswell, 2004; Cresswell, 1994; Hart, 1997) (**étape 6 de la figure 3**).

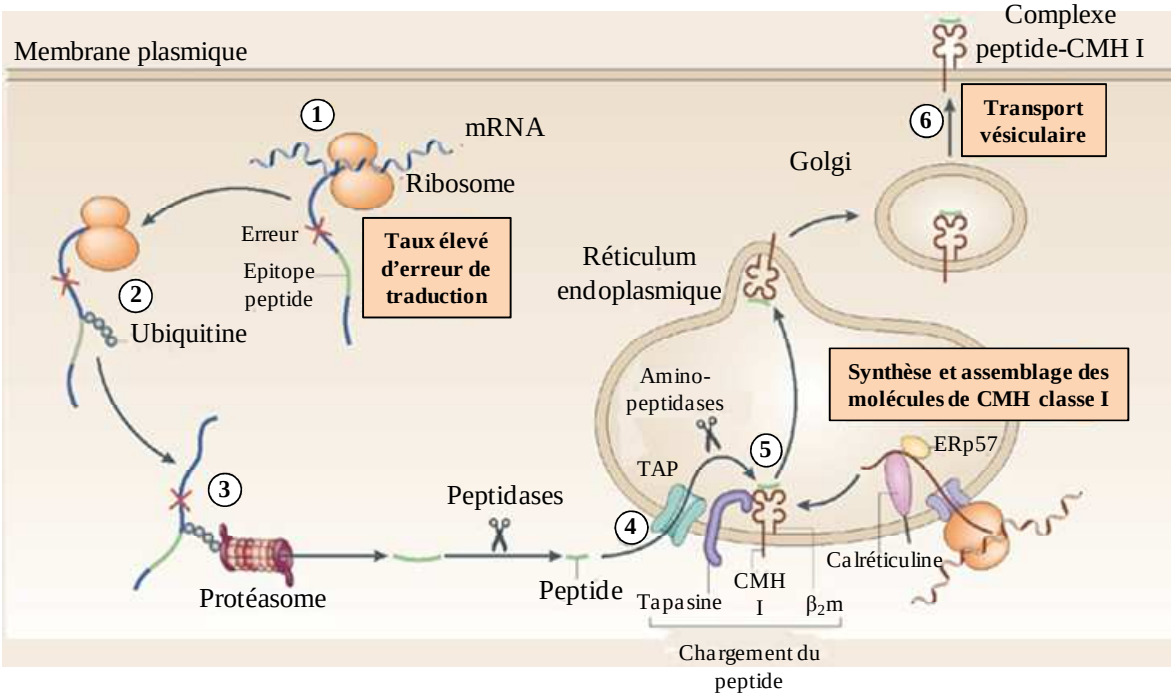


Figure 3: Apprêtement des antigènes endogènes par les molécules du CMH de classe I (d'après Vyas *et al.*, Nature Review Immunol 2008)

6.2.2 Apprêtement des antigènes exogènes

Les antigènes exogènes proviennent de l'environnement extracellulaire. Il peut s'agir de protéines d'origine bactérienne ou virale, de cellules apoptotiques ou nécrotiques ou encore de complexes immuns (Adams et al., 2005). Les antigènes exogènes sont internalisés dans les vésicules endosomiales où le pH acide facilite leur dégradation en peptides de 13 à 24 acides aminés par diverses protéases telles que les cathepsines B ou D. Ces antigènes sont présentés par les molécules du CMH de classe II qui sont des hétérodimères formés de deux chaînes glycoprotéiques α et β synthétisées dans le réticulum endoplasmique (**Figure 4**). Les complexes α/β s'associent avec la chaîne invariante Ii qui permet la bonne conformation du complexe et empêche la fixation de peptides endogènes présents au sein du réticulum endoplasmique dans la cavité (« poche à peptide ») formée par les dimères α/β. Le complexe α/β-Ii est ensuite dirigé vers les endosomes via l'appareil de Golgi. Le pH acide permet la dégradation de la chaîne invariante Ii par la cathepsine S : seul un fragment de cette chaîne appelée CLIP (Class II associated invariant chain peptide) demeure au niveau de la « poche à peptide ». Les molécules HLA-DM et HLA-DO vont ensuite permettre la dissociation de CLIP et le chargement du peptide généré à partir de la protéine exogène. Le complexe CMH

II / peptide est alors transporté vers la membrane plasmique de la cellule dendritique où il pourra être présenté aux lymphocytes T $CD4^+$ (Chow et al., 2002; Guermonprez et al., 2002).

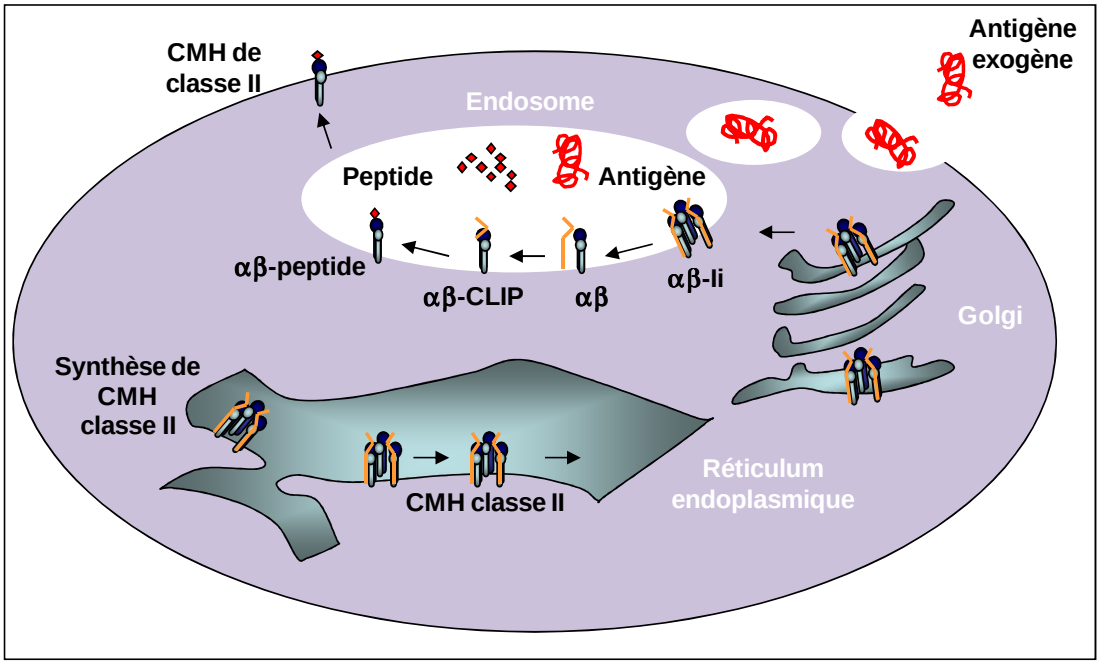


Figure 4: Apprêtement des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe II (d'après Heath and Carbone Nature Review Immunol 2001)

6.2.3 Présentation croisée

Les cellules dendritiques ont la capacité de pouvoir présenter les antigènes exogènes par le CMH de classe I : ce phénomène est appelé « cross-présentation » ou « présentation croisée ». Le chargement des peptides issus de protéines exogènes sur la molécule du CMH de classe I a lieu dans des compartiments hybrides « réticulum endoplasmique – phagosome » contenant des molécules du CMH de classe I nouvellement synthétisées. Les antigènes exogènes sont transportés vers le cytosol grâce à un pore formé par le complexe Sec61 où ils sont dégradés par le protéasome. L'hétérodimère TAP transporterait alors les peptides dérivés de ces antigènes du cytosol vers le compartiment hybride puis ces peptides seraient chargés sur les molécules du CMH de classe I grâce à la calréticuline et à la calnexine (Ackerman and Cresswell, 2004; Guermonprez et al., 2003; Heath et al., 2004). La présentation croisée permet aux cellules dendritiques d'induire une réponse immunitaire cytotoxique contre un virus ou un parasite sans que ces cellules ne soient infectées (Guermonprez and Amigorena, 2005).

6.3 Migration des cellules dendritiques

La fonctionnalité des DC est fortement influencée par leur localisation ainsi que par leur capacité migratoire. Les DC tissulaires, comme celles de la peau, doivent d'abord se détacher de la matrice extracellulaire avant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Ce processus est régulé par l'expression par les DC de la peau de métalloprotéases matricielles, MMP-9 et MMP-2 entre autres (Ratzinger et al., 2002). La migration des DC en général est dictée en majorité par les chimiokines. Il s'agit de molécules de petite taille impliquées dans le chimiotactisme des leucocytes. Elles déterminent le type de cellules devant traverser l'endothélium et l'endroit où elles doivent se situer dans le tissu. Les chimiokines agissent par l'intermédiaire de récepteurs qui sont des protéines à sept domaines transmembranaires et associés aux petites protéines G qui mènent à la signalisation intracellulaire (McColl, 2002). Différents récepteurs de chimiokines sont impliqués dans les stades de la vie d'une cellule dendritique et les changements d'expression de ces récepteurs gouvernent la capacité migratoire des DC. Par exemple, le CCR5 semble permettre le recrutement des cellules dendritiques sur le site d'inflammation *via* les chimiokines CCL3 ou MIP-1α (Aliberti et al., 2000; Sallusto et al., 1998) et le CCR6 apparaît comme important dans le positionnement des DC à la surface des épithélia (Cook et al., 2000; Vanbervliet et al., 2002). Pendant la maturation des cellules dendritiques, l'expression des récepteurs de chimiokines est modifiée avec la diminution d'expression de CCR5 et l'acquisition de l'expression de CCR7, molécule clé de la migration des DC matures. Cette modification entraîne une attraction de ces cellules vers les organes lymphoïdes secondaires où les ligands CCL21 et CCL19 sont exprimés (Dieu et al., 1998; Lukacs-Kornek et al., 2008; Sozzani, 2005).

II. LES LYMPHOCYTES T

Les lymphocytes T proviennent de la moelle osseuse (MO) chez l'adulte et du foie fœtal (FF) chez l'embryon. Un progéniteur T va quitter la moelle osseuse ou le foie fœtal pour migrer vers le thymus et effectuer sa différenciation. C'est au cours de leur développement intrathymique que les lymphocytes T acquièrent la capacité à reconnaître une grande variété d'antigènes associés aux molécules d'histocompatibilité du Soi. Cette propriété est d'une part liée à l'acquisition de structures glycoprotéiques appelés récepteurs des cellules T (TCR), dont la biosynthèse s'opère à un stade précoce du développement intrathymique. D'autre part, elle est la conséquence de processus sélectifs intrathymiques, qui favoriseront l'émergence de lymphocytes capables de reconnaître les produits d'histocompatibilité du Soi tout en prévenant la production de thymocytes autoréactifs.

1. Les différentes sous-populations de lymphocytes T

Chez l'homme, dans la circulation sanguine, les lymphocytes T matures peuvent être subdivisés en deux sous populations principales, différant par leur phénotype, la nature des Ag reconnus et leur rôle au cours des réponses immunes.

Les lymphocytes T dits "classiques", qui constituent la grande majorité (> 90 %) des lymphocytes T périphériques, reconnaissent des Ag oligopeptidiques associés aux molécules d'histocompatibilité de classe I et II polymorphiques. Leurs récepteurs T, qui sont constitués de sous unités alpha et beta, sont systématiquement coexprimés avec des corécepteurs, CD4 ou CD8. Il existe une très faible proportion de lymphocytes T double-négative $CD4^-CD8^-$. Les lymphocytes T $CD4^+$, reconnaissant les molécules du CMH de classe II, sont des cellules dites auxiliaires ou T « helper » (Th) permettant le développement de la réponse immunitaire à la fois cytotoxique T et humorale B et modulent aussi l'activité des phagocytes par leur production de cytokines.

Les lymphocytes T $CD8^+$ sont des cellules qui possèdent essentiellement une activité cytotoxique (CTL). Ces cellules sont capables de détruire des cellules infectées ou tumorales qui expriment des peptides associés aux molécules du CMH de classe I.

En outre, ces cellules étant fréquemment alloréactives, ce sont les effecteurs principaux des réactions de rejet d'allogreffes.

Les lymphocytes T dits "non classiques", de découverte plus récente, semblent dirigés contre un univers plus vaste d'Ag, de nature peptidique, saccharidique ou glycolipidique, reconnaissables selon les cas sous forme native ou associée à des produits d'histocompatibilité peu polymorphiques (molécules CMH de classe Ib, CD1...). Ils sont très généralement dépourvus de co-récepteurs CD4/CD8, et expriment des récepteurs T constitués de sous-unités gamma et delta. Ces cellules semblent avoir une fonction protectrice lors des réponses primaires antibactériennes et pourraient jouer un rôle régulateur négatif important dans la plupart des réponses secondaires.

2. L'activation du lymphocyte T

Le processus d'activation des lymphocytes T a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires où se trouvent les cellules dendritiques matures qui vont présenter le complexe CMH/peptide aux lymphocytes T naïfs. La première rencontre des cellules T avec les cellules présentatrices d'antigène est une liaison non spécifique assurée par des molécules d'adhérence. Cette interaction transitoire permet à la cellule T d'entrer en contact avec un grand nombre de combinaisons CMH/peptides différentes sur différentes CPA. En l'absence d'interaction spécifique, les cellules se dissocient rapidement. En revanche, lorsque l'interaction est spécifique, une réponse immune est déclenchée par l'intégration de 3 signaux d'activation lymphocytaire que nous allons développer. L'initiation de l'activation lymphocytaire par le signal 1 correspond à l'engagement du TCR (T Cell Receptor) par un complexe CMH/peptide approprié. Le signal 2 dit « signal de co-stimulation » est médié par les molécules de co-stimulation et leurs ligands exprimés à la surface des DC et des cellules T. Enfin, le $3^{ème}$ signal est caractérisé par la libération de cytokines qui vont achever l'activation du LT et déterminer l'orientation de la réponse immunitaire.

Le signal 1, s'il est le seul activé, aboutit à l'apoptose ou mort cellulaire programmée des lymphocytes T, mécanisme susceptible d'induire l'anergie (Watts and DeBenedette, 1999).

2.1 Le récepteur des cellules T : TCR

La reconnaissance d'un antigène spécifique par le lymphocyte T est assurée par le récepteur des cellules T ou TCR (T Cell Receptor) qui est un hétérodimère formé par l'association de deux chaînes transmembranaires polypeptidiques α et β ou γ et δ. Ces glycoprotéines de type I appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Chaque chaîne est composée d'un domaine extracellulaire amino-terminal contenant une région variable (V), une région constante (C) ainsi qu'une région charnière. On retrouve également un domaine transmembranaire hydrophobe composé de 5 à 12 acides aminés (favorisant la stabilité du complexe TCR/CD3) ainsi qu'un court domaine cytoplasmique. L'association des deux chaînes α et β se fait par l'intermédiaire d'un pont di-sulfure (Meuer et al., 1984). L'ensemble des régions variables (Vα et Vβ) ainsi réunies forme le site de reconnaissance à l'antigène. Chaque région variable possède trois régions hypervariables appelées CDR (« Complementary Determining Region ») (Chothia et al., 1988) par homologie aux CDR identifiés sur les régions variables des immunoglobulines. Les régions CDR1 et CDR2 permettent la liaison aux molécules de CMH, le CDR3 se liant préférentiellement au peptide antigénique (Jorgensen et al., 1992; Sant'Angelo et al., 1996).

Les chaînes αβ polymorphes sont associées à un complexe polypeptidique non polymorphique, le complexe CD3 (constitué des chaînes γ, ε, δ, et ζ) qui permet la transduction du signal. A l'exception du domaine CD3ζ, toutes les sous-unités CD3 possèdent une portion transmembranaire qui va permettre l'association avec le TCR et surtout favoriser la stabilité du complexe CD3/TCR (Koning et al., 1990; Manolios et al., 1991). En réponse à l'engagement du TCR par le complexe CMH/peptide, les portions cytoplasmiques des molécules CD3 permettent l'initiation de la signalisation grâce à leurs motifs ITAM (« Immunoreceptor tyrosines-based activation motifs »).

La diversité du répertoire TCR exprimé sur les lymphocytes T est considérable par association des séquences VDJ (en effet il y a de très nombreuses séquences V, D et J et les associations sont aléatoires ce qui permet d'obtenir une grande possibilité de combinaisons différentes). Les associations des chaînes α et β se font aussi de manière aléatoire ce qui fait que le potentiel de reconnaissance est de l'ordre de 10^{15} spécificités différentes. Cependant la diversité existante en périphérie est très inférieure.

Le complexe TCR/CD3 est également associé, pour la majorité des lymphocytes αβ, à des molécules invariantes CD4 ou CD8 qui interagissent avec les molécules CMH de classe II ou de classe I respectivement, et participent à la transduction du signal activateur par CD3.

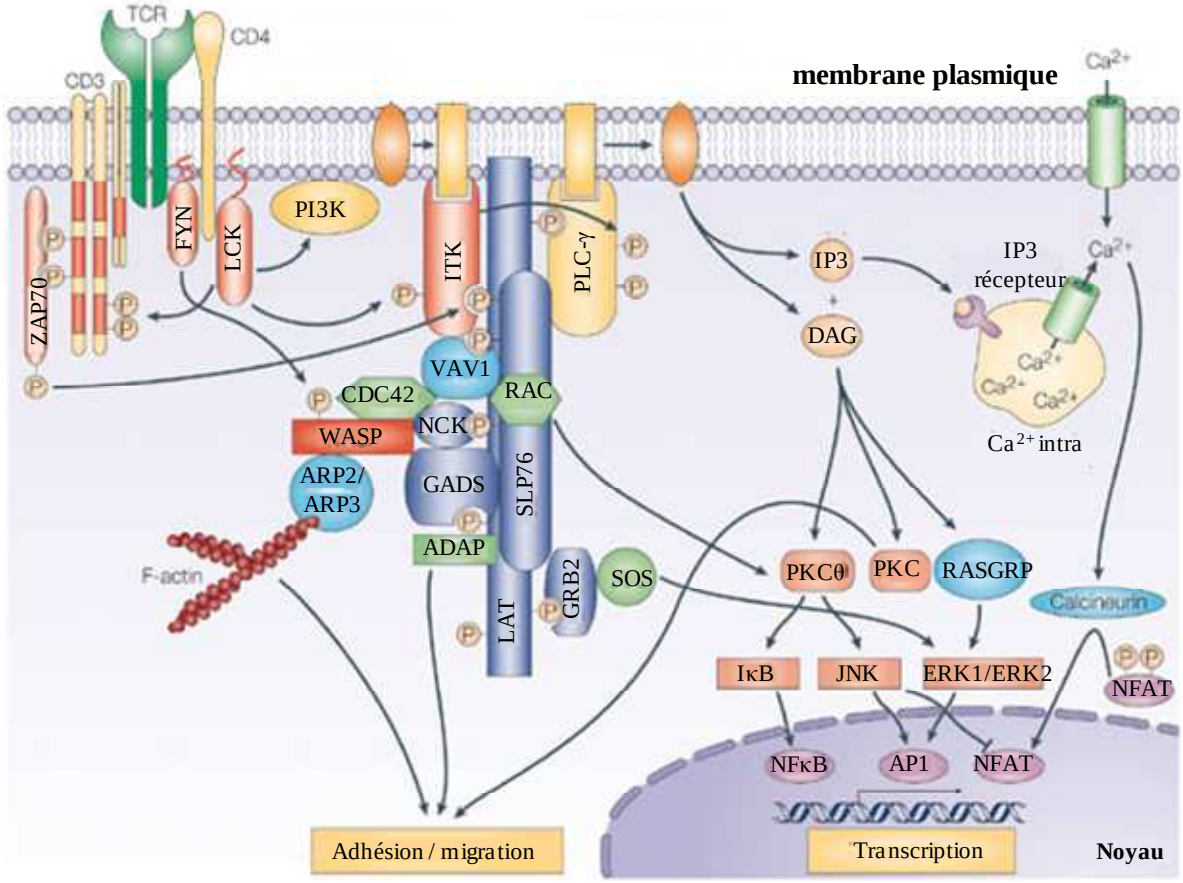


Figure 5 : Voies de signalisation impliquées dans l'activation du lymphocyte T (d'après Schwartzberg *et al.*, Nature Review Immunol 2005)

Le signal 1 d'engagement du récepteur T entraîne son activation et son association par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, de tyrosine-kinases intracellulaires telles que p59 fyn et p56 lck ou encore la phosphorylation de ZAP 70 (« Zeta chain Associated Protein Kinase ») *via* les domaines ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) **(Figure 5**). Cela induit, par l'intermédiaire d'une phopholipase Cγ 1 (PLCγ1), une hydrolyse des phospho-inositides membranaires (PIP-2) et la libération d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycerol (DAG). La fixation d'IP3 sur son récepteur permet de réguler le taux de calcium intracellulaire et d'activer des enzymes dépendants du calcium, comme la calcineurine. La calcineurine activée permet la déphosphorylation d'un facteur de transcription : le NF-AT (« Nuclear Factor of Activated T cells »). Le NF-AT déphosphorylé peut, en association avec la calcineurine, migrer du cytoplasme vers le noyau pour se fixer sur des séquences régulatrices de gènes et induire la synthèse de cytokines comme l'IL-2. Par ailleurs, le DAG formé lors de l'activation du récepteur T active une protéine kinase C (PKC)

qui dissocie le complexe cytoplasmique formé de NF-κB et de son inhibiteur IκB en phosphorylant et dégradant IκB. NF-κB peut alors migrer dans le noyau pour se fixer sur les séquences activant les promoteurs de gènes.

2.2 Les molécules de co-stimulation

Le 2ème signal que le lymphocyte T reçoit de la cellule dendritique est transmis par l'interaction des molécules de co-stimulation avec leurs ligands. On retrouve des molécules qui vont initier soit un signal activateur pour la cellule T soit un signal inhibiteur qui va bloquer l'activation du lymphocyte T et même dans certains cas, induire son anergie ou son apoptose (**Figure 6**).

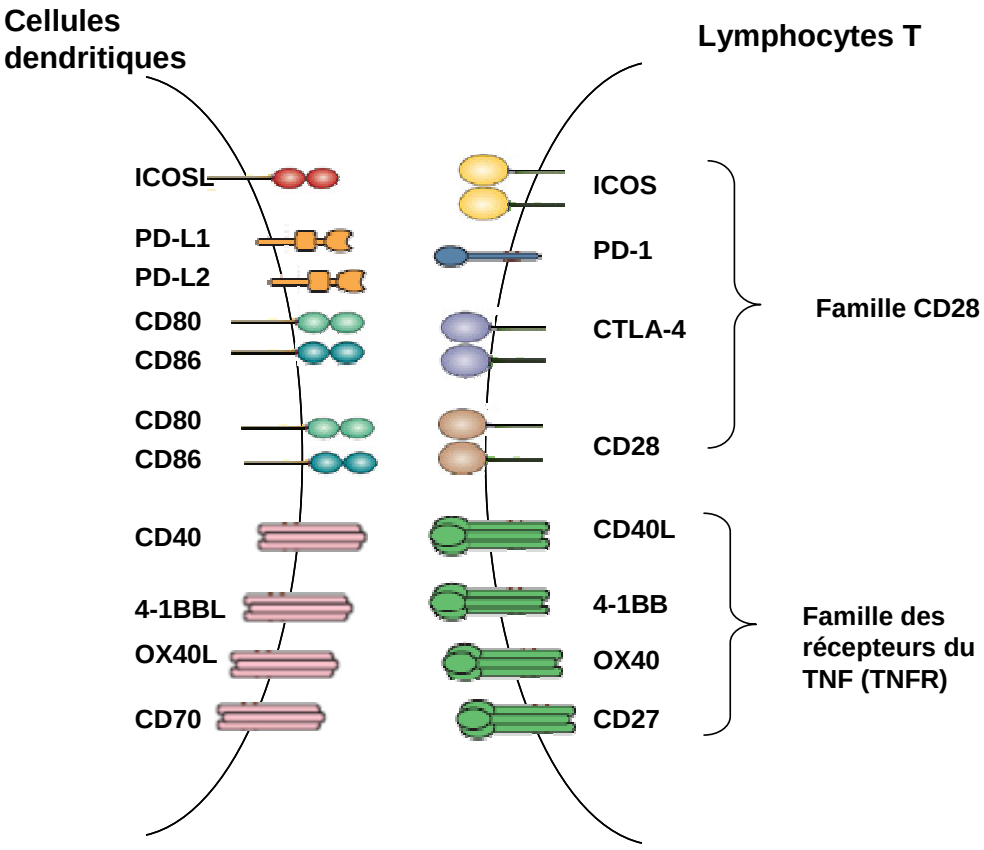


Figure 6: Expression des molécules de co-stimulation de la famille B7-CD28 et TNF-TNFR par les cellules dendritiques et les lymphocytes T

2.2.1 Les molécules de co-stimulation "activatrices"

CD80 et CD86 / CD28 :

Les molécules CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) sont des hétérodimères de la superfamille des immunoglobulines qui sont retrouvées principalement à la surface des CPA. Ces ligands interagissent avec la molécule CD28 exprimée constitutivement par le lymphocyte T. En association avec le « signal 1 », cette liaison induit une forte sécrétion d'IL-2 ainsi qu'une expression élevée de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) par les lymphocytes T nécessaires à leur prolifération. Le niveau d'expression des molécules B7 est différent selon l'état d'activation de la DC. En effet, une cellule dendritique immature exprime le B7-2 dont l'expression est rapidement augmentée avec la maturation de ces cellules alors que l'expression de B7-1 est inductible et plus tardive (McAdam et al., 1998). Il est à noter que l'affinité de B7.1 pour CD28 est supérieure à celle de B7.2 (Bour-Jordan and Blueston, 2002). La voie B7/CD28 est la voie la mieux caractérisée et l'une des plus importantes pour l'activation T.

CD40 / CD40L :

Le CD40 (TNFR-SF5) est exprimé de façon constitutive sur de nombreuses CPA telles que les lymphocytes B, les monocytes, les DC et les cellules endothéliales (Quezada et al., 2004) alors que son ligand CD40L (CD154) qui appartient à la famille du TNF est exprimé sur les lymphocytes T activés. Ces molécules interagissent sous forme de trimères. L'interaction entre CD40 et son ligand joue un rôle majeur dans l'activation / maturation de la DC et augmente l'activation des LT uniquement par une boucle de rétro-contrôle positive qui rend les CPA meilleures stimulatrices via l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80/ CD86 et de leur synthèse d'IL-12 (Quezada et al., 2004).

CD54 (ICAM1) / LFA-1 (CD18/ CD11a) :

L'interaction de l'intégrine LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) exprimée par les LT avec son ligand CD54 exprimé par les DC est un puissant activateur des

lymphocytes T. Toutefois, il n'est pas suffisant pour induire à lui seul un « signal 2 » (Watts and DeBenedette, 1999). Le couple LFA-1/ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) semble activer plus efficacement les lymphocytes T mémoires (CD45RO) que les lymphocytes T naïfs (CD45RA) (Mondino and Jenkins, 1994).

Ox40L / Ox40 :

Ox40L, molécule de la superfamille des récepteurs au TNF, se fixe à la molécule OX40 exprimée par le lymphocyte T (Ohshima et al., 1997). L'engagement d'Ox40 permet une expansion clonale T avec une augmentation des fonctions effectrices des cellules mémoires surtout au niveau des sites inflammatoires. Le système interviendrait aussi bien dans la réponse primaire que dans la réponse secondaire (Gramaglia et al., 2000; Murata et al., 2000).

CD70 / CD27 :

La molécule CD70, appartenant à la famille du TNF, est exprimée par les cellules dendritiques humaines matures (Krause et al., 2009). Elle se fixe à son ligand CD27 qui est exprimé par les cellules T et B (Goodwin et al., 1993). Cette interaction joue un rôle important lors de la phase de « priming » des lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ (Borst et al., 2005). Cette liaison semble surtout participer à l'expansion et à l'activation des lymphocytes $CD8^+$ (Schildknecht et al., 2007; Taraban et al., 2004; Watts and DeBenedette, 1999; Yamada et al., 2005) et permet le développement d'une réponse T $CD8^+$ cytotoxique indépendante de la présence de lymphocytes T CD4+ auxiliaires (Bullock and Yagita, 2005).

4-1BBL / 4-1BB (CD137) :

4-1BB est une molécule exprimée par les lymphocytes T activés qui se lie à 4-1BBL qui est exprimé par les CPA (DeBenedette et al., 1997; Krause et al., 2009). Son engagement avec son ligand 4-1BBL induit une forte sécrétion d'IL-2 de façon aussi efficace que CD28 lorsque le signal donné au TCR est suffisamment important (Saoulli et al., 1998). Cette interaction est plus importante pour la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ que celle des $CD4^+$ (Harrison et al., 2006; Zhang et al., 2007). Cette voie semble donc plutôt jouer sur la phase d'activation tardive des lymphocytes lorsque le signal induit par CD28 commence à

décliner afin de maintenir l'activation (Habib-Agahi et al., 2009; Watts and DeBenedette, 1999).

ICOSL / ICOS :

ICOS « Inducible CO-Stimulator » appartient à la famille du CD28 mais n'est pas exprimé de façon constitutive sur les lymphocytes T activés. Il est au contraire rapidement induit après engagement du TCR (Coyle et al., 2000; Yoshinaga et al., 1999). Le ligand d'ICOS, ICOSL est exprimé sur les cellules B, les macrophages, les cellules dendritiques et les tissus non lymphoïdes (Greenwald et al., 2005). La co-stimulation ICOS augmente l'activation et la production de cytokines par les cellules T comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 mais pas l'IL-2 (Riley et al., 2002). Par contre, cette voie ne permet pas de prolonger la survie des cellules (Riley and June, 2005). Ainsi, ICOS stimule les fonctions effectrices mémoires des lymphocytes T mais ne serait pas impliqué dans la phase d'initiation de la réponse immune (Riley and June, 2005).

CD58 / CD2 :

La molécule CD58 (LFA-3 : leukocyte function-associated molecule 3) se lie à son ligand CD2. Ce dernier appartient à la superfamille des immunoglobulines et est exprimé par le lymphocyte T (Bierer et al., 1988). L'interaction CD58/CD2 participe essentiellement à l'adhésion des lymphocytes T mais peut aussi augmenter l'activation des lymphocytes T en association avec la voie CD28/B7 (Parra et al., 1994).

2.2.2 Les molécules de co-stimulation "inhibitrices"

Nous savons également que les cellules dendritiques sont aussi capables d'induire des signaux d'inhibition de l'activation des lymphocytes T régulant ainsi la réponse effectrice T.

CD80 et CD86 / CTLA-4 :

CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) est un membre de la famille CD28 dont l'expression est induite par l'activation des lymphocytes T. Il possède les mêmes ligands que

CD28 à savoir CD80 et CD86 mais avec une affinité 10 à 20 fois supérieure que celle de son homologue CD28 (Greenwald et al., 2005). L'engagement de CTLA-4 avec les molécules B7 induit des fonctions inhibitrices (Riley and June, 2005). En effet, la partie intracytoplasmique de CTLA-4 permet de lier deux protéases SHP-2 (Src homology 2 domain–containing protein tyrosine Phosphatase) et PP2A (Protein phosphatase 2A). Ces enzymes pourraient ainsi réguler l'activation des kinases cytosoliques induite lors de l'activation du complexe TCR/CD3 (Lee et al., 1998; Riley and June, 2005). De plus, cette voie semble inhiber la formation des radeaux lipidiques et induire la production de TGF-β (Riley and June, 2005). Ainsi, CTLA-4 joue un rôle majeur dans l'induction de l'anergie et participe au maintien de la tolérance périphérique (Bhatia et al., 2006; Kurtz et al., 2009).

PD-L1 et PD-L2 / PD-1 :

PD-1 (Program Death-1) est une protéine membranaire majoritairement exprimée par les LT et les LB activés mais elle peut également être présente sur les monocytes et les cellules NK activés (Sharpe and Freeman, 2002). Des études *in vitro* ont montré que PD-1 inhibait l'activation lymphocytaire et la production de cytokines (notamment l'IFN-γ) après engagement avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 principalement exprimés par les CPA (Buckland et al., 2006; Latchman et al., 2001). Cette propriété semble due aux motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) présents dans la queue cytoplasmique de ce récepteur. Par ailleurs, le blocage de la voie PD-1/PD-L1 dans différents modèles de greffes (moelle osseuse, cœur) accélère le rejet chronique et supprime la tolérance périphérique induite par les LT régulateurs (Tanaka et al., 2007). Il apparaît donc que la voie PD-1 / PD-L1 joue un rôle dans l'induction et le maintien de la tolérance (Habicht et al., 2007; Tanaka et al., 2007; Yang et al., 2008).

B7H3 :

Cette molécule est exprimée par les DC immatures et matures (Chapoval et al., 2001; Zhang et al., 2005). Son récepteur reste inconnu mais il serait inductible sur les lymphocytes T activés. Le rôle de B7-H3 reste controversé. B7-H3 semble principalement induire un signal d'activation inhibiteur. En effet, cette voie peut bloquer la prolifération lymphocytaire et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10, le TNF-α et l'IFN-γ (Ling et al., 2003; Prasad et al.,

2004; Suh et al., 2003). Toutefois, B7-H3 est aussi décrit comme étant un inducteur de signal positif d'activation en induisant la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi qu'en stimulant la sécrétion d'IFN-γ (Chapoval et al., 2001). Une hypothèse permettant d'expliquer les fonctions, à la fois stimulatrices et inhibitrices de B7-H3, serait que B7-H3 ait deux récepteurs distincts aux propriétés similaires à CD28 et CTLA-4.

B7H4 :

C'est un régulateur négatif de la réponse T exprimé par les cellules dendritiques matures. Son récepteur reste encore à identifier (Greenwald et al., 2005). B7H4 inhibe la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ en arrêtant le cycle cellulaire en phase G_0/G_1 (Prasad et al., 2003; Sica et al., 2003; Zang et al., 2003). De plus, cette liaison réduit la synthèse d'IL-2 ainsi que l'activité cytotoxique des $CD8^+$ (Greenwald et al., 2005).

BTLA4 :

BTLA4 («B and T Lymphocyte Attenuator 4») est une molécule exprimée par les lymphocytes T et les cellules NKT qui semble inhiber spécifiquement les réponses inflammatoires précoces (Miller et al., 2009). Il possède 2 domaines ITIM dans sa région intracellulaire dont la phosphorylation des tyrosines permet le recrutement des phosphatases inhibitrices SHP-1 et SHP-2 (Watanabe et al., 2003). De plus, l'engagement du récepteur BTLA4 par son ligand HVEM (HerpesVirus Entry Mediator) semble primordial dans la régulation négative des réponses immunitaires précoces de l'hôte contre les bactéries intracellulaires (Sun et al., 2009). Ainsi, les souris $BTLA^{-/-}$ et $HVEM^{-/-}$ sont plus résistantes à la listériose que les souris de type sauvage. Une étude récente a également démontré que les cellules mononuclées du foie de souris déficientes en BTLA4 sécrétaient des quantités élevées de TNF-α, IFN-γ, IL-2 et IL-4 (Miller et al., 2009).

2.3 La synapse immunologique

Après la migration des DC présentant le peptide antigénique *via* leur CMH dans les zones T des tissus lymphoïdes, la transmission d'informations avec les lymphocytes T s'effectue au sein d'une zone d'interaction stable nommée synapse immunologique constituée

notamment des différentes molécules dont nous venons de parler (**Figure 7**). Un complexe supramoléculaire d'activation SMAC (« SupraMolecular Activation Cluster ») se forme alors au niveau de radeaux lipidiques (micro-domaine lipidique riche en cholestérol et glycosphingolipides) formés dans la membrane plasmique favorisant l'échange de signaux. Le premier contact non spécifique entre un lymphocyte T et une CPA s'effectue par l'intermédiaire des molécules d'adhérence comme les interactions entre ICAM-1 et LFA-3 à la surface des CPA et leur ligands LFA-1 et CD2 respectivement (**Figure 7**). Initialement, les molécules CMH et TCR sont plutôt externes et accompagnées de plusieurs protéines (CD43, CD45, ICAM-1). L'engagement du TCR provoque de petits agrégats et une redistribution des protéines membranaires : TCR et CMH étant alors entourés d'un anneau riche en intégrines et ICAM-1, CD43, CD45 se trouvant en périphérie (Johnson et al., 2000; Sperling et al., 1998). LFA-1 joue un rôle très important dans le rassemblement des TCR avec SMAC ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette lymphocytaire et l'exclusion de la molécule CD45 de la synapse centrale (Graf et al., 2007). La synapse immunologique n'est pas nécessaire à la transduction de signaux car la phosphorylation de lck et de ZAP70 précède la formation d'une synapse mature mais la polymérisation de l'actine dans le lymphocyte T (par activation de ZAP-70) est nécessaire pour former la synapse.

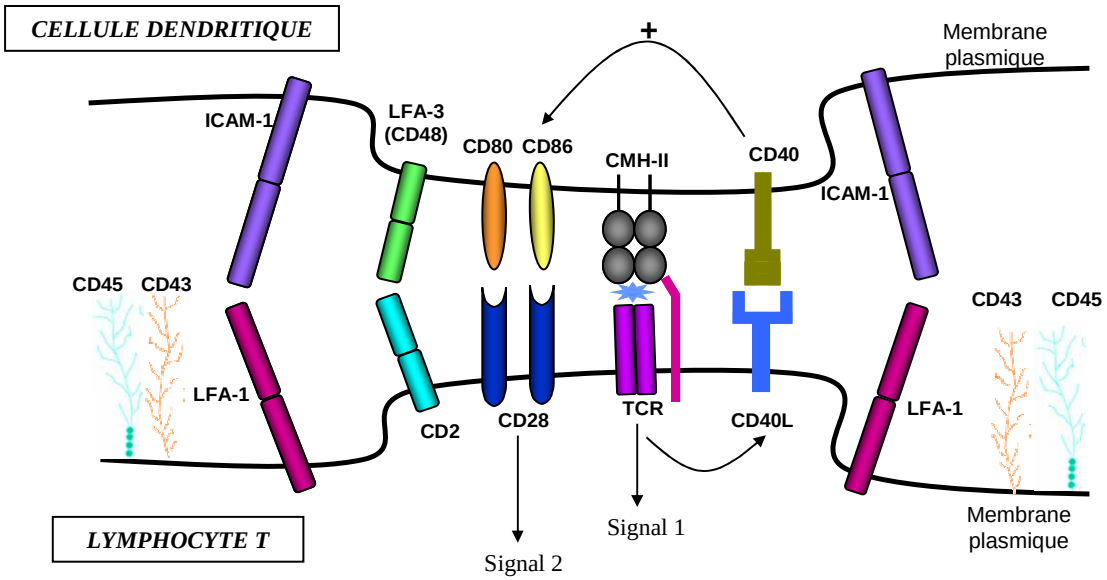


Figure 7: Molécules impliquées dans la synapse immunologique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T

3. Orientation de la réponse immune

Le système immunitaire est constamment sollicité par différents types de pathogènes tels que les virus, les bactéries ou encore les parasites et a ainsi mis en place un éventail de mécanismes contrôlés par les cellules effectrices. Selon les signaux issus de l'environnement et le type de pathogène impliqué, une réponse immunitaire appropriée sera déclenchée faisant intervenir principalement les lymphocytes T CD4$^+$. Ceux-ci peuvent être différenciés en 4 sous-types distincts au minimum, caractérisés chacun par un profil de sécrétion particulier responsable de leurs fonctions spécifiques (**Figure 8**).

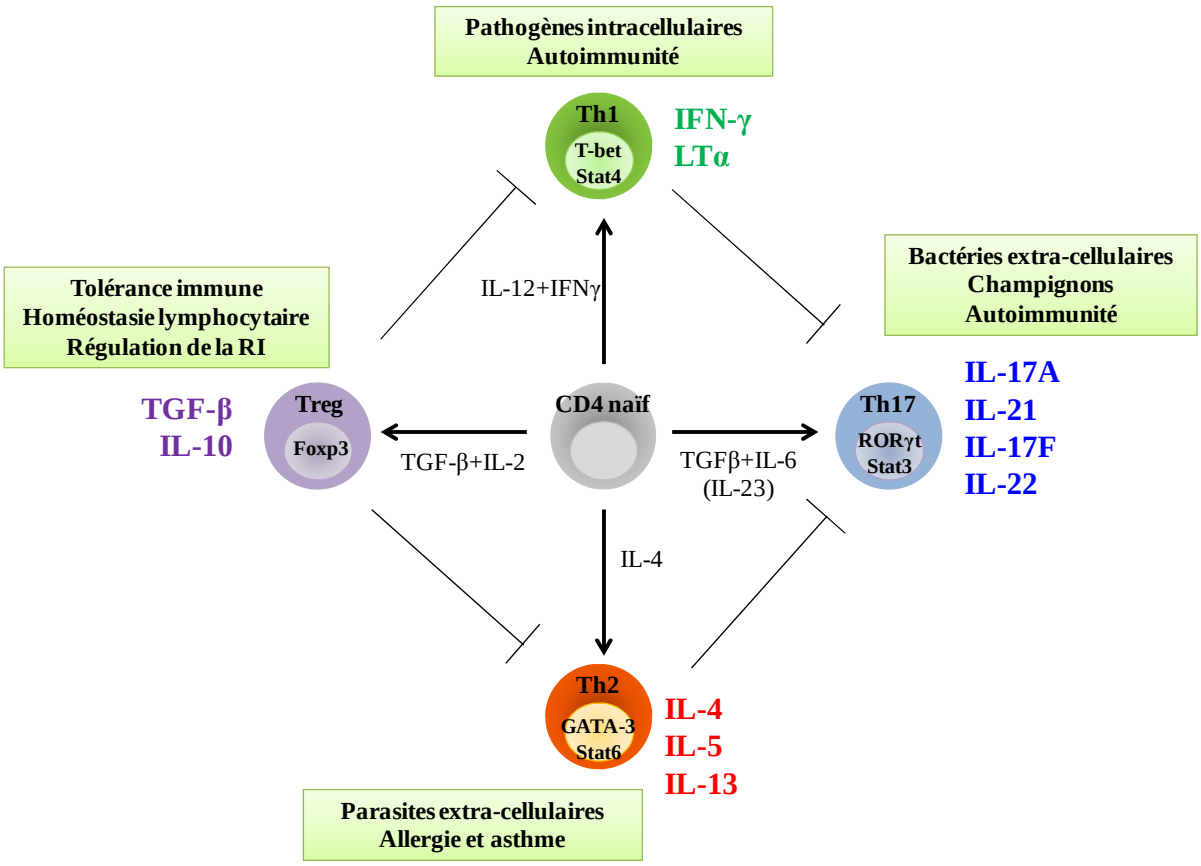


Figure 8: Orientation de la réponse immune T CD4$^+$

En 1986, Robert Coffman et Timothy Mossman décrivent pour la première fois la division des lymphocytes T CD4$^+$ en différentes sous-populations fonctionnelles appelées Th1 et Th2 (Mosmann and Coffman, 1989). Les mécanismes qui les régulent sont maintenant bien

connus mais depuis, de nombreuses études ont mis en évidence d'autres sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$ comme les cellules T régulatrices (Treg), les cellules Th17, les cellules T folliculaires auxiliaires (T_{FH}) et plus récemment les cellules Th22 et les cellules Th9.

3.1 La réponse Th1

En général, les cellules dendritiques induisent une réponse de type Th1 envers des pathogènes intracellulaires comme des bactéries, des virus ou des parasites intracellulaires. Dans ce cas, elles sécrètent des cytokines de la famille de l'IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27), de l'IL-18 et des interférons de type I (IFN-α, IFN-β) (de Jong et al., 2005). Les lymphocytes Th1 expriment le facteur de transcription T-bet, ce qui leur fait produire des quantités importantes d'IFN-γ ; cette cytokine va activer les macrophages et les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques qui vont ensuite pouvoir détruire les cellules infectées. Le LPS de *Escherichia coli*, le peptidoglycane des bactéries $Gram^+$ et l'ARN double brin viral par exemple sont des inducteurs de réponse Th1 (Kadowaki, 2007).

3.2 La réponse Th2

En revanche, dans le cas d'une infection par des parasites extracellulaires comme les helminthes ou en réponse à un allergène comme Derp1 (acariens) par exemple, les cellules dendritiques vont produire de l'IL-4 et/ou la chimiokine MCP-1 pour induire une réponse de type Th2. L'interaction Ox40/Ox40L semble également contribuer au développement d'une réponse Th2 (de Jong et al., 2005). Les lymphocytes Th2 expriment le facteur de transcription GATA-3 et vont sécréter de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, ce qui va promouvoir la production d'IgE et ainsi activer les mastocytes et les éosinophiles pour éradiquer les micro-organismes extracellulaires (Kadowaki, 2007). Les cellules Th2 vont également soutenir la réponse immune humorale dont l'effecteur principal est le lymphocyte B.

3.3 La réponse Th17

Une autre population de lymphocytes T auxiliaires a récemment été décrite : les lymphocytes Th17. Ces lymphocytes produisent de l'IL-17 et semblent intervenir dans la régulation des réponses inflammatoires (Dong, 2008) et dans les réponses immunes envers les bactéries extracellulaires (Kadowaki, 2007; Weaver et al., 2007). Ils sembleraient également

impliqués dans les maladies auto-immunes étant donné qu'une surexpression d'IL-17 a été décrite chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, de lupus ou de sclérose en plaques. Les lymphocytes Th17 expriment le facteur de transcription RORγt (Ivanov et al., 2006) et STAT3 est le transducteur de signal principal pour l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 (Harris et al., 2007; Mathur et al., 2007).

3.4 La réponse T régulatrice

Etant donné l'importance de ces cellules dans la tolérance immunitaire notamment aux allogreffes, nous avons développé un chapitre dans lequel nous détaillons leurs caractéristiques (chapitre p71).

3.5 Plasticité des sous-populations de cellules T

Il est maintenant clair que l'orientation d'une cellule T vers un phénotype T spécifique dépend d'un certain nombre de signaux reçus par la cellule T effectrice. Certaines sous-populations de cellules T ne sont pas toujours stables et peuvent modifier leur programme de sécrétion cytokinique en fonction du signal perçu. Toutefois, il reste à déterminer si les lymphocytes T effecteurs peuvent changer d'orientation à partir de n'importe quel point de départ.

Il existe ainsi de nombreux exemples décrivant la flexibilité des cellules T en terme de production de cytokines (Lee et al., 2009; Zhou et al., 2009a; Zhou et al., 2009b). Le meilleur exemple est sans doute la cytokine IL-10. Initialement décrite comme étant une cytokine de type Th2, on sait désormais que les Th1, Th17 et Trég produisent également de l'IL-10. De plus, les Trég exprimant Foxp3 peuvent produire de l'IL-17, exprimer le facteur de transcription Tbet associé au type Th1 ou encore sécréter de l'IFN-γ (Koch et al., 2009; Wei et al., 2009; Xu et al., 2007). Certaines études ont également mis en évidence l'existence *in vivo* de cellules IL-17^+ / IFN-γ^+ mais aussi de cellules Th17 s'orientant vers des cellules Th1 (Shi et al., 2008).

A l'inverse, des cellules T_{FH} peuvent exprimer Foxp3 et des lymphocytes de type Th2 produisant de l'IL-4 peuvent devenir des cellules T_{FH}.

A ce jour, on sait que les cellules Th17 peuvent être converties en cellules Th1 mais que la réciproque n'est pas vraie (Bending et al., 2009; Lee et al., 2009). On sait aussi que les

Th17 peuvent produire de l'IL-22 mais qu'il existe aussi des cellules de type Th22 qui ne produisent pas d'IL-17 (Duhen et al., 2009; Trifari et al., 2009).

Les cellules Th2 peuvent se transformer en cellules produisant de l'IL-9 plus facilement qu'en cellules Th1 (Veldhoen et al., 2008). Cette étude a permis d'établir que les cellules de type Th9 étaient donc issues de lymphocytes Th2 après reprogrammation via l'action de l'IL-4 et du TGF-β (Veldhoen et al., 2008). Pour le moment, bien que les cellules Th9 ne produisent pas d'IL-4, elles sont néanmoins associées à des réponses de type Th2 i.e. la réponse immune spécifique anti-helminthe ou l'allergie (Dardalhon et al., 2008).

D'autres études ont également récemment mis en évidence que les Treg $Foxp3^+$ peuvent perdre l'expression de ce marqueur et acquérir un phénotype T mémoire effecteur (Komatsu et al., 2009; Zhou et al., 2009a; Zhou et al., 2009b), produire de l'IFN-γ dans certains cas, provoquer une destruction rapide des cellules pancréatiques et induire des diabètes (Zhou et al., 2009b). Chez l'homme, une sous-population de Treg activés a été identifiée comme exprimant faiblement Foxp3, ayant perdu leur activité suppressive et produisant de l'IL-17 (Miyara et al., 2009). Cette sous-population semble augmentée lors de maladies auto-immunes par exemple en cas de lupus érythémateux systémique.

Les différentes sous-populations de lymphocytes T sont corrélées de manière arbitraire à la synthèse de leurs cytokines, à l'expression de leurs facteurs de transcription et dans certains cas à celle de leurs récepteurs de chimiokines. Les populations lymphocytaires T sont définies de façon inflexible par l'expression du CD4 ou CD8 ou par la présence des TCR αβ ou γδ durant l'ontogénèse dans le thymus. A l'inverse, l'expression de certains gènes codant pour les cytokines ou les récepteurs de chimiokines sont plus flexibles. Les cellules les plus plastiques semblent être les T_{FH} (T follicular helper), une sous-population de cellules T effectrices qui fournit le « help » aux cellules B et qui permet le switch des classes d'Ac dans les centres germinaux. Ces cellules sont principalement définies par leur localisation folliculaire qui est médiée par le récepteur CXCR5. La plasticité des cellules pourrait simplement être due à un changement du comportement de domiciliation des cellules Th1, Th2 ou Th17 via l'expression de CXCR5. Ces populations expriment normalement le CCR5 et le CCR6 qui facilitent le « homing » dans les tissus et non dans les follicules. Ces études récentes démontrent clairement un modèle dans lequel les cellules de type Th2 peuvent se transformer en cellules T_{FH} exprimant le CXCR5. Ces études montrent que lors d'une infection à helminthe, la majorité des cellules $CD4^+$ synthétisant de l'IL-4 exprime également

les différents marqueurs caractéristiques des T_{FH} tels que le CXCR5, PD-1, ICOS BCL6 (B Cell Lymphoma 6) ou encore l'IL-21 et est localisée dans les follicules des cellules B (King and Mohrs, 2009; Reinhardt et al., 2009; Zaretsky et al., 2009). Toutefois, elles expriment également GATA3 qui est le principal facteur de transcription des cellules Th2. Une autre étude a suggéré que des Treg $Foxp3^+$ pouvaient se différencier en cellules de type T_{FH} dans les plaques de Peyer murines et promouvoir la productiond'IgA (Tsuji et al., 2009).

III. IMMUNOLOGIE DE GREFFE

La transplantation d'organe allogénique est trop récente (une soixantaine d'années) pour que le système immunitaire ait développé un autre système de défense que celui déjà en place pour lutter contre les infections déjà présentes. Nous avons vu précédemment que la réponse immune adaptative implique que les cellules présentatrices d'antigènes, en particulier les cellules dendritiques, signalent la présence d'invasion par des pathogènes aux lymphocytes T capables de recevoir ce signal, engendrant ainsi une réponse immune efficace. Au centre de ce dialogue entre la CPA et la cellule T, il y a les molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité que nous avons vues dans la figure 7. Le degré élevé de polymorphisme de ces molécules au sein d'une espèce et le nombre conséquent de gènes exprimés (au moins 12 par cellule) entraîne un nombre très élevé de combinaisons. Ceci explique le fait que l'identité du MHC entre deux individus soit un phénomène très rare dans l'espèce humaine.

L'alloreconnaissance, base de l'alloréactivité réfère au phénomène par lequel le système immunitaire reconnaît les antigènes du donneur d'organe. La réponse immune du receveur contre l'allogreffe a pour cible principale les antigènes du CMH du donneur.

L'alloréactivité présente 3 caractéristiques par rapport à la réponse immune induite par des antigènes conventionnels : aucune présensibilisation n'est nécessaire pour observer la réponse, la réponse est puissante *in vivo* et *in vitro* en raison d'une grande fréquence des précurseurs et enfin la reconnaissance peut se faire sans restriction au CMH du soi. La reconnaissance de ces antigènes est l'événement primaire qui conduit au rejet de l'allogreffe. Le rejet de greffe peut être classé cliniquement en distinguant le rejet hyperaigu, le rejet aigu et le rejet chronique. Encore aujourd'hui, malgré les progrès dans le domaine de l'immunosuppression, de nombreux organes sont perdus à cause d'un rejet chronique. Les principales cibles de la réponse immune au cours de l'allogreffe sont les molécules du CMH elles-mêmes et la reconnaissance du CMH allogénique par les cellules T constitue l'événement central qui initie le rejet (Krensky et al., 1990; Steinmuller, 1985). Dans le début des années 1980, Lechler et Batchelor furent les premiers à proposer l'existence de deux voies distinctes de reconnaissance des allo-antigènes par les cellules T (Lechler and Batchelor, 1982a; Lechler and Batchelor, 1982b): la voie directe et la voie indirecte. La voie directe de

présentation implique la présentation d'antigène intact du donneur par les cellules présentatrices d'antigène du donneur aux cellules T du receveur. La voie de reconnaissance indirecte est la plus représentative de la réponse à l'antigène classique. Dans cette voie, les cellules T reconnaissent l'antigène du donneur qui ont été apprêtés et présentés dans le contexte du CMH du Soi sur les CPA du receveur (Sayegh et al., 1994). Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ peuvent médier aussi bien les deux types de présentation. Suite à l'alloreconnaissance par l'hôte, la réaction contre le greffon qui en résulte mène, en absence de traitement, à la destruction du tissu du donneur. Une troisième voie nommée présentation semi-directe récemment décrite (Afzali et al., 2007; Jiang et al., 2004) vient compléter la classification initiale et consiste en la présentation par des molécules de CMH du donneur exprimées à la surface des CPA du receveur.

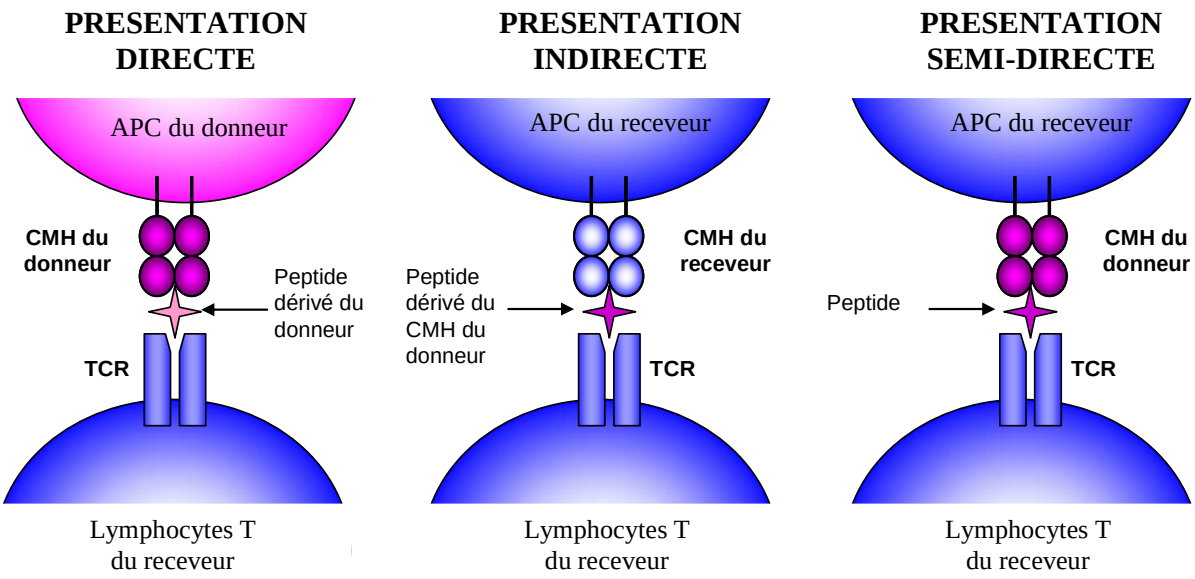


Figure 9: Les différentes voies d'alloreconnaissance

1. Les différentes voies d'alloreconnaissance

1.1 La voie de présentation directe

Le système immunitaire s'est développé initialement pour combattre des peptides microbiens présentés par des molécules CMH du soi, or il existe une forte réponse induite

contre l'allogreffe en transplantation. Les cellules T reconnaissent des molécules CMH intactes du donneur sur des cellules présentatrices du donneur, c'est la présentation directe (Larsen et al., 1990). La reconnaissance directe se fait au niveau des organes lymphoïdes secondaires par les cellules dendritiques du donneur présentes au niveau du greffon et qui ont migré. En effet, il est possible que le greffon soit « immunologiquement » ignoré lorsque les animaux sont déficients en organes lymphoïdes secondaires (Lakkis et al., 2000). A ce niveau, les cellules dendritiques du donneur présentent les antigènes du donneur aux cellules T du receveur *via* des molécules du complexe CMH (**Figure 9**). La forte réponse déclenchée par la présentation directe est due à une fréquence élevée de cellules T avec une allospécificité directe (Lindahl and Wilson, 1977).

L'alloréactivité représente la reconnaissance du polymorphisme allélique des molécules allogéniques du CMH. L'alloréactivité est due à une réactivité croisée ; un TCR spécifique d'un complexe CMH-peptide du Soi peut également reconnaitre une molécule du complexe CMH-peptide allogénique. Bien que la rencontre d'un CMH allogénique apparaisse très peu probable au cours de la vie normale d'un individu, la réponse immune envers les molécules du CMH allogéniques est très forte. De plus, cette reconnaissance directe n'obéit pas aux lois conventionnelles de restriction au CMH. Bien que le répertoire lymphocytaire T soit sélectionné dans le thymus sur la base d'une affinité du TCR suffisante pour les complexes CMH autologue/peptide du Soi, la fréquence des lymphocytes T capables de reconnaître par la voie directe des molécules du CMH vis-à-vis desquelles elles n'ont pas été « éduquées » est paradoxalement très élevée. Il est en effet estimé que 0,1 à 10 % du répertoire T d'un individu est capable de reconnaître des alloantigènes (Benichou et al., 1998; Wang et al., 1998), tandis que la fréquence des cellules T spécifiques d'un peptide antigénique conventionnel donné, d'origine infectieuse par exemple, est de moins de 1 sur 100 000 (Karulin et al., 2000). Cette fréquence élevée des lymphocytes T alloréactifs explique en partie l'intensité particulière de la réponse allogénique directe *in vivo* en dehors de toute sensibilisation préalable.

Cette reconnaissance directe intervient puissamment dans les jours ou les semaines qui suivent la greffe et est responsable des rejets aigus précoces (Benichou et al., 1999). Les cellules dendritiques du donneur ayant une durée de vie limitée, leur part dans l'activation directe diminue petit à petit. Cependant, des données récentes suggèrent que cette voie directe pourrait être active tout au long de la vie des greffons via la présentation par d'autres cellules (endothélium, épithélium) (Bestard et al., 2008).

1.2 La voie de présentation indirecte

Lechler et Batchelor (Lechler and Batchelor, 1982a) ont initialement émis l'hypothèse que les cellules T alloréactives peuvent également être stimulées par la voie indirecte, dans laquelle les antigènes dérivés du donneur sont apprêtés et présentés aux lymphocytes T du receveur par les CPA du donneur (Benichou et al., 1994; Benichou et al., 1992) (**Figure 9**). Ces dernières infiltrent le greffon tout spécialement lors du processus inflammatoire local initié par la transplantation. Elles vont localement phagocyter, apprêter puis migrer et présenter les alloantigènes (la possibilité d'une présentation efficace dans le greffon n'est pas encore totalement exclue dans la mesure où les reins en rejet chronique ont certains aspects qui les rapprochent des organes lymphoïdes secondaires). Ainsi, les CPA du receveur vont présenter des peptides dérivés essentiellement du CMH du donneur *via* leur propre CMH aux cellules T du receveur. De plus, il a été rapporté que les molécules du système HLA solubles et intactes sont présentes dans la circulation chez l'homme après transplantation (Suciu-Foca et al., 1991), par conséquent, des fragments de molécules du CMH du donneur peuvent être clivés et pris en charge par les DC de l'hôte et présentés par le CMH du Soi comme peptides allogéniques aux lymphocytes T.

La plupart des peptides antigéniques présentés par la voie indirecte proviennent de la région polymorphe des molécules du CMH du donneur (Benichou et al., 1994; Benichou et al., 1992; Gould and Auchincloss, 1999). Cependant, la présentation indirecte peut également se produire en réponse à des peptides dérivés d'autres protéines du donneur incluant les antigènes mineurs de transplantation (Richards et al., 2004).

Les lymphocytes T $CD4^+$ sont « classiquement » activés par une voie indirecte puisque les antigènes exogènes rejoignent le circuit de présentation antigénique des molécules HLA de classe II. Le phénomène de présentation croisée est une propriété particulière des cellules dendritiques qui permet aux alloantigènes internalisés de rejoindre la voie d'apprêtement des molécules HLA de classe I, et donc l'activation de lymphocytes T $CD8^+$ par la voie indirecte (Popov et al., 1995; Shen and Rock, 2006). De tels lymphocytes $CD8^+$ ont pu être isolés dans des modèles expérimentaux et aussi chez des patients transplantés.

Alors que la voie directe est plus importante dans le processus de rejet aigu d'allogreffe, la voie de présentation indirecte pourrait jouer un rôle dominant dans le rejet chronique mais ceci reste à prouver. Des analyses des ganglions lymphatiques ont démontré que plus de 90% des cellules T allospécifiques étaient sensibilisés par la voie directe alors que

seulement 1-5% représentent des cellules T allospécifiques de la voie indirecte (Benichou, 1999; Lindahl and Wilson, 1977; Suchin et al., 2001). Cependant, un afflux continu d'antigènes du donneur apprêtés par les CPA du receveur augmente le nombre de lymphocytes T alloréactifs de la voie indirecte. Ces lymphocytes T semblent aussi plus résistants à l'immunosuppression conventionnelle (Sawyer et al., 1993).

1.3 La voie de présentation semi-directe

Ce modèle de reconnaissance propose que des molécules intactes du CMH allogénique soient capturées par les CPA du receveur à partir du greffon et a été démontré par Lechler et collaborateurs, tout d'abord dans des travaux *in vitro* (**Figure 9**). Des phénomènes de transfert de molécules du CMH par acquisition de fragments de membrane cellulaire ont été observés entre des cellules endothéliales et des DC (Jiang et al., 2004), et également entre DC par l'intermédiaire des exosomes (Thery et al., 2002). Par ailleurs, les DC du donneur semblent sécréter des exosomes contenant les molécules du CMH qui pourraient fusionner au contact de la membrane des cellules dendritiques du receveur (Jiang et al., 2004). L'acquisition de molécules du CMH allogénique pourrait survenir lors de la circulation des DC du receveur au travers du greffon et à partir de l'endothélium vasculaire. Les DC du receveur exprimeraient donc les molécules à la fois du CMH autologue et du CMH allogénique, et seraient capables d'activer simultanément la réponse CD4 et CD8 par les voies directe et indirecte.

2. Les différents types de rejet

2.1 Le rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu survient rapidement après la greffe (en moins de 24h) et est principalement dû aux anticorps présents dans le sérum de l'hôte, anticorps spécifiques du greffon. Ainsi, les IgM vont reconnaître des antigènes portés par les cellules endothéliales, entraînant la destruction de celles-ci. Les complexes antigènes-anticorps entraînent également un phénomène de coagulation à l'intérieur des vaisseaux. La cascade du complément peut

aboutir à la destruction de l'endothélium ou, lorsque la lésion est grave sans être fatale, à l'activation des cellules endothéliales. La prévention du rejet hyperaigu s'effectue par l'assurance de la compatibilité du système ABO ainsi que par un test de compatibilité (« cross-match ») entre le donneur et le receveur. Ce test consiste en l'incubation des lymphocytes du donneur avec le sérum du receveur en présence de complément. Une mort cellulaire indique la présence d'anticorps contre le donneur et empêche par conséquent la réalisation de la transplantation.

2.2 Le rejet aigu

Le rejet aigu est constaté le plus souvent dans les jours ou les semaines qui suivent la greffe et est causé par l'alloreconnaissance des antigènes du donneur par les lymphocytes T auxiliaires du receveur. Les cellules dendritiques présentes dans le greffon migrent vers les ganglions lymphatiques et stimulent une réponse immunitaire allogénique primaire. Les cellules T ainsi activées migrent vers le greffon et endommagent le tissu par différents mécanismes effecteurs. Le mécanisme essentiel du rejet aigu cellulaire est une infiltration massive du greffon par des cellules mononucléées comme les macrophages et les lymphocytes T du receveur (**Figure 10**). Cette infiltration s'accompagne de la génération de cellules T cytotoxiques et par l'induction de réactions d'hypersensibilité retardée. Les anticorps peuvent être également la cause des dommages tissulaires, non seulement par la fixation du complément, mais également par l'intermédiaire de lymphocytes T cytotoxiques (CTL pour *Cytotoxic T Lymphocyte*) ou de cellules tueuses naturelles (NK pour *Natural Killer*), pouvant exercer une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC pour *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*).

Le rôle essentiel des lymphocytes T $CD4^+$ dans le phénomène de rejet s'exerce sur un ensemble de mécanismes lié à la sécrétion de différentes cytokines. L'IFN-γ permet l'activation des lymphocytes T cytotoxiques mais également l'activation des cellules présentatrices d'antigène et les éosinophiles. De plus, en association avec le TNF-β il active les macrophages. L'IL-2 couplée à l'IL-4 et l'IL-5 permet l'activation des cellules B et la synthèse d'anticorps dirigés contre le greffon.

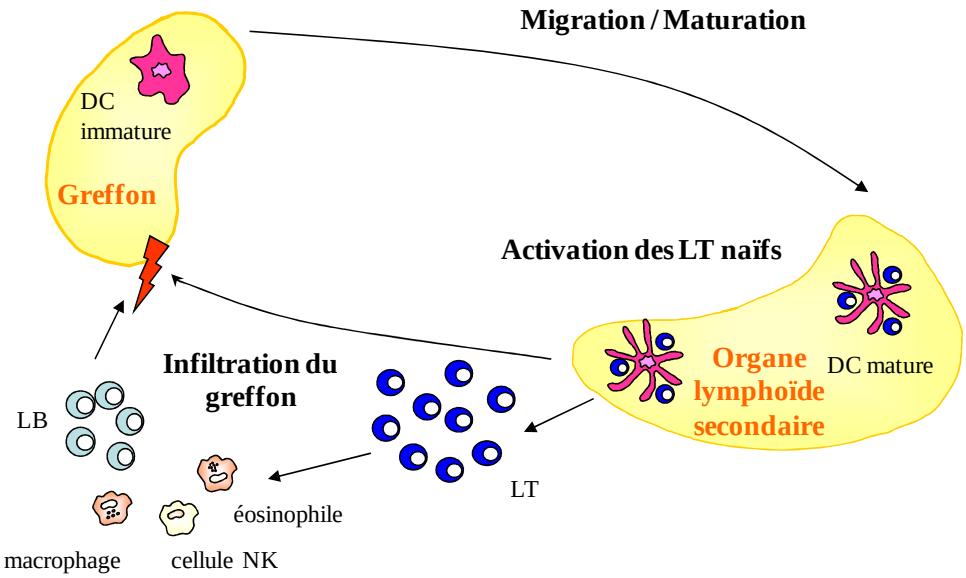


Figure 10: Modèle de rejet aigu

2.3 Le rejet chronique

La séquence d'évènements de rejet de greffe peut être scindée en deux étapes distinctes : tout d'abord la sensibilisation durant laquelle les lymphocytes alloréactifs prolifèrent après reconnaissance des alloantigènes et une phase effectrice durant laquelle la destruction du greffon par la réponse immune est opérée. Les cellules $CD4^+$ alloréactives stimulées par les molécules de classe II portées par les cellules endothéliales du greffon et les cellules dendritiques activées produisent un ensemble de cytokines (IL-2, IFN-γ, TNF-α) qui stimulent la production d'IL-1β, de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules présentatrices d'antigène, les lymphocytes T $CD4^+$ Th1 et les lymphocytes T $CD8^+$ qui vont à leur tour stimuler le recrutement des cellules de la lignée monocyto/macrophagique. Les lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$ vont participer à l'activation des cellules cytotoxiques $CD8^+$. Par ailleurs, les cellules Th2 et les DC activées vont stimuler la synthèse d'alloanticorps dirigés essentiellement contre des antigènes du CMH ou des antigènes MICA qui sont apparentés aux antigènes du CMH. Les cellules T cytotoxiques détruisent les cellules du greffon par reconnaissance des antigènes de classe I, adhérence, synthèse de perforine et lyse de la membrane de la cellule cible, ou bien par induction d'apoptose. En plus de cette réaction spécifique, des cellules tueuses non spécifiques (NK, monocytes, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles) pourraient participer à la lyse des cellules du greffon (**Figure 11**). Les

alloanticorps se fixent sur les antigènes du greffon portés par l'endothélium vasculaire et les cellules épithéliales. Ces anticorps contribuent, avec les lymphocytes T, à la formation des lésions vasculaires du greffon observées au cours du rejet chronique.

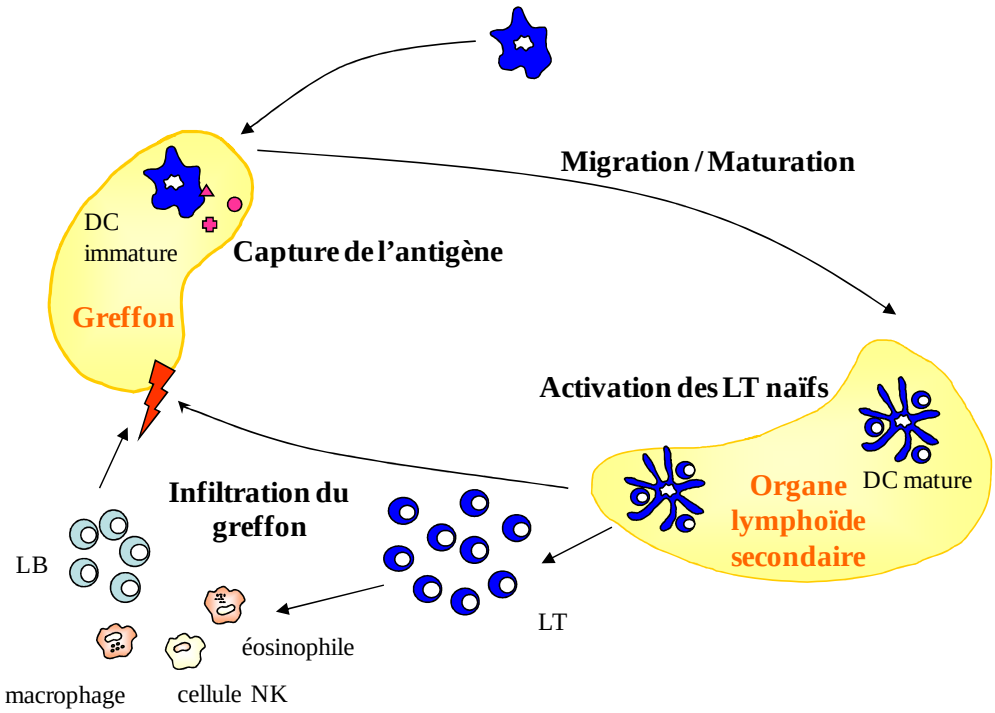


Figure 11: Modèle de rejet chronique

3. Les immunosuppresseurs

Le succès d'une transplantation d'organe dépend principalement des immunosuppresseurs qui contrôlent la réponse immunitaire allogénique. Parmi ces immunosuppresseurs, la 6-mercaptopurine a été le premier à être découvert en 1959 par Schwartz et Dameshek (Schwartz and Dameshek, 1959). Cette molécule a la propriété d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et de prolonger le temps de survie du greffon. Les recherches se sont donc intensifiées sur des molécules capables soit de déléter les lymphocytes T du sang périphérique soit de suspendre leur fonction. Ainsi, différents types d'agents immunosuppresseurs ont été développés : des inhibiteurs de la calcineurine (la cyclosporine et le tacrolimus), des inhibiteurs de mTOR (la rapamycine et l'éverolimus), des inhibiteurs du métabolisme des purines et des pyrimidines (l'azathioprine et l'acide

mycophénolique), des anti-inflammatoires de la famille des glucocorticoïdes utilisés en tant qu'immunosuppresseur (dexamethazone) ainsi que des anticorps monoclonaux (anti-CD3 et anti-CD25) et polyclonaux (ATG-anti-thymoglobulines). D'autres molécules sont en cours d'évaluation dans des essais thérapeutiques en transplantation comme la molécule CTLA-4-Ig (Belatacept®). Il existe également d'autres agents comme des dérivées de la vitamine D_3 qui ont des propriétés immunomodulatrices *in vitro* en cours de développement pour la thérapeutique chez l'homme.

Néanmoins, les immunosuppresseurs n'induisent pas de tolérance immune et dépriment le système immunitaire de façon importante et de manière non spécifique. En conséquence, ils sont à l'origine de nombreux effets secondaires tels que le développement de cancers viro-induits ou d'infections à germes opportunistes d'origine bactérienne, virale et fongique.

Compte tenu de la grande diversité des immunosuppresseurs, seules les propriétés de l'acide mycophénolique et de la rapamycine seront détaillées dans le chapitre suivant.

3.1 L'acide mycophénolique

Le mycophénolate mofétil (MMF) libère son principe actif appelé acide mycophénolique (MPA) après hydrolyse. Ce dernier est le produit de fermentation du *Penicillium fungus*. Le MPA est un inhibiteur non compétitif et réversible de l'enzyme inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) nécessaire à la synthèse *de novo* des nucléotides guanosines (Allison and Eugui, 2000). Comme les lymphocytes sont incapables d'utiliser la voie de récupération des nucléotides, leur prolifération est particulièrement sensible à l'inhibition de la synthèse *de novo* par le MPA.

Outre ses propriétés immunosuppressives sur les lymphocytes T, le MPA agit également sur d'autres cellules du système immunitaire et en particulier sur les cellules dendritiques. Ce n'est qu'en 2000 que l'action du MPA sur les DC murines a été mise en évidence. Ainsi, Mehling *et al.,* ont montré dans un modèle d'hypersensibilité cutanée chez la souris que le MPA inhibe l'expression de certains marqueurs de maturation et de co-stimulation comme le CD40, le CD80, le CD86 et le CD54, la sécrétion d'IL-12 et que ces DC ont une faible capacité allostimulatrice (Mehling et al., 2000). Par ailleurs, le MPA augmente l'expression de B7-DC, un régulateur négatif de la prolifération lymphocytaire (Geng et al., 2006).

Chez l'Homme, l'effet du MPA sur les DC a également été étudié. Ainsi, Colic et collaborateurs ont mis en évidence que la présence de MPA lors de la différenciation de monocytes en cellules dendritiques induisait l'apoptose des cellules dendritiques immatures humaines et diminuait l'expression de certaines molécules de co-stimulation et d'adhésion comme le CD40, le CD54, le CD80 et le CD86 (Colic et al., 2003).

Suite à une maturation induite par le LPS ou le TNF-α, le MPA réduit l'expression des marqueurs de co-stimulation et de maturation comme le CD83, le CD80 et le CD86 (Colic et al., 2003 ; Dubsky et al., 2006 ; Lagaraine et al., 2005). Par ailleurs, cette molécule maintient l'endocytose dépendante au récepteur au mannose (Dubsky et al., 2006; Lagaraine et al., 2005) mais diminue l'expression du CD205 associée à la capture antigénique (Wadia et al., 2009). Néanmoins, ces cellules expriment des récepteurs aux chimiokines caractéristiques des cellules dendritiques matures tels que CCR7 et CXCR4. Ainsi, le MPA inhibe la maturation phénotypique des cellules dendritiques mais conserve leur capacité de migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

Le MPA réduit la synthèse d'IL-12 mais augmente la sécrétion d'IL-10 après une stimulation par le TNF-α (Lagaraine et al., 2005). Par contre, il réduit à la fois la production d'IL-12, d'IL-10, d'IL-18 et de TNF-α suite à une activation par le LPS (Colic et al., 2003). Enfin, le MPA induit des cellules dendritiques ayant une faible capacité allo-stimulatrice (Colic et al., 2003; Lagaraine et al., 2005; Wadia et al., 2009).

Le fait que les propriétés immunomodulatrices du MPA sur la cellule dendritique soient liées à sa capacité à bloquer l'IMPDH reste controversé. En effet, l'ajout de dbGMP ou d'un inhibiteur de l'AMPc n'inhibe pas l'effet inhibiteur du MPA sur la prolifération lymphocytaire (Lagaraine et al., 2005). Par contre, la guanosine exogène lève l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T induite par des cellules dendritiques maturées en présence de MPA (Dubsky et al., 2006). De plus, le MPA induit une diminution de la quantité de GTP lors de la différenciation de monocytes en cellules dendritiques et lors de leur maturation. L'ensemble des ces données sous-entend que l'effet du MPA sur les cellules dendritiques pourrait passer en partie par son action inhibitrice sur l'enzyme IMPDH dans la cellule dendritique. Les DC traitées au MPA semblent avoir un profil dit « tolérogène » et pourraient être capables d'induire des lymphocytes T régulateurs. Cet aspect sera développé dans la partie « Travaux personnels ».

3.2 La rapamycine

La rapamycine est un antibiotique macrolide produit par le *Streptomyces hydroscopicus* (Abraham and Wiederrecht, 1996), découvert sur l'Ile de Pâques (Rapa Nui). Durant le développement clinique de cette molécule, la mise en évidence d'effets anti-prolifératifs a orienté son utilisation comme agent immunosuppresseur dans la prévention des rejets de greffes. La rapamycine exerce sa fonction en se liant au complexe mTOR-FKBP12 («FK506-binding protein 12») entraînant l'inhibition de l'activité kinase de mTOR (Sabers et al., 1995). La protéine mTOR est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire au travers de : l'initiation, la traduction, la synthèse de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire et la synthèse d'ADN. Son action passe par le blocage de signaux intracellulaires induits par la liaison de l'IL-2 à son récepteur mais la rapamycine n'inhibe pas l'expression du gène de l'IL-2 ni celle de son récepteur (Dumont et al., 1990). Ainsi, la rapamycine intervient à une étape un peu plus tardive de l'activation des lymphocytes T. En effet, elle bloque leur prolifération et leur survie cellulaire induite par l'IL-2 (Morelon et al., 2001; Terada et al., 1993).

L'influence de cet agent sur les fonctions de la cellule dendritique n'a été décrite que dans les années 2000. Cependant son rôle sur les DC est encore mal défini. En effet, de nombreux changements sont observés quant à la capture et la présentation antigéniques par les cellules présentatrices d'antigène (APC) lorsqu'elles sont différenciées en présence de rapamycine. Ainsi, la rapamycine inhibe la phagocytose, l'endocytose et la pinocytose, diminue l'expression des récepteurs de la capture antigénique tels que CD46, CD91, CD32 et le récepteur au mannose et les molécules de CMH de classes I et II et modifie le complexe DALIS (« Dendritic cell Aggresome-like Structures). De plus, la cross-présentation des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I ne semble pas affectée. La rapamycine facilite également l'autophage et peut influencer la présentation des antigènes du soi (Thomson et al., 2009) (**Figure 12**).

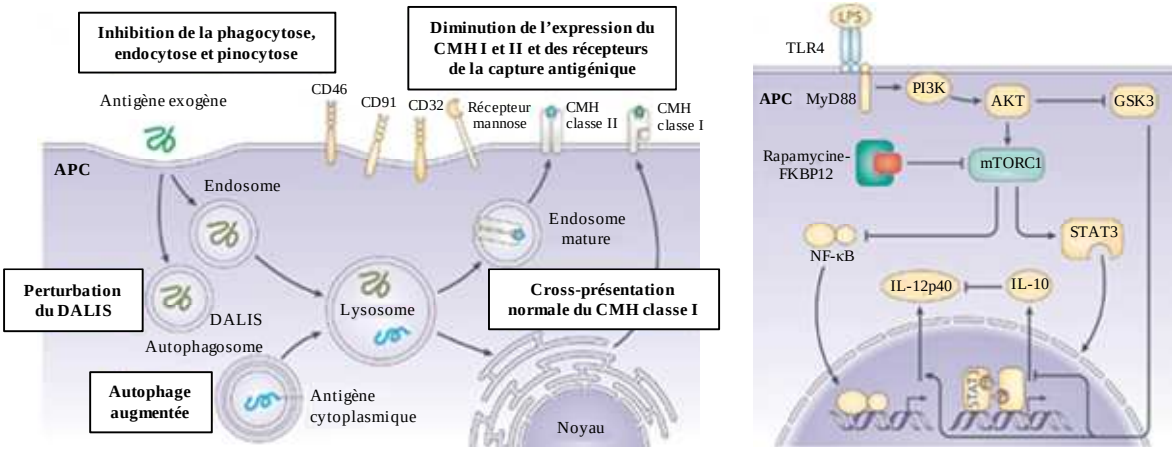


Figure 12: mTOR et la rapamycine régulent la fonction des APC (d'après Thomson *et al.*, Nature Review Immunol 2009)

Cependant, les différents résultats publiés montrent des divergences sur les effets de la rapamycine au moment de la maturation. Par exemple, selon Chiang *et al.,* et Woltman *et al.,* la rapamycine n'interfère pas dans le processus de maturation des DC (Chiang et al., 2004; Woltman et al., 2001). A l'inverse, d'autres travaux soulignent une inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80, CD86, CD83 et/ou des molécules du CMH de classe II ainsi que des chaînes du récepteur à l'IL-4 (CD124, CD132) par la rapamycine (Hackstein et al., 2003; Monti et al., 2003; Taner et al., 2005). La rapamycine pourrait donc inhiber la maturation dépendante de l'IL-4 (Hackstein et al., 2003). Par contre, cette molécule n'altère pas la capacité des cellules à présenter les antigènes endogènes par le CMH de classe I et exogènes par le CMH de classe II ni la présentation croisée (Lee et al., 2005). Curieusement, la rapamycine augmente l'expression de CCR7 favorisant ainsi la migration des DC vers les ganglions lymphatiques *in vivo* et en réponse à CCL19 *in vitro* (Sordi et al., 2006). Une autre étude démontre que la rapamycine down-régule l'expression des récepteurs inhibiteurs ILT2, ILT3 et ILT4 à la surface des DC humaines tout en induisant une hyporéponse des cellules T qui semble indépendante de l'induction de Foxp3 (Fedoric and Krishnan, 2008). En ce qui concerne la synthèse des cytokines, une inhibition de la synthèse d'IL-12 et d'IL-10 est observée après une stimulation par le CD40L en présence de rapamycine (Monti et al., 2003) mais l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 n'est pas retrouvée suite à une activation par le LPS (Chiang et al., 2004). Par ailleurs, les cellules dendritiques traitées par la rapamycine sont incapables d'activer efficacement les lymphocytes T allogéniques *in vitro* et *in vivo* (Hackstein et al., 2003; Monti et al., 2003; Taner et al., 2005). Seuls les travaux de Taner et collaborateurs indiquent une prolifération normale des

lymphocytes T allogéniques mais une inhibition de l'expansion de lymphocytes T syngéniques (Taner et al., 2005). Néanmoins, après plusieurs re-stimulations par voie directe ou indirecte, les lymphocytes T deviennent hyporépondeurs. Cette hyporéponse est spécifique de l'antigène et peut être levée par l'addition d'IL-2 exogène (Taner et al., 2005). La rapamycine semble aussi inhiber l'orientation Th1 en diminuant la sécrétion d'IFN-γ par les lymphocytes T (Chiang et al., 2002; Monti et al., 2003; Taner et al., 2005).

A l'opposé, une étude récente de Weichhart *et al.,* suggère que la rapamycine augmente la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IFN-γ, diminue la synthèse d'IL-10 et augmente la capacité d'allostimulation des DC (Weichhart et al., 2008).

Chez la souris, les cellules dendritiques traitées à la rapamycine sont de faibles stimulateurs des lymphocytes T $CD4^+$ mais enrichissent en lymphocytes T régulateurs antigène-spécifiques promouvant ainsi la tolérance d'allogreffe (Turnquist et al., 2007). Cette équipe a également mis en évidence que la rapamycine entraîne une augmentation de la synthèse d'IL-1β par les DC murines favorisant alors l'expression à leur surface de la forme transmembranaire de ST2 qui est le récepteur à l'IL-33 (Turnquist et al., 2008). La rapamycine est également responsable de l'expansion des lymphocytes T $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ naturels murins (Battaglia et al., 2005). Enfin, l'injection de cellules dendritiques traitées par la rapamycine pulsées avec des allo-antigènes avant la greffe prolonge la survie d'allogreffes cardiaques (Chiang et al., 2004) et cutanées de souris (Horibe et al., 2008).

Une étude réalisée chez le rat a mis en évidence que le traitement des DC immatures par la rapamycine affecte leur maturation, augmente l'apoptose et diminue leur sécrétion d'IL-12 et d'IL-10. Par contre, les DC maturées avec du LPS sont résistantes à l'apoptose induite par la rapamycine. Leur production d'IL-10 et de TNF-α est diminuée tandis que la sécrétion d'IL-12 n'est pas modifiée (Wang et al., 2009).

Etant donné l'hétérogénéité des résultats obtenus jusqu'à présent, il serait intéressant d'étudier l'impact de la rapamycine sur la maturation et la capacité allostimulatrice des DC humaines.

4. La tolérance immune

4.1 Les mécanismes généraux

La mise en place d'une réponse immunitaire effectrice est nécessaire afin de défendre l'organisme vis-à-vis des pathogènes et des virus. Néanmoins, cette réponse immunitaire doit être contrôlée afin de ne pas être exacerbée et prendre fin lorsque le pathogène a disparu. Par ailleurs, notre système immunitaire ne doit pas générer de réponse effectrice envers le Soi, sous peine de déclencher une maladie auto-immune. Malgré la sélection négative des lymphocytes auto-réactifs dans le thymus, qui constitue la tolérance centrale, certaines cellules qui reconnaissent les antigènes du soi se retrouvent en périphérie. Une régulation de la réponse immunitaire en périphérie est donc indispensable à la fois pour inactiver les cellules T auto-réactives afin d'éviter l'apparition de maladies auto-immunes et pour réguler l'intensité des réponses immunitaires contre le « non Soi ».

La tolérance centrale implique la délétion clonale lors du développement des thymocytes tandis que la tolérance périphérique est accomplie par divers mécanismes comme l'anergie, l'induction d'apoptose, l'ignorance et l'action de cellules régulatrices.

4.1.1 La tolérance centrale

Le premier mécanisme de tolérance est la tolérance du soi, mécanisme immunologique primordial à la santé de l'individu.

Pour assurer une réponse immune efficace, le système immunitaire doit comporter des cellules T capables de reconnaître et de répondre à un nombre important d'antigènes étrangers (Blackman et al., 1990). Pour une large part ceci est réalisé par les multiples réarrangements des gènes du TCR au cours de l'ontogénie qui aboutit à la production d'une grande variété de spécificités antigéniques. Durant ce processus stochastique, des clones ayant des spécificités pour des antigènes du Soi sont produits. Ces clones doivent être fonctionnellement éliminés pour prévenir l'apparition de maladies autoimmunes.

Les progéniteurs des lymphocytes T, provenant de la moelle osseuse, migrent dans le thymus pour y subir une maturation. Au cours de leur développement dans le thymus, les lymphocytes T (ou thymocytes) subissent deux sélections : positive et négative. La sélection positive s'effectue dans la zone corticale du thymus où seuls les lymphocytes T doubles

positifs $CD4^+CD8^+$ reconnaissant les molécules de CMH du Soi reçoivent un signal de survie et poursuivent leur développement. Le second phénomène de tri, la sélection négative, aussi connue sous le nom de délétion clonale, s'effectue dans la zone médullaire du thymus (Sprent and Kishimoto, 2002). Les lymphocytes T autoréactifs, possédant une forte avidité pour les peptides du Soi présentés par le CMH des cellules présentatrices d'antigènes thymiques (dont les cellules dendritiques), vont mourir par l'induction d'apoptose *via* l'activation de leur TCR (Anderton and Wraith, 2002). Environ 3% seulement des précurseurs de cellules T qui entrent dans le thymus survivent à la sélection positive et négative. Ces lymphocytes quittent le thymus pour se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires.

4.1.2 La tolérance périphérique

Certains lymphocytes T autoréactifs échappent à la sélection négative, en particulier les lymphocytes T spécifiques des déterminants du Soi absents du thymus mais présents en périphérie. L'existence d'une tolérance périphérique est donc nécessaire pour inactiver les cellules T autoréactives. Cette tolérance périphérique repose sur plusieurs mécanismes : l'inactivation fonctionnelle des cellules auto-réactives par des cellules régulatrices, l'induction d'apoptose, l'ignorance et enfin l'anergie.

4.1.3 La délétion clonale

La délétion des cellules T peut également avoir lieu en périphérie, lorsque celles-ci rencontrent l'antigène dans des conditions particulières (Kabelitz et al., 1993). Par exemple, la mort par apoptose après activation appelée AICD (« Activation-induced Cell Death ») est déclenchée suite à une activation trop importante. Il s'agit d'un mécanisme de contrôle de l'expansion des lymphocytes T lorsqu'ils ont été préalablement stimulés. La stimulation répétée de lymphocytes T par des antigènes spécifiques présents en forte concentration ou des activateurs polyclonaux va entraîner une mort des cellules activées par un phénomène d'apoptose dépendant d'une interaction Fas/FasL (Brunner et al., 1995; Marth et al., 1999). Son rôle est avant tout de prévenir une activation incontrôlée des cellules T. Mais ce processus est également important pour le maintien d'une tolérance périphérique à certains antigènes du Soi comme le suggèrent des mutations touchant Fas ou FasL et qui conduisent à des syndromes auto-immuns (Holzelova et al., 2004; Singer et al., 1994). Il semble donc que des lymphocytes T puissent également subir une délétion clonale en périphérie; c'est

notamment le cas des lymphocytes T $CD4^+$ reconnaissant les antigènes administrés par voie orale (Bu et al., 2001).

4.1.4 L'anergie

L'anergie constitue un état particulier de la cellule T qui est fonctionnellement inactivée c'est à dire qu'elle ne répond plus par une prolifération après stimulation du TCR. La cellule reste vivante mais est incapable de proliférer et de synthétiser de l'IL-2 (Schwartz, 1990). Elle est dans un état d'hypo-réponse, c'est-à-dire qu'elle ne peut plus répondre à une nouvelle stimulation. Il existe deux sortes d'anergies : l'anergie clonale et « l'anergie *in vivo* ».

L'anergie clonale résulte d'une activation du TCR sans signal de co-stimulation médié par le CD28 (signal 1 sans signal 2) ; elle est réversible en présence de grandes quantités d'IL-2 ou par un signal via Ox40 (Schwartz, 2003). « L'anergie *in vivo* » dépend majoritairement des molécules de « co-inhibition » comme CTLA-4 ou PD-1. Cette forme d'anergie nécessite une certaine activation préalable du lymphocyte dans la mesure où CTLA-4 est une molécule inductible. Contrairement à l'anergie clonale, elle n'est pas levée par l'IL-2. Par ailleurs, la présence de l'antigène est nécessaire au maintien de « l'anergie *in vivo* » (Schwartz, 2003). Les signaux induits par l'engagement de ces récepteurs ne sont pas clairement connus. Ces récepteurs transduisent des signaux inhibiteurs qui confèrent un état de non réponse à long terme ou bien simplement un changement dans le seuil d'activation.

4.1.5 L'ignorance

L'ignorance est une absence d'activation de la cellule T qui conduit à une relation d'acceptation mutuelle de l'antigène et de la cellule effectrice (Melero et al., 1997). Des études anciennes avaient montré que des antigènes viraux exprimés sur les cellules des îlots β dans le pancréas étaient incapables d'anergiser ou de déleter les lymphocytes effecteurs périphériques, ce qui avait pour résultat une coexistence pacifique entre les antigènes et les cellules effectrices qui demeuraient pourtant parfaitement compétentes et étaient capables de réagir *in vitro* à l'antigène (Ohashi et al., 1991). Dans un état d'ignorance, les LT certes n'initient pas de réponse immune mais sont incapables d'inhiber l'activité de lymphocytes effecteurs (Miller and Heath, 1993). L'ignorance n'est donc pas un mécanisme de tolérance

active. Les antigènes séquestrés dans des zones immunologiquement protégées sont également ignorés par le système immunitaire (Barker and Billingham, 1977).

4.2 Les lymphocytes T régulateurs

En 1969, Nishizuka et Sakakura découvrent qu'une thymectomie effectuée chez des souris âgées de 3 jours déclenche des maladies auto-immunes au niveau de différents organes (Nishizuka and Sakakura, 1969; Wing et al., 2005). En 1970, Dick Gershon évoque l'existence de cellules dites « suppressives » pouvant inhiber l'activité de cellules reconnaissant le Soi et réguler la réponse immunitaire adaptative (Rouse, 2007). Cependant, le concept de cellules suppressives a été abandonné, faute d'identification de marqueurs spécifiques de ces cellules et de leur mécanisme d'action. Il est en effet difficile de définir et d'étudier la fonctionnalité d'une population cellulaire en l'absence de marqueurs spécifiques la caractérisant.

Quinze ans plus tard, l'équipe de Sakaguchi décrit une population cellulaire T $CD4^+$ exerçant une activité régulatrice chez la souris (Sakaguchi et al., 1995). Ces lymphocytes, aujourd'hui appelés « lymphocytes T régulateurs (ou LT régulateurs) naturels » représentent entre 5 et 10% des lymphocytes T $CD4^+$ totaux chez la souris adulte. Ce travail a renouvelé l'intérêt pour les lymphocytes T régulateurs et plusieurs populations T régulatrices sont maintenant mieux décrites grâce au nombre exponentiel d'études sur ce sujet ces dernières années.

Après une première partie consacrée aux LT $CD4^+$ régulateurs « naturels », nous nous intéresserons aux LT régulateurs $CD4^+$ dits « induits » ou « adaptatifs » puis aux LT régulateurs non $CD4^+$: LT $CD8^+$ et NKT.

4.2.1 Les lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs naturels

Mise en évidence

Une des premières et plus convaincantes séries d'études démontrant l'importance des lymphocytes T suppresseurs dans la prévention de l'autoimmunité spécifique d'organe a été réalisée dans le début des années 1970 (Gershon and Kondo, 1970). A cette époque, ils découvrirent que les cellules T pouvaient également réguler le système immunitaire et que cette régulation n'était pas effectuée par des cellules effectrices. Le problème majeur à cette

époque était le manque de marqueur de la population cellulaire qui supprimait les lymphocytes auto-réactifs et l'ignorance des mécanismes d'action (Sakaguchi et al., 2007).

Les observations de l'équipe de Sakaguchi en 1995, constituèrent une avancée majeure dans la compréhension de la fonction des cellules suppressives. En effet, ils ont montré que le transfert d'une population lymphocytaire déplétée en LT $CD4^+$ $CD25^+$ dans une souris athymique nude entraînait le développement spontané de maladies auto-immunes multiples chez les receveurs (Sakaguchi et al., 1995). Ce travail est confirmé par celui d'une autre équipe qui met en évidence le rôle de cette population régulatrice dans la prévention de l'auto-immunité (Suri-Payer et al., 1998) et démontre l'activité régulatrice de ces cellules *in vitro* de façon reproductible (Thornton and Shevach, 1998). Des cellules T $CD4^+CD25^+$ humaines avec des propriétés fonctionnelles très similaires à celle des cellules T $CD4^+CD25^+$ murines ont ensuite été identifiées par plusieurs groupes (Baecher-Allan et al., 2001; Ng et al., 2001; Stephens et al., 2001)

Ontogénie des lymphocytes T régulateurs naturels

L'origine thymique des LT régulateurs naturels a été démontrée d'une part grâce aux expériences de Sakaguchi qui observe l'absence de LT $CD4^+$ $CD25^+$ en périphérie chez des souris ayant subi une thymectomie à l'âge de 3 jours malgré un développement normal des autres lymphocytes T (Papiernik and Banz, 2001; Sakaguchi et al., 1995), et d'autre part par Papiernik et ses collaborateurs (Papiernik et al., 1998). Ce concept est soutenu par le fait que des patients atteints du syndrome de DiGeorge, présentant une hypoplasie thymique, ont peu de LT régulateurs naturels en périphérie (Sullivan et al., 2002). Cependant, les mécanismes du développement de ces cellules sont mal connus.

Prolifération des lymphocytes T régulateurs naturels

La question de la capacité proliférative des Trég naturels est importante spécialement dans une optique d'utilisation thérapeutique. Les cellules T $CD4^+$ $CD25^+$ sont considérées comme anergiques *in vitro,* c'est à dire qu'elles ne répondent pas à une stimulation conventionnelle du TCR mais l'ajout d'IL-2 permet de lever cette hypo-réponse (Sakaguchi, 2004; Thornton and Shevach, 1998). Cependant, plusieurs travaux mettent en évidence une prolifération des Trég naturels *in vitro* mais également *in vivo*. Ainsi, la prolifération de LT régulateurs $CD4^+$ $CD25^+$ naturels humains *in vitro* a notamment été observée après une

stimulation par des cellules dendritiques exprimant GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) suite à un traitement avec des glucocorticoïdes (Hamdi et al., 2007). Ces cellules peuvent également proliférer *in vitro* suite à une stimulation par des cellules dendritiques matures traitées par du LPS exprimant IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase). Sutmuller et ses collaborateurs ont montré que les LT régulateurs $CD4^+$ $CD25^+$ peuvent proliférer *in vitro* suite à une stimulation avec du Pam-3-Cys, un ligand de TLR-2 (Sutmuller et al., 2006). *In vivo*, l'administration de fortes doses d'IL-2 à des patients entraîne une augmentation du nombre de LT $CD4^+$ $CD25^{high}$ circulants. Ces LT expriment Foxp3 et exercent une activité suppressive *in vitro* (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006). Des LT régulateurs $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ sécrétant de l'IL-10 et du TGF-β ont également été retrouvés parmi les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) obtenus à partir de tumeurs de patients atteints de « HNSCC » (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) (Strauss et al., 2007b).

Les LT régulateurs naturels inhibent la prolifération et les fonctions effectrices des LT $CD4^+$ et $CD8^+$, la prolifération, la production d'anticorps et la permutation de classe des lymphocytes B, la cytotoxicité des cellules NK et NKT, la maturation et la fonctionnalité des cellules dendritiques ainsi que la fonction et la survie des neutrophiles (Rouse, 2007). Néanmoins, leur mécanisme d'action est mal connu. *In vitro*, il semblerait que l'activité suppressive des LT régulateurs naturels nécessite un contact direct entre le LT régulateur et la cellule répondeuse par l'intermédiaire de la cellule présentatrice d'antigène (Sakaguchi, 2004; Thornton and Shevach, 1998). En effet, les LT régulateurs n'exercent pas d'activité suppressive lorsqu'ils sont séparés des lymphocytes T répondeurs par une membrane semi-perméable ; de plus, le surnageant de LT régulateurs naturels activés n'inhibe pas la prolifération des lymphocytes T répondeurs (Sakaguchi, 2004). L'action suppressive des LT régulateurs naturels nécessite donc un contact *in vitro* mais les molécules impliquées ne sont pas bien identifiées.

Plusieurs hypothèses ont été émises et certaines études sur ce sujet sont contradictoires.

Il semblerait que le GITR joue un rôle dans l'activité suppressive des LT régulateurs naturels. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-GITR *in vitro* inhibe l'activité suppressive de ces cellules tout en préservant leur état anergique. Néanmoins, il a été montré que le GITR exerce un effet stimulant sur les $CD4^+$ $CD25^-$ en leur faisant produire de l'IL-2, ce qui inhibe l'activité suppressive des LT régulateurs naturels (Chen, 2006; Stephens et al., 2004; Tone et

al., 2003). Le GITR a donc une action inverse selon le type de cellules (régulatrice ou effectrice) activé par cette voie.

Le CTLA-4 pourrait également intervenir dans l'activité suppressive des LT régulateurs naturels. *In vitro*, comme pour le GITR, l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA-4 abolit l'activité régulatrice des LT régulateurs naturels. De plus, l'injection d'un anticorps anti-CTLA-4 à des souris engendre l'apparition de maladies auto-immunes sans réduire le nombre de LT régulateurs naturels chez ces animaux (Sakaguchi, 2004). Cependant, le CTLA-4 semble impliqué dans l'activité suppressive des LT régulateurs naturels de façon indirecte car les LT régulateurs $CD4^+$ $CD25^+$ exercent une activité suppressive similaire *in vivo* chez des souris sauvages ou B7.1/B7.2 KO (Chen, 2006; Taylor et al., 2004).

Les LT régulateurs naturels ne semblent donc pas exercer leur activité suppressive par l'intermédiaire de cytokines *in vitro*. Cependant, le rôle essentiel de l'IL-10 dans l'activité suppressive des LT régulateurs naturels a été mis en évidence *in vivo* dans des modèles murins d'inflammation du tube digestif (IBD), de transplantation, d'auto-immunité et d'infection parasitaire chronique (Sakaguchi, 2004). En revanche, le rôle du TGF-β dans la suppression médiée par les LT régulateurs naturels est plus controversé (Sakaguchi, 2004). Le TGF-β est considéré comme une cytokine soluble mais il peut également être exprimé à la membrane des LT régulateurs naturels sous forme latente : LAP-TGF-β (Latency membrane bound Associated Protein) (Chen, 2006; Chen and Wahl, 2003; Nakamura et al., 2001; Oida et al., 2003). L'hypothèse du rôle du TGF-β dans l'activité suppressive exercée par les LT régulateurs naturels est soutenue par le fait que le TGF-β membranaire des LT régulateurs naturels puisse se lier au TGF-βRII exprimé à la surface des T répondeurs *in vitro* et délivrer un signal inhibiteur, ce qui peut être observé par l'augmentation de Smad2/3 phosphorylé dans les cellules répondeuses (Chen, 2006; Chen and Wahl, 2003; Nakamura et al., 2001). Nous savons que les LT régulateurs naturels exercent leur activité suppressive de manière antigène non spécifique ; cette régulation a même été observée entre différentes espèces. En effet, des LT régulateurs naturels de souris peuvent exercer une activité suppressive sur des lymphocytes T effecteurs de rat (Shimizu et al., 2002). Le TGF-β serait donc un bon candidat pour médier l'activité suppressive des LT régulateurs naturels puisque la suppression médiée par une cytokine est antigène non spécifique et que le TGF-β paraît conservé entre différentes espèces. De plus, les LT $CD4^+$ et $CD8^+$ répondeurs n'exprimant pas le TGF-βRII sont résistants à l'activité suppressive des LT régulateurs naturels sauvages *in vivo* (Chen et al., 2005; Chen, 2006; Fahlen et al., 2005; Green et al., 2003). Néanmoins, dans certaines co-cultures, l'utilisation d'un anticorps anti-TGF-β ne reverse pas la suppression exercée par les

LT régulateurs naturels (Chen, 2006).De plus, des LT régulateurs naturels issus de souris TGF-β1 KO exercent quand même une activité suppressive *in vitro* (Chen, 2006).

Les LT régulateurs naturels semblent donc exercer leur activité suppressive par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes qui paraissent différents selon la situation.

4.2.2 Les lymphocytes T CD4$^+$ adaptatifs ou induits

Lymphocytes CD4$^+$CD25$^+$ induits

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs études ont montré que les LT régulateurs CD4$^+$ CD25$^+$ étaient générés dans le thymus. Or, malgré l'involution du thymus à partir de l'adolescence, on retrouve des LT CD4$^+$ CD25$^+$ en périphérie tout au long d'une vie. De plus, les LT régulateurs CD4$^+$ CD25$^+$ ne suppriment pas seulement des réponses immunitaires spécifiques d'antigènes du Soi (Taams and Akbar, 2005). Comment expliquer ce phénomène sachant que seuls les antigènes du Soi sont présentés dans le thymus? Plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence que des lymphocytes T CD4$^+$ CD25$^+$ ayant les mêmes caractéristiques que les LT régulateurs naturels peuvent être générés en périphérie (Walker et al., 2003; Walker et al., 2005). Il semblerait que des lymphocytes T CD4$^+$ deviennent anergiques et exercent une activité suppressive lorsque l'antigène leur a été présenté par des cellules présentatrices d'antigène non professionnelles exprimant le CMH II comme des cellules épithéliales ou des lymphocytes T activés (Taams et al., 1999). Comme les LT régulateurs CD4$^+$ CD25$^+$ naturels, les LT ainsi obtenus expriment CD25 et CTLA-4 de façon constitutive et exercent leur activité suppressive par l'intermédiaire d'un contact. L'induction de LT régulateurs CD4$^+$ CD25$^+$ en périphérie a également été mise en évidence *in vivo* chez la souris. En effet, lorsqu'un transfert adoptif de cellules T CD4$^+$ issues de souris DO11.10 déficientes pour RAG-2 est réalisé chez des souris Balb/c, des LT régulateurs CD4$^+$ CD25$^+$ DO11.10 sont détectés chez ces souris. Sachant que les souris déficientes pour RAG-2 ne possèdent pas de LT CD4$^+$ CD25$^+$, ces LT régulateurs peuvent donc uniquement provenir de la différenciation de LT CD4$^+$ CD25$^-$ en LT régulateurs CD4$^+$ CD25$^+$ (Thorstenson and Khoruts, 2001). Des LT régulateurs CD4$^+$ CD25$^+$ peuvent également être générés *ex vivo* à partir de LT CD4$^+$ CD25$^-$ après stimulation en présence de TGF-β. Il semblerait que ce phénomène soit le résultat de l'induction de l'expression de Foxp3 par le TGF-β (Zheng et al., 2002).

Lymphocytes Tr1

Les lymphocytes Tr1 ont été isolés pour la première fois *in vivo* chez des patients présentant une immunodéficience sévère (SCID) ayant accepté avec succès une greffe de moelle osseuse allogénique provenant d'un donneur avec un mésappariement HLA (Bacchetta et al., 1994). Les lymphocytes T régulateurs dits « lymphocytes Tr1 » ont ensuite été définis *in vitro* comme étant induits par stimulation antigénique répétée en présence d'IL-10 (Groux et al., 1996; Groux et al., 1997). *In vivo*, contrairement aux LT régulateurs naturels, les lymphocytes Tr1 sont induits en périphérie suite à la rencontre d'un antigène dans un environnement tolérogène (Levings and Roncarolo, 2005).

Les lymphocytes Tr1 régulent les réponses Th1 et Th2 *in vitro* et *in vivo*, ainsi que la production d'anticorps par les lymphocytes B. Ils semblent exercer leur activité suppressive via la sécrétion de cytokines régulatrices : selon les études, l'activité suppressive des lymphocytes Tr1 est due à l'IL-10 seule ou associée au TGF-β. Néanmoins, des lymphocytes T régulateurs produisant de l'IL-10, et donc dits « Tr1 » ou « Tr1-like », dont le mécanisme d'action n'est pas dépendant de l'IL-10 ont également été décrits (Jonuleit et al., 2000; Vieira et al., 2004). Dans ces deux études, l'activité suppressive des lymphocytes Tr1 nécessite un contact cellulaire. Par ailleurs, la population Tr1 obtenue par Kemper et ses collaborateurs suite à une stimulation des lymphocytes T $CD4^+$ par CD3 et CD46 exerce une activité suppressive par l'intermédiaire de l'IL-10 et d'un mécanisme dépendant du système perforine/granzyme B (Kemper et al., 2003). Donc l'activité suppressive des lymphocytes Tr1 semble essentiellement médiée par l'IL-10. Cependant, selon le mode d'obtention de ces cellules, d'autres voies peuvent également être impliquées dans leur activité régulatrice.

Les lymphocytes Tr1 ont besoin d'un contact cellulaire spécifique d'antigène avec la cellule présentatrice pour exercer leur activité suppressive mais une fois activés, ils peuvent réguler la réponse immunitaire de manière non spécifique par l'intermédiaire des cytokines qu'ils sécrètent, indépendamment d'un contact cellulaire (Groux et al., 1997; Roncarolo et al., 2001). Les lymphocytes Tr1 peuvent également éduquer des lymphocytes T $CD4^+$ à devenir régulateurs via la sécrétion d'IL-10.

Les lymphocytes Tr1 semblent jouer un rôle dans la tolérance de greffe allogénique. Ainsi, les lymphocytes T régulateurs exerçant leur activité suppressive par l'intermédiaire de l'IL-10 et du TGF-β ont été isolés chez des patients ayant développé une tolérance spontanée suite à une greffe de rein ou de foie (VanBuskirk et al., 2000). Par ailleurs, l'existence d'un polymorphisme associé à une sécrétion élevée d'IL-10 semble être un facteur protecteur

envers la GvHD (Graft versus Host Disease) après une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Battaglia and Roncarolo, 2006; Lin et al., 2003; Lin et al., 2005).

Lymphocytes Th3

Une autre population T $CD4^+$ régulatrice induite et spécifique d'antigène appelée Th3 a été décrite dans les années 1990. Ces lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs ont été identifiés chez la souris lors de l'étude des mécanismes associés à la tolérance orale. Lorsqu'on administre par voie orale de faibles doses de myéline ou de protéolipides cérébraux à des souris SJL/J, celles-ci ne développent pas d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) (Chen et al., 1994). De plus, la majorité des cellules isolées à partir des ganglions mésentériques de ces souris exercent une activité suppressive *in vitro* et *in vivo* et sécrètent du TGF-β (Chen et al., 1995; Chen et al., 1994). Des cellules régulatrices similaires aux lymphocytes Th3 décrits chez la souris ont également été observés chez l'Homme : l'administration de myéline ou de protéolipides cérébraux par voie orale à des patients souffrant de sclérose en plaques génère des lymphocytes T régulateurs spécifiques d'antigènes et sécrétant du TGF-β (Fukaura et al., 1996a; Fukaura et al., 1996b; Weiner, 2001a; Weiner, 2001b).

Les lymphocytes Th3 sont générés en présence d'IL-4 et de TGF-β, mais les mécanismes d'induction de ces cellules régulatrices sont mal connus (Seder et al., 1998; Weiner, 2001b). Dans certains modèles, des cellules Th3 ont été induites en l'absence d'IL-4. En effet, Powrie et ses collaborateurs ont observé une activité suppressive de lymphocytes Th3 issus de souris IL-4 KO dans un modèle de colite murine (Powrie et al., 1996; Weiner, 2001b).

Les lymphocytes Th3 sont induits de manière antigène spécifique mais exercent une activité régulatrice non spécifique sur les réponses Th1 et Th2 ; ils favorisent également la production d'IgA (Weiner, 2001b). Les lymphocytes Th3 ont un rôle important dans la tolérance de greffe allogénique induite par transfusion des cellules sanguines du donneur (Josien et al., 1998; Weiner, 2001b) ainsi que dans la tolérance induite par voie orale. Leur activité suppressive est exercée par l'intermédiaire du TGF-β (Chen et al., 1994).

4.2.3 Caractéristiques phénotypiques et et synthèse de cytokines des cellules régulatrices

Les LT régulateurs naturels ont tout d'abord été identifiés chez la souris par leur expression constitutive du CD25. Chez l'Homme, les LT régulateurs naturels expriment également le CD25 mais contrairement aux cellules murines où la population $CD4^+$ $CD25^+$ est bien distincte, le marquage du CD25 sur les LT $CD4^+$ humains est « continu » en cytométrie, ne faisant donc pas clairement apparaître deux populations séparées. Ce marquage révèle environ 20 à 30% de cellules $CD4^+$ $CD25^+$ dont seulement 3 à 5 % (cellules exprimant fortement le CD25 dites « $CD25^{high}$ ») ont une activité régulatrice (Baecher-Allan et al., 2001; Wing et al., 2002). De plus, le CD25 n'apparaît pas comme un marqueur optimal des LT régulateurs naturels car il est également exprimé sur les lymphocytes T $CD4^+$ activés. L'isolement des LT régulateurs naturels par rapport à ce marqueur, certes plus facile chez la souris (sauf en présence d'inflammation) que chez l'Homme, n'est donc pas aisé. Par ailleurs, il semblerait que certaines cellules $CD4^+$ $CD25^-$ aient également des propriétés régulatrices (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2002).

Depuis plusieurs années, les travaux de recherche sur les lymphocytes T régulateurs se sont multipliés, en particulier dans le but de trouver d'autres marqueurs pour mieux les caractériser. Chez l'Homme, les LT régulateurs naturels $CD25^{high}$ isolés dans le sang périphérique expriment constitutivement GITR, CD45RO, CTLA-4 intracellulaire, CD71, HLA-DR, CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2), CD132 (chaîne γ du récepteur à l'IL-2), Ox40, PDL-1 et ICOS ; ils semblent également exprimer les récepteurs CCR4 et CCR8 (Levings and Roncarolo, 2005). Ces lymphocytes régulateurs sont également $CD45RB^{low}$ $CD62L^+$ et $CD38^+$ (Wing et al., 2005). Les LT régulateurs naturels humains semblent aussi exprimer LAG3 (lymphocyte activating gene 3) et la neuropiline mais présentent une faible expression de CD127 (chaîne α du récepteur de l'IL-7) (Rouse, 2007). Enfin, contrairement aux LT régulateurs naturels murins, les LT régulateurs naturels humains ne semblent pas exprimer fortement l'intégrine αEβ7 (CD103).

Cependant, aucun de ces marqueurs n'est spécifique des lymphocytes T régulateurs naturels car ils peuvent également être exprimés par les lymphocytes T $CD4^+$ activés. Par exemple, des études montrent que Ox40, qui joue un rôle de co-activateur important des lymphocytes T $CD4^+$ effecteurs, inhibe l'activité suppressive des LT régulateurs après activation (Valzasina et al., 2005; Vu et al., 2004).

En 2003, le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box transcription factor) a été décrit comme étant spécifiquement exprimé par les LT régulateurs naturels et étant essentiel à leur développement (Rouse, 2007). En effet, la souris Scurfy et l'Homme atteint du syndrome

IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked) développent des maladies auto-immunes liées à une déficience en cellules T régulatrices qui serait due à une mutation dans le gène codant Foxp3 (Shevach, 2006). La reconstitution de souris Scurfy avec des cellules $CD4^+$ $CD25^+$ ou l'expression du transgène Foxp3 chez ces souris diminue et éradique les symptômes auto-immuns (Ziegler, 2006). Chez la souris, la corrélation entre l'expression de Foxp3 et de CD25 est excellente, même si quelques cellules (environ 10%) sont $CD25^+$ $Foxp3^-$ ou $CD25^-$ $Foxp3^+$, ce qui permet d'identifier assez facilement les lymphocytes T régulateurs (Shevach, 2006). En revanche, l'expression de Foxp3 n'est pas exclusivement retrouvée chez les cellules $CD4^+$ $CD25^{high}$ chez l'Homme; en effet, certaines cellules $CD25^{int}$ l'expriment aussi. Par ailleurs, l'expression de Foxp3 peut être engendrée par l'activation des cellules $CD4^+$ $CD25^-$ $Foxp3^-$ et $CD8^+$ $CD25^-$ $Foxp3^-$ humaines via le TCR, ce qui n'est pas le cas chez la souris (Shevach, 2006).

Récemment, l'équipe de Sakaguchi a décrit le récepteur du Folate 4 (FR4) comme discriminant dans la caractérisation des lymphocytes T régulateurs naturels (Yamaguchi et al., 2007). En effet, il semblerait que les LT régulateurs naturels murins expriment conjointement des niveaux élevés de FR4 et de CD25 ($CD25^{high}$ $FR4^{high}$), ce qui les différencie des lymphocytes T non régulateurs $FR4^{high}$ $CD25^-$ (cellules T mémoires centrales) et $FR4^{low}$ $CD25^+$ (cellules effectrices et mémoires). Dans ce travail, des PCR réalisées avec des amorces spécifiques de FR4 montrent que ce récepteur est aussi exprimé par les LT régulateurs naturels humains ; cependant, des investigations sont encore nécessaires afin de déterminer si l'expression de ce récepteur en cytométrie est semblable à celle observée chez les lymphocytes murins. Du point de vue de leur profil de sécrétion des cytokines, les Trég naturels sécrètent peu d'IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et d'IFN-γ *in vitro*. En revanche, ils semblent sécréter du TGF-β mais à un niveau non significativement différent de celui produit par des cellules non suppressives (Levings and Roncarolo, 2005). Malgré leur incapacité à produire de l'IL-2, cette cytokine est un facteur clé de croissance et de survie des LT régulateurs naturels. En effet, on ne retrouve pas de LT régulateurs naturels ni dans le thymus ni en périphérie chez des souris IL-2 KO (Papiernik and Banz, 2001). *In vitro*, l'IL-15 semble pouvoir remplacer l'IL-2 pour permettre l'expansion des LT régulateurs, ce qui n'est pas le cas *in vivo* (Levings and Roncarolo, 2005).

En ce qui concerne les lymphocytes Tr1, aucun marqueur spécifique n'a été identifié pour le moment. Contrairement aux LT régulateurs naturels, les lymphocytes Tr1 n'expriment pas CD25 ni Foxp3 de façon constitutive. L'expression de Foxp3 observée dans les

lymphocytes Tr1 est comparable à celle des lymphocytes T $CD4^+$ $CD25^-$ activés (Levings and Roncarolo, 2005; Vieira et al., 2004). Ils expriment des niveaux plus ou moins élevés de CD25, CD40L, CD69, HLA-DR et CTLA-4 intracellulaire. Ils semblent constitutivement exprimer les chaînes β et γ du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 (CD122 et CD132). Les lymphocytes Tr1 murins exprimeraient également GITR et CD103 (intégrine αEβ7) (Levings and Roncarolo, 2005). La caractérisation de ces cellules T régulatrices par l'expression de marqueurs à leur surface est difficile. Les lymphocytes Tr1 sont caractérisés par un profil de sécrétion de cytokines particulier : ils sécrètent de l'IL-10, du TGF-β et de l'IL-5. Ils peuvent produire de faibles quantités d'IL-2 et ne sécrètent pas d'IL-4. Contrairement aux lymphocytes Tr1 murins, les lymphocytes Tr1 humains peuvent aussi produire de l'IFN-γ, mais en quantité plus faible (environ dix fois moins) que les lymphocytes Th1 (Levings and Roncarolo, 2005).

Quant aux lymphocytes Th3, ils sont essentiellement caractérisés par leur sécrétion importante de TGF-β. Ces cellules produisent également des quantités variables d'IL-4 et d'IL-10 après activation spécifique d'antigène et expriment la molécule CTLA-4 à leur surface, dont l'activation engendre la sécrétion de TGF-β (Weiner, 2001b). Il est également probable que les Th3 expriment la molécule αEβ7, intégrine fortement exprimée par les lymphocytes qui colonisent les muqueuses, ainsi que le récepteur de chimiokine CCR9 (Weiner, 2001b).

4.2.4 Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs

La fonction principale des lymphocytes T régulateurs étant de supprimer la fonction effectrice des lymphocytes T, de nombreuses équipes se sont appliquées à identifier les différents mécanismes d'action mis en jeu par ces Trég pour exercer leur fonction suppressive. Les nombreux mécanismes utilisés par les Trég peuvent être regroupés en 4 grands groupes : suppression par des cytokines inhibitrices (IL-10, TGF-β et IL-35), suppression par contact cellulaire direct avec la cible (cytolyse ou molécules membranaires ayant une action inhibitrice sur la cible), suppression par altération métabolique qui est liée à une déprivation en IL-2, le transfert de l'AMPc ou le relargage d'adénosine et enfin suppression par action sur les cellules dendritiques (**Figure 13**). Tous ces mécanismes vont être plus amplement détaillés dans les paragraphes suivants.

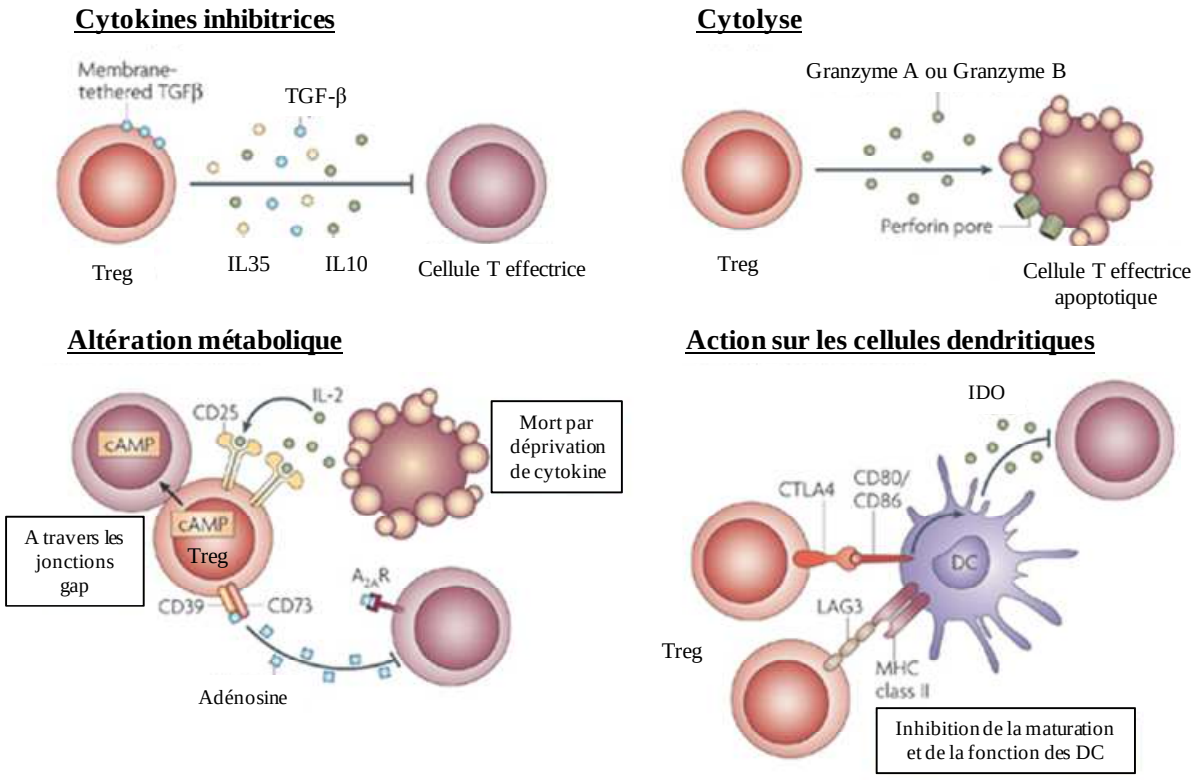


Figure 13: Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs (d'après Vignali *et al.*, Nature Review Immunol 2008)

Suppression par les cytokines inhibitrices :

L'importance de la cytokine inhibitrice IL-10 dans la fonction suppressive des Trég naturels dérivés du thymus fait débat. En effet, des études *in vitro* utilisant des anticorps neutralisants ou des cellules T incapables de produire de l'IL-10 démontrent que cette cytokine n'est pas essentielle à la fonction des Trég (Jonuleit et al., 2001; Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Cependant, ceci est en contradiction avec des résultats obtenus *in vivo* (Annacker et al., 2003; Hawrylowicz and O'Garra, 2005). Des modèles d'asthme et d'allergie suggèrent qu'à la fois les Trég naturels et les Trég induits antigène-spécifiques contrôlent ces maladies de manière IL-10 dépendante (Hawrylowicz and O'Garra, 2005). Il a également été montré que l'IL-10 était cruciale pour le contrôle de certaines infections pour lesquelles les Trég sont impliqués comme *Mycobacterium tuberculosis* (Kursar et al., 2007), *Toxoplasma gondii* (Jankovic et al., 2007), *Leishmania major (Anderson et al., 2007)* and *Trichinella spiralis* (Beiting et al., 2007). Cependant, les Trég n'étaient pas la source d'IL-10 dans ces modèles. Par contre, l'IL-10 est requise pour le contrôle des colites murines (Asseman et al., 1999) et pour le blocage de l'immunité antitumorale (Loser et al.,

2007). L'IL-10 produite par les Trég peut aussi être importante pour l'induction de tolérance dans un modèle d'hépatite générée par la concavaline A (Erhardt et al., 2007) et pour la tolérance vis-à-vis de superantigènes bactériens et viraux (Ivars, 1992). Finalement, la production d'IL-10 par les Trég comme un mécanisme de suppression est surtout dépendant de l'organisme cible et du modèle expérimental.

Bien que certaines études faites *in vitro* avec des anticorps bloquants anti TGF-β ou des Trég ne produisant pas de TGF-β indiquent que cette cytokine n'est pas requise pour la fonction des Trég naturels (Piccirillo et al., 2002; Takahashi et al., 1998), d'autres études réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo* suggèrent un rôle crucial du TGF-β membranaire des Trég (Green et al., 2003; Nakamura et al., 2001). Ainsi, le TGF-β produit par les Trég a été montré comme étant important dans le contrôle de la réponse immune à *Mycobacterium tuberculosis* (Kursar et al., 2007), la suppression des réponses allergiques (Joetham et al., 2007) et dans la prévention des colites dans un modèle d'inflammation du tube digestif murin (Li et al., 2007). De manière intéressante, cette cytokine limite également l'immunité antitumorale dans un modèle de carcinome (Strauss et al., 2007a) et dans le lymphome folliculaire (Hilchey et al., 2007) en rendant les cellules T insensibles à la tumeur. Le TGF-β membranaire est aussi impliqué dans la fonction suppressive des Trég via un contact cellulaire (Nakamura et al., 2001). Les Trég sont ainsi capables de contrôler l'infiltration des cellules T $CD8^+$ dans les îlots pancréatiques et de retarder la progression du diabète grâce au TGF-β membranaire (Green et al., 2003). Par conséquent, il apparaît maintenant clair que le TGF-β soluble et/ou membranaire possède un rôle dans la fonction des Trég naturels.

Récemment, une nouvelle cytokine inhibitrice, l'IL-35, a été décrite comme étant préférentiellement exprimée par les Trég et requise pour une activité suppressive maximale (Collison et al., 2007). L'IL-35 est un membre de la famille hétérodimérique de l'IL-12 et est composée de la sous-unité EBI3 (Epstein-Barr-virus-Induced gene 3) et de p35 (chaîne α de l'IL-12). Son récepteur n'est pas décrit pour le moment.

<u>Suppression par cytolyse</u> :

La cytolyse médiée par la sécrétion des molécules granzymes a longtemps été associée aux cellules NK et aux lymphocytes T $CD8^+$ (CTL) (Lieberman, 2003). Cependant, les lymphocytes T régulateurs $CD4^+$ humains peuvent également exercer une activité cytolytique *in vivo* grâce au granzyme A et à la perforine (Grossman et al., 2004b; Puccetti and Grohmann, 2007). Les Trég sont également capables d'inhiber la capacité des cellules NK et des CTL à éliminer les tumeurs en « tuant » ces cellules de manière granzyme B-dépendante

et partiellement perforine-dépendante (Cao et al., 2007). D'autres études suggèrent que les Trég activés induisent l'apoptose des cellules T effectrices par la voie TRAIL-DR5 (tumor-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing-ligand-death-receptor 5) (Ren et al., 2007). De plus, la galectine 1 qui peut induire l'apoptose des cellules T a été montrée pour être up-régulée par les Trég humains et murins (Garin et al., 2007).

Suppression par altération métabolique :

La consommation de l'IL-2 locale par les Trég, due entre autres à leur forte expression de CD25, peut induire l'apoptose des cellules effectrices qui se retrouvent avec trop peu d'IL-2 pour survivre (Pandiyan et al., 2007). Deux nouveaux mécanismes ont été décrits depuis comme le relargage intracellulaire ou extracellulaire de l'adénosine et le transfert d'AMPc. Ainsi, les Trég expriment les ectoenzymes CD39 et CD73 afin de générer de l'adénosine péricellulaire qui est capable de supprimer la fonction effectrice des cellules T via l'activation du récepteur à l'adénosine $A_{2A}R$ (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007; Kobie et al., 2006). De plus, les Trég semblent pouvoir inhiber directement la fonction effectrice des cellules T en transférant l'AMPc (second messager inhibiteur) dans les lymphocytes T effecteurs grâce à des jonctions gap membranaires (Bopp et al., 2007).

Suppression par action sur les cellules dendritiques :

En plus de l'effet direct des Trég sur la fonction des cellules effectrices, les cellules T régulatrices peuvent également moduler la maturation et la fonction des DC, qui sont requises pour l'activation des cellules T effectrices. Peu de choses sont connues sur l'impact des Trég sur les DC. Cependant, certaines études ont tout de même rapportées les effets suppresseurs *in vitro* des Trég naturels sur les DC murines et humaines mais également *in vivo* (Tang et al., 2006). Ce phénomène inclut la down-régulation de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II, la diminution de la fonction de présentation antigénique dans une MLR et la modification de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-6 et TNF-α (Bayry et al., 2007; Cederbom et al., 2000; Liang et al., 2008; Mahnke et al., 2007; Misra et al., 2004; Oderup et al., 2006; Onishi et al., 2008; Veldhoen et al., 2006). Les mécanismes précis impliqués dans ce processus ne sont pas connus mais cette modulation peut impliquer des facteurs solubles (IL-10 et TGF-β) ou des molécules de surface exprimées par les Trég.

Ainsi, les Trég forment des agrégats autour de la DC grâce à un mécanisme dépendant de LFA-1 (Onishi et al., 2008) puis entraînent de façon spécifique la diminution d'expression

des molécules de costimulation CD80/CD86 via un phénomène dépendant de LFA-1 et CTLA-4 (Onishi et al., 2008). L'interaction des Trég avec les DC altère leur capacité à maintenir une interaction de longue durée avec les cellules T effectrices (Tadokoro et al., 2006) : la molécule CTLA-4 semble jouer un rôle dans ce processus (Oderup et al., 2006). Il a également été montré que les Trég peuvent interagir via CTLA-4 avec les molécules de costimulation CD80/CD86 des DC afin d'induire l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), une molécule immunosuppressive qui est connue pour induire la production de métabolites pro-apoptotiques à partir du tryptophane, résultant ainsi dans la suppression des cellules T effectrices (Fallarino et al., 2003; Mellor and Munn, 2004). D'autres études suggèrent que LAG-3 (Lymphocyte Activating Gene 3 ou CD223) exprimée par les Trég peut bloquer la maturation des DC humaines (Bayry et al., 2007) et murines (Liang et al., 2008). Enfin, une autre étude récente met en évidence que la neuropiline 1 exprimée par les Trég prolonge leurs interactions avec les DC immatures (Sarris et al., 2008). Finalement, une interaction mutuelle entre les Trég et les DC permet le maintien de l'immunosuppression.

4.2.4 Les lymphocytes T régulateurs non CD4$^+$

Les lymphocytes T CD8$^+$ suppresseurs

C'est en 1971 que Gershon et Kondo suspectent pour la première fois une activité suppressive des lymphocytes T CD8$^+$ (Filaci and Suciu-Foca, 2002). Néanmoins, comme pour les lymphocytes T CD4$^+$ CD25$^+$, ce n'est que vingt ans plus tard que leurs résultats ont été confirmés par d'autres équipes et que le concept de lymphocytes T CD8$^+$ suppresseurs (Ts) est réapparu. Les cellules T CD8$^+$ suppressives semblent jouer un rôle régulateur dans les maladies autoimmunes, en transplantation et dans la protection contre le cancer (Fowler et al., 1996; Martin, 1993; Najafian et al., 2003).

Les lymphocytes T suppresseurs CD8$^+$ sont caractérisés par l'absence d'expression de CD28. Quatre populations de lymphocytes Ts CD8$^+$ ont été décrites chez l'Homme (Filaci and Suciu-Foca, 2002).

On trouve les lymphocytes T suppresseurs CD8$^+$ CD28$^-$ de type 1 qui inhibent les réponses T CD4$^+$ spécifiques d'antigène. Ils sont générés *in vitro* suite à des stimulations répétées avec des cellules présentatrices d'antigène. Ces lymphocytes Ts exercent leur activité régulatrice après avoir spécifiquement reconnu les antigènes présentés par les cellules dendritiques dans un contexte de CMH de classe I. Cette interaction a pour conséquence l'inhibition d'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et au contraire

l'augmentation d'expression des molécules « tolérogènes » ILT3 et ILT4 à la surface de la cellule dendritique (Chang et al., 2002). L'activité suppressive des lymphocytes Ts $CD8^+$ sur la réponse T $CD4^+$ est donc médiée par les cellules dendritiques ; l'altération de l'expression des molécules de co-stimulation à la surface de la cellule dendritique par les lymphocytes Ts résulte en une non activation des lymphocytes T $CD4^+$ (Filaci and Suciu-Foca, 2002). Il semblerait que cette modification d'expression des molécules de surface des cellules dendritiques par les lymphocytes Ts soit corrélée avec une absence de rejet aigu chez des patients transplantés (Chang et al., 2002; Ciubotariu et al., 2001).

Il y a également les lymphocytes T suppresseurs $CD8^+$ $CD28^-$ de type 2 qui inhibent la prolifération des cellules T mais aussi la lyse exercée par les cellules cytotoxiques. Ils sont générés *in vitro* après activation par des monocytes en présence d'IL-2 et de GM-CSF pendant une semaine. Leur activité suppressive ne nécessite pas d'interaction avec les cellules présentatrices d'antigène ; elle est médiée par des facteurs solubles, notamment l'IFN-γ et l'IL-6 (Filaci and Suciu-Foca, 2002).

Les lymphocytes T suppresseurs de type 3 sont eux moins bien caractérisés. Ils seraient induits par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et leur activité suppressive semble médiée par l'IL-10 (Gilliet and Liu, 2002).

Enfin, les cellules T $CD8^+$ $CD25^+$ dérivées du thymus, appelées « nTreg-like » car similaires aux LT régulateurs naturels $CD4^+$ $CD25^+$, ont été décrites plus récemment. Ces cellules ont été caractérisées à partir de thymus humains. Elles expriment les ARNm de Foxp3, GITR et CTLA-4. Elles prolifèrent peu et inhibent la prolifération de LT $CD4^+$ $CD25^-$ par l'intermédiaire d'un contact cellulaire. Les molécules CTLA-4 et TGF-β exprimées à la surface des LT $CD8^+$ $CD25^+$ régulateurs semblent responsables de leur activité suppressive. Les LT $CD8^+$ $CD25^+$ régulateurs inhibent l'expression du CD25 à la surface de leurs cellules cibles (Cosmi et al., 2003; Lan et al., 2005).

Les cellules NKT régulatrices

Les cellules NKT (Natural Killer T) expriment à la fois des récepteurs de cellules NK comme le CD161 (NK1.1) et un TCR semi-invariant, composé d'une chaîne α invariante (Vα14-Jα28 chez la souris, Vα24-Jα18 (JαQ) chez l'Homme) et d'une chaîne β peu variable. Chez l'Homme, la plupart des cellules NKT expriment Vα24-Jα18 avec Vβ11 (Lisbonne and Leite-de-Moraes, 2003). Les cellules NKT ont donc un répertoire TCR restreint en comparaison avec les lymphocytes T, c'est pourquoi on les appelle souvent « cellules NKT invariantes ». On les retrouve en abondance au niveau du foie, de la rate et de la moelle

osseuse où elles représentent respectivement 30 à 40%, 2 à 3% et 10 à 20% des lymphocytes T chez la souris, un peu moins chez l'Homme. Les cellules NKT reconnaissent les antigènes glycolipidiques tels que le α-galactosyl-ceramide (α-GalCer) ou les glycosphingolipides bactériens présentés par la molécule du CMH de classe I non classique CD1d (La Cava et al., 2006).

Bien que la majorité des cellules NKT exprime le CD4, la plupart de ces cellules au repos n'expriment ni le CD4 ni le CD8 (une sous-population de cellules NKT $CD8^+$ existe chez l'Homme mais pas chez la souris) (La Cava et al., 2006). Chez l'Homme, les cellules NKT $CD4^-CD8^-$ sécrètent exclusivement des cytokines de type Th1 (IFN-γ, TNF-α) alors que les cellules NKT $CD4^+$ peuvent à la fois produire des cytokines de type Th1 et Th2 (Lisbonne and Leite-de-Moraes, 2003).

Les cellules NKT sont capables de réguler la réponse immunitaire ; elles inhibent la prolifération et la sécrétion de cytokines de leurs cellules cibles (LT $CD4^+$ Th1 et Th2, LT $CD8^+$) et exercent également une activité régulatrice sur les cellules dendritiques. Des études montrent que les cellules NKT et les lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+$ peuvent mutuellement s'influencer (La Cava et al., 2006). En effet, dans un modèle de tolérance orale chez la souris, les cellules NKT $CD4^+$ semblent nécessaires à la génération de LT régulateurs puisqu'il n'y a pas d'induction de LT régulateurs chez des souris Jα18 KO, déficientes en cellules NKT. Dans un autre modèle expérimental, l'activation de cellules NKT *in vivo* avec α-GalCer protège les souris de la myasthénie. Cette protection est corrélée à l'expansion de LT régulateurs périphériques. De plus, les cellules NKT activées par α-GalCer produisent de l'IL-2 qui entraîne la prolifération des LT régulateurs *ex vivo* en présence de cellules dendritiques allogéniques. Ces LT régulateurs ont toujours une activité suppressive et expriment fortement le CTLA-4 après avoir proliféré. D'autre part, les LT régulateurs $CD4^+$ $CD25^+$ humains peuvent inhiber la prolifération, la sécrétion de cytokines ainsi que l'activité cytotoxique des cellules NKT. Cette activité régulatrice est médiée par un contact cellulaire et non par des facteurs solubles (La Cava et al., 2006).

Les cellules NKT semblent jouer un rôle dans le maintien de la tolérance au Soi. En effet, on retrouve moins de cellules Vα24-Jα18 dans le sang périphérique de patients présentant un diabète de type I ou une sclérose en plaques que dans celui de sujets sains. De même, les cellules Vα14 sont moins nombreuses et ont une fonction altérée chez les souris NOD (non-obese diabetic) ainsi que chez des souris prédisposées à l'EAE. Le transfert adoptif de cellules NKT à des souris NOD déficientes en ce type cellulaire leur confère une protection partielle vis-à-vis du diabète. De plus, l'administration de α-GalCer aux souris

NOD les protège du diabète ; des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle de l'EAE (Lisbonne and Leite-de-Moraes, 2003).

En transplantation, le transfert adoptif de cellules NKT Vα14 à des souris C57BL/6 déficientes en lymphocytes NKT Vα14 permet la tolérance d'une xénogreffe d'ilôts pancréatiques de rats. Plusieurs études rapportent également un rôle des cellules NKT dans l'induction de tolérance dans le modèle de l'ACAID (Anterior Chamber Associated Immune Deviation ; introduction d'Ag dans l'œil) ainsi que dans la tolérance orale chez la souris (Margalit and Ilan, 2005).

4.3 Les cellules dendritiques tolérogènes

On sait maintenant que les DC ont un rôle prépondérant dans l'induction de la tolérance. On a pendant longtemps considéré que seules les DC immatures pouvaient induire de la tolérance et que les DC matures généraient une réponse immune effectrice. Ce concept n'est plus valable actuellement.

4.3.1 Concept des cellules dendritiques tolérogènes

Nous avons vu précédemment que les DC, après activation par différents signaux de « danger » inhérents à une infection ou une inflammation, vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour induire une réponse immune effectrice. En condition normale sans pathogène ni inflammation, une migration spontanée des DC vers les organes lymphoïdes secondaires se produit également. Par exemple, les cellules de Langerhans quittent la peau après la perte de molécules d'ancrage comme la E-cadhérine et induisent l'expression de CCR7 permettant le guidage de ces cellules vers les ganglions en l'absence de toute infection (Jiang et al., 2007; Randolph, 2001). De même, des DC semblent capables de transporter, à l'état stable, des cellules apoptotiques épithéliales vers la zone T des ganglions mésentériques suggérant ainsi un rôle dans l'induction et le maintien de la tolérance périphérique intestinale (Huang et al., 2000). Ces cellules ne sont pas des DC immatures et ont atteint un certain degré d'activation car elles expriment les molécules de co-stimulation CD80/CD86, le CMH-II et le CCR7 (Ip and Lau, 2004; Jiang et al., 2007; Stoitzner et al., 2003). Ces cellules migratoires sont chargées avec des antigènes tissulaires probablement

internalisés par phagocytose. Par ce biais, des antigènes du Soi sont donc transportés jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires pour une induction de tolérance. En effet, ces DC ont migré et ont maturé en absence de danger et ne semblent pas synthétiser de cytokines inflammatoires nécessaires à l'induction d'une immunité (Jiang et al., 2007).

4.3.2 Manipulation des cellules dendritiques pour promouvoir la tolérance

La manipulation des DC *in vitro* par des agents anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs peut générer des DC dans un état appelé parfois « semi mature » qui ont des propriétés dites «pro-tolérogènes » (**Figure 14**). Ces agents ciblent la différenciation et la fonction des DC par différents mécanismes (Hackstein and Thomson, 2004) et incluent notamment l'IL-10 (Nolan et al., 2004; Steinbrink et al., 2002), le TGF-β (Geissmann et al., 1999; Lu et al., 1999; Strobl and Knapp, 1999), les inducteurs d'AMPc comme la PGE2 (Vassiliou et al., 2003), l'histamine (Caron G, J Immunol. 2001), les agonistes β2, les neuropeptides (Delgado, 2009; Gonzalez-Rey et al., 2006) , la vitamine D3 (Pedersen et al., 2004; Penna and Adorini, 2000), la glucosamine, les ligands des molécules inhibitrices ILT comme HLA-G (Liang S, PNAS 2008 ; Le Friec G, Hum Immunol 2003) ou encore la protoporphyrine de cobalt (Chauveau et al., 2005). De plus, les effets des traitements immunosuppresseurs comme les corticostéroïdes (de Jong, 1999 ; Rea et al., 2000 ; Woltman Am Eur J Immunol 2000), la cyclosporine (Duperrier et al., 2002; Lee et al., 1999), le tacrolimus (Shimizu et al., 2000; Steinschulte et al., 2003), la rapamycine (Taner, 2005 ; Turnquist 2007), l'aspirine (Hackstein et al., 2001; Matasic et al., 2000), le deoxyspergualine (DSG) (Thomas JM Transplantation 1999 ; Yang J JLB 2003), le MMF (Lagaraine et al., 2005) et la sanglifehrine A (Steinschulte et al., 2003) ont été largement étudiés sur la différenciation et la fonction des DC. Toutes ces molécules réduisent la maturation et/ou l'activation des DC ou empêchent les DC de produire de l'IL-12p70. Par ailleurs, certains de ces agents inhibent la translocation nucléaire des membres de la famille de NF-κB qui sont indispensables à la différenciation des DC (Chauveau et al., 2005; Hackstein and Thomson, 2004; Morelli and Thomson, 2003).

Certaines avancées technologiques dans le transfert de gènes ont permis d'augmenter le potentiel tolérogène des DC. En effet, ces DC sont génétiquement manipulées afin d'exprimer des molécules dites « immunosuppressives » comme l'IL-10, le TGF-β ou la protéine de fusion CTLA-4 Ig (Sun et al., 2003; Vacca et al., 2005) ce qui conduit à

l'inhibition ou au blocage de l'expression des molécules de co-stimulation. Ces procédés génétiques peuvent également inclure l'expression de la forme dominante négative IKK2 (IκB-Kinase 2) empêchant l'activation de NF-κB (Tan et al., 2005), l'expression d'IDO pour inhiber la prolifération des cellules T allogéniques ou encore l'expression de CD95L (Chuang et al., 2006) pour promouvoir la délétion des cellules T antigène-spécifiques. Enfin, Hill et collaborateurs ont rapporté que les DC murines dans lesquelles la production d'IL-12 était éteinte par RNA interférence possédaient une capacité allostimulatrice diminuée mais induisaient l'orientation des cellules T vers un profil Th2 de manière antigène spécifique (Hill et al., 2003).

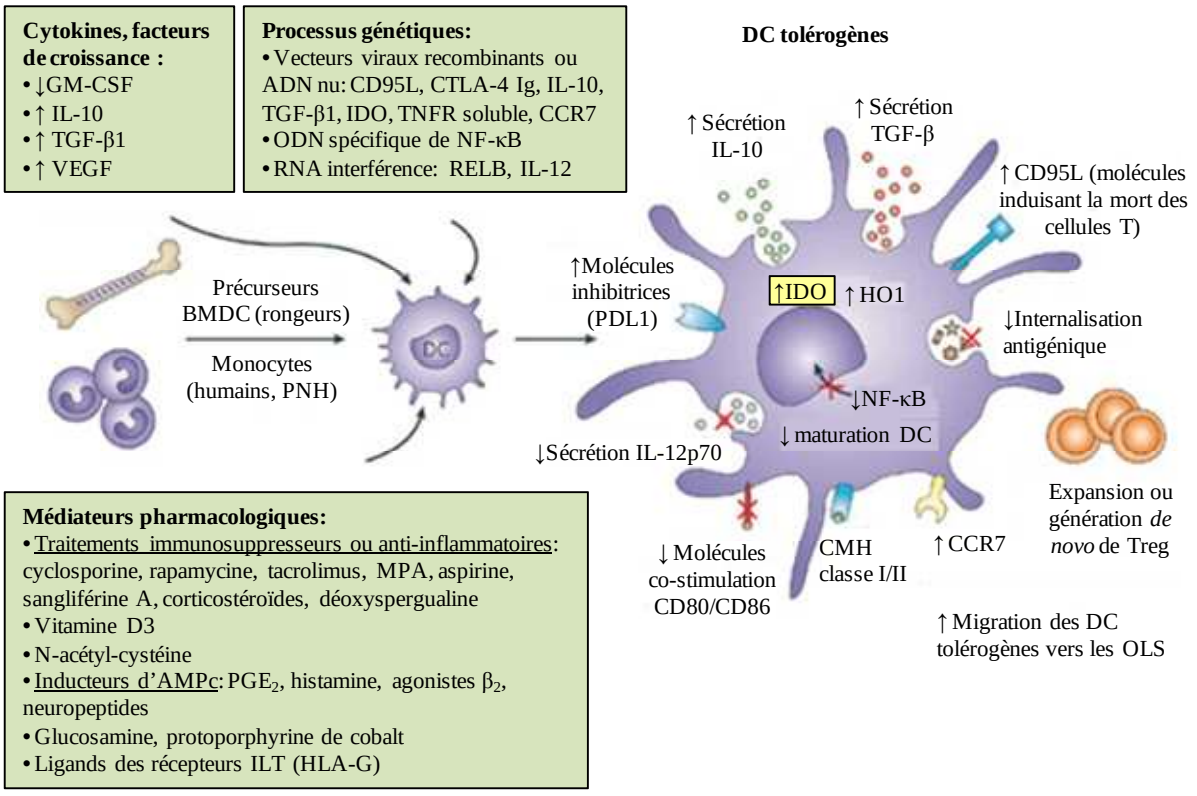


Figure 14: Génération de DC tolérogènes *in vitro* (d'après Morelli *et al.*, Nature Review Immunol 2007)

4.3.3 Caractéristiques des cellules dendritiques tolérogènes

Les DC dites « tolérogènes » peuvent produire des cytokines connues pour être anti-inflammatoires et pro-tolérogènes comme l'IL-10 et le TGF-β (Coombes et al., 2007), et ainsi favoriser l'activation et / ou l'émergence de lymphocytes T régulateurs. Bien qu'aucun marqueur spécifique des DC tolérogènes ne soit décrit, l'expression des molécules ILT3 et ILT4, exprimées essentiellement sur les monocytes, macrophages et cellules dendritiques, a été associée à des DC tolérogènes. Les cellules dendritiques exprimant fortement les molécules ILT3 et ILT4 induisent une anergie des cellules T (Chang et al., 2002; Manavalan et al., 2003). L'expression de la molécule IDO a également été associée à certaines DC dites « tolérogènes ». Il s'agit d'une enzyme clé du catabolisme du tryptophane qui entraîne une déplétion du milieu en tryptophane ainsi que l'arrêt de la prolifération des cellules T car le tryptophane est un acide aminé essentiel à leur prolifération (Mellor and Munn, 2004; Munn et al., 2002). Ces lymphocytes T activés dont leur prolifération est inhibée par IDO sont bloqués en phase G1 du cycle cellulaire et sont plus sensibles à l'apoptose (Lee et al., 2002b). Une étude récente a également démontré qu'une faible proportion de DC plasmacytoïdes murines activées par du CpG, ligand de TLR9, sécrétant la molécule IDO empêchait la conversion des lymphocytes T régulateurs en lymphocytes effeccteurs Th17 (Baban et al., 2009).

L'expression de cette molécule est induite dans les DC par la PGE_2, l'IFNγ et CTLA-4 (Braun et al., 2005; Grohmann et al., 2002; Mellor and Munn, 2004). Ceci implique que des cellules exprimant CTLA-4 (comme les Treg) peuvent induire l'expression d'IDO sur les DC, qui à leur tour deviennent tolérogènes et peuvent potentialiser l'action des Trég en limitant la prolifération des lymphocytes T effecteurs (**Tableau I**).

Tableau I: Résumé des caractéristiques des cellules dendritiques tolérogènes

Phénotype	Cytokines	Fonction
↓ molécules costimulation (CD80, CD86…)	↑ IL-10	↑ mort par apoptose des LT effecteurs
↑ molécules inhibitrices (PDL-1, ILT3, ILT4…)	↑ IDO	Génération ou expansion de Trég naturels ou adaptatifs alloantigène-spécifiques
↑ CCR7	↓ IL-12	Résistance à la maturation en réponse aux « signaux dangers » (HMGB1, TLR, CD40L…)

Les DC tolérogènes présentent les antigènes aux cellules T spécifiques d'antigènes mais échouent dans la délivrance d'un signal complet de costimulation ou éventuellement procurent un signal inhibiteur pour l'activation et la prolifération des cellules T. Cette absence d'activation efficace peut se manifester par la mort de la cellule T, l'anergie ou la génération de cellules T régulatrices (Morelli and Thomson, 2007). Ces différentes observations laissent penser que le microenvironnement dans lequel la DC a internalisé et présenté l'antigène influence grandement sur la capacité immunogène ou tolérogène de ces cellules.

IV. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans le processus de rejet de greffe tout comme dans celui de la tolérance aux transplantations. La grande plasticité des DC ouvre un champ d'investigation pour une thérapie cellulaire potentielle par des DC dites « pro-tolérogènes » afin de moduler la réponse immune. Pour ce faire, nous avons testé l'effet de l'acide mycophénolique *in vitro* sur les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes. Nous avons montré que le MPA diminue le phénotype de maturation des DC sans modifier leur capacité de migration et en maintenant leur capacité d'endocytose. De plus, les cellules dendritiques traitées par le MPA produisent plus d'IL-10 et moins d'IL-12p70 que des cellules dendritiques traitées avec du TNF-α (Lagaraine et al., 2005).

Dans un premier temps, nous avons souhaité approfondir l'étude de l'action de l'acide mycophénolique sur les cellules dendritiques humaines en étudiant différentes voies de signalisation impliquées dans la maturation et la fonction des DC.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets potentiels des DC prétraitées par le MPA sur les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ allogéniques.

Dans la mesure où les lymphocytes T régulateurs apparaissent comme un outil prometteur pour l'induction d'une tolérance immune spécifique en transplantation, la troisième partie de ce travail a consisté à déterminer si les cellules dendritiques humaines traitées avec le MPA peuvent induire des lymphocytes T régulateurs *in vitro*.

Suite aux résultats obtenus concernant l'induction de Trég par des DC traitées au MPA, nous avons plus amplement étudié l'impact de ces Trég sur la fonction de différentes populations de cellules immunitaires, à savoir les cellules dendritiques et les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques.

Enfin, nous avons également étudié si des cellules dendritiques traitées par d'autres immunosuppresseurs comme la rapamycine pouvaient générer des LT régulateurs *in vitro*.

Travaux personnels

1. L'acide mycophénolique inhibe la capacité des cellules dendritiques humaines à induire des lymphocytes T CD8$^+$ allogéniques cytotoxiques via l'inhibition de la synthèse d'IFN-γ dans les DC

Situation :

Les cellules T cytotoxiques sont un frein significatif à l'établissement et au maintien à long terme d'une allogreffe (Csencsits and Bishop, 2003; Le Moine and Goldman, 2003). En effet, de nombreuses études ont montré que les cellules CD8$^+$ responsables du rejet étaient résistantes aux stratégies immunothérapeutiques (Bumgardner et al., 2000; Guo et al., 2001; Newell et al., 1999; Trambley et al., 1999; Wang et al., 2003). Ainsi, trouver de nouvelles stratégies pour contrôler l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8$^+$ pourrait avoir d'importantes implications en transplantation.

Les signaux requis pour le développement et la fonction des cellules T CD8$^+$ ne sont pas complètement décrits mais il existe 2 voies distinctes pour générer une réponse T cytotoxique à partir de LT CD8$^+$ naïfs. Il a été montré que les LT CD4$^+$ auxiliaires étaient essentiels pour le développement des lymphocytes T cytotoxiques (Cardin et al., 1996; Flano et al., 1999; Stohlman et al., 1998; von Herrath et al., 1996; Wild et al., 1999; Zajac et al., 1998) mais la présence du "help" n'est pas indispensable et peut-être remplacée par d'autres signaux (Andreasen et al., 2000; Larsson et al., 2000; Santodonato et al., 2003; Shedlock et al., 2003). De plus, en transplantation, certaines études ont mis en évidence des rejets de greffe médiés par les LT CD8$^+$ indépendamment des cellules T CD4$^+$ (Gelman et al., 2008; Habiro et al., 2005; Haskova et al., 2000; Jones et al., 2006; Vu et al., 2004).

Les cellules dendritiques (DC) sont les principales cellules professionnelles présentatrices d'antigène impliquées dans l'initiation des réponses T CD8 (Banchereau et al., 2000; Condon et al., 1996; Inaba and Steinman, 1987; Kast et al., 1988). Au niveau des tissus périphériques, le contact des DC avec des médiateurs inflammatoires (TNF-α) ou des produits microbiens (LPS) entraîne leur maturation et leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires où les DC sont capables d'activer efficacement les LT (Banchereau and Steinman, 1998; Steinman, 1991). Cependant, certaines DC peuvent également down-réguler les réponses lymphocytaires T (Roncarolo et al., 2001) et certains agents peuvent être utilisés pour induire des DC tolérogènes (Morelli and Thomson, 2007). Parmi ces agents, l'acide

mycophénolique (MPA), métabolite actif du mycophénolate mofétil couramment utilisé en transplantation et dans les maladies autoimmunes (Adu et al., 2001; Mele and Halloran, 2000) inhibe l'inosine 5'-monophosphate déhydrogénase (IMPDH) impliquée dans la synthèse *de novo* des nucléotides guanosine.

Objectifs et résumé des résultats :

Au laboratoire, nous avons précédemment démontré que les DC traitées avec du MPA (DC-MPA) avaient une faible capacité allostimulatrice des cellules $CD4^+$ (Lagaraine et al., 2005). Toutefois, leur capacité à activer des cellules T $CD8^+$ cytotoxiques n'a jamais été reportée chez l'homme. Etant donné que les DC humaines peuvent activer la fonction cytotoxique des cellules T $CD8^+$ indépendamment des cellules T $CD4^+$ « helper » (Lunsford et al., 2006; Young and Steinman, 1990), nous avons voulu savoir comment le MPA pouvait affecter la capacité des DC à induire une différenciation des cellules T $CD8^+$ allogéniques en lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques effecteurs, et cela en l'absence de lymphocytes T $CD4^+$.

Pour réaliser cette étude, les cellules T $CD8^+$ ont été purifiées à partir du sang périphérique et ont été mises en coculture avec des DC traitées au MPA provenant d'un autre donneur afin de mimer *in vitro* une situation de greffe entre le donneur et le receveur du greffon. Nous avons ensuite analysé d'un point de vue de leur phénotype, de leur capacité à proliférer et de leur fonctionnalité (fonction cytotoxique et profil de sécrétion des cytokines) les lymphocytes T $CD8^+$. L'activation de cellules T $CD8^+$ mémoires alloréactives apparaît comme étant un obstacle majeur pour l'induction d'une tolérance (Akbar et al., 1990; Csencsits and Bishop, 2003; Le Moine and Goldman, 2003; Yang et al., 2007b). De plus, la fréquence élevée des cellules T mémoires chez l'adulte peut être l'une des raisons pour lesquelles les stratégies d'induction de tolérance ont échoué chez les primates (Adams et al., 2003). C'est pourquoi, il est primordial d'étudier également les effets des DC-MPA sur le phénotype et la fonctionnalité des cellules T $CD8^+$ naïves ($CD45RA^+$) et des cellules T $CD8^+$ mémoires ($CD45RO^+$).

Les résultats obtenus mettent en évidence que les cellules dendritiques traitées avec du MPA sont incapables d'activer efficacement les lymphocytes T $CD8^+$ naïfs et mémoires. Cette faible activation entraîne une diminution de la fonction cytotoxique des $CD8^+$ caractérisée par une baisse de la lyse des cellules cibles ainsi que par une diminution d'expression des différentes protéines associées à la cytotoxicité comme la perforine et les granzymes. Nous démontrons également que les DC traitées au MPA induisent des cellules T

$CD8^+$ anergiques qui sécrètent des quantités importantes d'IL-4, IL-5, IL-10 et TGF-β. Enfin, la diminution de synthèse d'IFN-γ dans les DC après traitement au MPA joue un rôle important dans l'induction de l'hyporéponse des LT $CD8^+$.

Ainsi, ces résultats pourraient être une nouvelle approche pour moduler l'allo-réponse cytotoxique des LT $CD8^+$ afin de promouvoir la tolérance d'allogreffe.

Article soumis dans « Blood »

MYCOPHENOLIC ACID DISABLES HUMAN DENDRITIC CELLS TO INDUCE ALLOGENEIC CYTOTOXIC CD8$^+$ T CELLS THROUGH INHIBITION OF INTERFERON GAMMA SYNTHESIS IN DENDRITIC CELLS

Roxane LEMOINE*, Florence VELGE-ROUSSEL*†, Hubert NIVET*‡, Yvon LEBRANCHU*‡ and Christophe BARON*‡

Author affiliation:

* UPRES EA 4245 "Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes", UFR de Médecine, IFR 136, Université François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex, FRANCE

† UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, FRANCE

‡ Service de Néphrologie et d'Immunologie Clinique, CHRU de Tours, 2 bis Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, FRANCE

Address correspondence to Roxane LEMOINE Université François Rabelais, EA 4245 « Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes », UFR de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France.

Telephone: +33 2 47 36 61 22; Fax: +33 2 47 36 61 47; e- mail: roxlem@orange.fr

Running title: MPA-DC induce anergic CD8$^+$ T cells

Abbreviations used in this paper : DC, dendritic cell ; MPA, mycophenolic acid

Estimating Manuscript Length : 55077 characters for the text and 33800 characters for figures

ABSTRACT :

Treatment with LPS induces maturation of dendritic cells (DC), resulting in strong T cell immunity. We have previously shown that adding mycophenolic acid (MPA) during maturation with LPS (MPA-DC) impairs the ability of DC to activate allogeneic $CD4^+$ T cells. In this study, we compared the ability of MPA-DC to activate purified allogeneic naive and memory $CD8^+$ T cells with DC treated with LPS alone. After 6 days of co-culture, we found that MPA-DC induced an antigen-specific $CD8^+$ T cell hypoproliferative response in both naive and memory compartments. This hyporesponsiveness could be prevented and abrogated by exogenous IL-2, suggesting an anergic state. $CD8^+$ T cells activated with MPA-DC featured lower levels of secretion of IFN-γ and TNF-α while producing higher levels of TGF-β, IL-4 and IL-5 than those stimulated with LPS-DC. They were also characterized by lower levels of expression of proteins associated with cytotoxicity such as CD107, perforin and granzymes and reduced allospecific cytotoxic functions. We also found that LPS-DC produced IFN-γ and that MPA reduced IFN-γ synthesis in DC. Finally, the addition of IFN-γ restored the ability of MPA-DC to synthesize IL-12 and TNF-α and to activate $CD8^+$ T cells, suggesting that IFN-γ has a role in the potential of DC to induce cytotoxic T cells.

INTRODUCTION

Many early studies focused on inhibiting $CD4^+$ T cell allo-recognition pathways to induce transplantation tolerance in rodents (1), but more recently the importance of alloreactive $CD8^+$ T cells in preventing the induction of tolerance has been recognized (2-4). Targeting $CD8^+$ T cell currently appears to be necessary for induction of tolerance in stringent models in both primates and humans (2, 5, 6).

In addition, many studies have shown that CD8-dependent rejection is resistant to immunotherapeutic strategies (7-9), and immunoresistant $CD8^+$ T cell responses in humans are associated with increased incidence of acute allograft rejection (10). Finding new strategies to control CD8 cytolytic activity might therefore have important implications in transplantation.

It is often assumed that $CD4^+$ helper T cells are essential for cytolytic lymphocyte development (11-13) but the requirement for help is not absolute and may be bypassed by alternative ways, as suggested by studies showing that primary $CD8^+$ T cell responses against lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), influenza virus, Epstein Barr virus and *Listeria monocytogenes* are unimpaired in the absence of $CD4^+$ T cells (14-17). Moreover, several transplantation studies have reported $CD8^+$-mediated allograft rejection independently of $CD4^+$ T cells (18-22).

Dendritic cells (DC) are the main professional antigen presenting cells (APC) involved in the initiation of $CD8^+$ T cell responses to many antigens (23). Contact of DC with inflammatory mediators (e.g., TNF-α) or microbial products (e.g., LPS) in peripheral tissues induces their maturation and migration into secondary lymphoid organs, leading to effective T cell priming (24). However, in a steady state DC can also have a role in the downregulation of T lymphocyte responses (25) and several agents can be used to induce tolerogenic DC (26). Mycophenolic acid (MPA), the active metabolite of mycophenolate mofetil routinely used in renal transplantation and in autoimmune diseases (27, 28), inhibits inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) that is involved in *de novo* synthesis of guanosine nucleotides in T lymphocytes. We have previously demonstrated that DC treated with MPA have poor allogeneic $CD4^+$ T cell stimulatory ability (29) and induce $CD4^+$ regulatory T cells (30). However, their ability to activate cytotoxic $CD8^+$ T cells has never been reported in humans. The signals required for the development and function of $CD8^+$ T cells have still not been completely defined, but several studies have reported that human DC can activate $CD8^+$ T cell cytotoxic activity independently of $CD4^+$ helper T cells (31, 32). We were therefore interested

to know how MPA could affect the ability of DC to induce the differentiation of allogeneic $CD8^+$ T cells into effector cytotoxic cells independently of $CD4^+$ T cells.

In the study reported here we demonstrated that MPA-treated DC induced anergic $CD8^+$ T cells that secreted high levels of IL-4, IL-5, IL-10 and TGF-β. Furthermore, our findings showed that MPA considerably reduced the ability of DC to induce cytotoxic activity in allogeneic $CD8^+$ T cells. Finally, we found that the reduction of IFN-γ synthesis in DC caused by MPA played an important part in the induction of CD8 hyporesponsiveness. These results may provide a new approach to modulation of the CD8 cytotoxic alloresponse to promote allograft tolerance.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and cytokines

Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 50 IU/ml penicillin (ICN, Orsay, France), 50 IU/ml streptomycin (ICN), 2mM L-glutamine (Bio Whittaker, Vervier, Belgique) and 10% heat-inactivated FCS (Gibco). Recombinant human IL-4 was obtained from R&D Systems (Abingdon, United Kingdom) and recombinant human IFN-γ, obtained from Peprotech, was used at a concentration of 10ng/ml. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was obtained from Abcys (Reuil Malmaison, France) and lipopolysaccharide (LPS) from Sigma. Mycophenolic acid (MPA), purchased from Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France, was reconstituted in methanol.

Generation of dendritic cells

The blood of healthy volunteers was obtained by cytapheresis after signed informed consent. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were then isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Lymphoprep, Oslo, Norway) in accordance with local ethical committee approval. Monocytes were prepared either after selective adhesion to plastic or purified by positive selection using anti-CD14-conjugated magnetic microbeads (Milteny Biotec, Germany) ; purity was >96% $CD14^+$ cells. Immature DC were generated by culturing monocytes for 5 days in RPMI 1640 containing 10% FCS, 50 IU/ml penicillin, 50 IU/ml streptomycin, 25ng/ml IL-4 and 1000 IU/ml GM-CSF at 37°C in a humidified 5% CO2

atmosphere. For induction of DC maturation, day 5 DC were stimulated with LPS (50 ng/ml/0.5 x 10^6 cells) for 2 days, in the presence or absence of 100µM MPA. On day 7, DC were washed extensively with RPMI 1640/10% FCS before further culture.

Isolation of $CD8^+$ T cell subsets

Human PBMC from healthy blood donors were isolated with Ficoll Hypaque, as described above. PBMC were first depleted of adherent cells by two 45-min adhesion cycles on plastic. $CD8^+$ T cells were obtained by positive selection using magnetic beads coated with an anti-CD8 antibody (Dynal, Compiegne, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, peripheral blood lymphocytes were resuspended in 1 ml PBS 0.1% FCS and 2mM EDTA for 25 min at 4°C, and Dynabeads® were added depending on the estimated number of target $CD8^+$ T cells in the sample. The cells were detached by incubating with Detachabeads® for 45 min at room temperature. $CD8^+$ $CD45RA^+$ T cells were then purified from PBMC by positive selection using a kit from Dynal Biotech. $CD8^+$ $CD45RO^+$ T cells were isolated from PBMC by a two-step negative selection process, involving initial purification of $CD8^+$ T cells and subsequent depletion of $CD45RA^+$ T cells using CD45RA antibody. The purity of the various T cell subsets was >95% (data not shown).

Proliferation assay

In the allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR) assay, mDC or MPA-DC were distributed in 96-well plates at 3 x 10^4 cells in 100 µl per well, and allogeneic $CD8^+$ T cells, $CD8^+$ RO^+ or $CD8^+$ RA^+ (10^5 cells / 100µl) were added to each well (when specified, IL-2 was added to the culture at 100 IU/ml, R&D Systems). T cell proliferation was measured using 1µCi [^{3}H]-thymidine (Amersham Pharmacia, Biotech, Little Chalfont, England) during the last 18 hours of the 5-day culture. The levels of [^{3}H]-thymidine incorporation into the cellular DNA were determined by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2550 TR/LL, Packard, Rungis, France). In some experiments, we carried out a second allogeneic MLR: allogeneic $CD8^+$ T cells were first co-cultured with mDC or MPA-DC for 6 days. At the end of co-culture, cells were harvested, washed and co-cultured in 96-well plates with mDC from the same donor or from a third party donor at a DC:T ratio of 1:3 (when specified, IL-2 was added to the wells at 100 IU/ml). $CD8^+$ T cell proliferation was then assessed as described previously.

Cytokine production assay

Determination of cytokine concentrations in culture supernatants was performed by ELISA according to manufacter's protocols. Reagents for IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, TNF-α, TGF-β and IFN-γ measurement were obtained from eBiosciences (Montrouge, France). To activate latent TGF-β, the samples were acidified (1N HCl) and then neutralized (1N NaOH). Samples were assayed in triplicate and were quantified by comparison with standard curves obtained with purified recombinant cytokines. Optical densities were measured in an ELISA plate-reader at 450 nm wavelength. Results are presented as the means of triplicate wells.

Antibodies and flow cytometry

Immunofluorescence staining was performed after 6 days of culture. A total of 10^5 $CD8^+$ T cells (co-cultured with mDC or MPA-DC) were incubated with fluorescence-labeled conjugated mouse anti-human antibodies (mAbs) for 30 min at 4°C protected from light. The following mAbs were used for cytometric analysis: CD8-APC Cy7 (clone SK1, IgG1), CD25-APC (clone M-A251, IgG1), CD107a-PE (clone H4A3, IgG1a), CD134-PE (clone ACT35, IgG1) and CD39-APC (clone TU66, IgG2b) from BD Pharmingen, CD28-PE (clone CD28.2, IgG1), CD62L-FITC (clone Dreg 56, IgG1), CD69-PE (clone TP1.55.3, IgG2b) and CD103-FITC (clone 2G5, IgG2a) from Beckman Coulter. For intracellular cytokine staining, cells were incubated with Golgi Stop solution (Becton Dickinson) for the last 5 hours of culture. Cells were then harvested, surface stained and permeabilized with "fix and perm" solutions from Caltag Laboratories. IFN-γ-APC (clone B27, IgG1), Perforin-PE (clone δG9, IgG2b), Granzyme A-PE (clone CB9, IgG1) and Granzyme B-FITC (clone GB11, IgG1) anti-human antibodies were purchased from BD Pharmingen and CD152-PE (clone BNI3, IgG2a) with isotype control from Beckman Coulter. In some experiments, the following mouse anti-human mAbs were used to stain DC after 48h of maturation: PE-anti-CD209 (DC SIGN) (IgG1, clone AZND1), PE-anti-CD80 (IgG1, clone MAB104), PE-anti-CD40 (IgG1, clone mAb89), PE-anti-CD54 (IgG1, clone 84H10) and PE-anti-CD58 (IgG2a, clone AICD58) from Beckman Coulter, APC-anti-CD25 (IgG1, M-A251), FITC-anti-CD83 (IgG1, clone HB15e), PeCy5-anti CD86 (IgG1κ, clone 2331) and FITC-anti-CD70 (IgG3κ, clone Ki-24) from Becton Dickinson.

Data were analyzed for geometric mean fluorescence intensity (MFI) (MFI of antibody of interest/ MFI of isotype control) and for the percentage of marker-positive cells (at least 30,000 cells per sample were analyzed).

Cytotoxicity assay by flow cytometry CFSE / 7-AAD

PBMC target cells (10^6) were labeled with two microliters of CFSE (Sigma; 5µM stock concentration) for 10 minutes at 37°C in 1 ml of PBS. After quenching the labeling reaction by addition of FCS, cells were washed extensively and immediately used in the cytotoxicity assay. Effector cells were seeded with a constant number of CFSE-labeled target cells at different E:T ratios (4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 and 1:10). In parallel, target cells were incubated alone to measure basal apoptosis. Cells were incubated in 96-well microplates in a total volume of 200 µl complete medium for 7h in a 5% CO2 atmosphere at 37°C. Cell mixtures were then washed in PBS and incubated in PBS containing one microgram of 7-amino actinomycin D (7-AAD) (Sigma, France). CFSE fluorescence and 7-AAD emission were detected in the FL-1 and FL-3 channels, respectively. For each E: T ratio, 30,000 target cells were acquired. Analysis was performed with the Diva Software. The percentage of specific lysis (PSL) was determined by the formula: PSL = (100 x (% sample lysis - % basal lysis)) / (100 - % basal lysis)

Statistical analysis

Data for each experiment were expressed as mean values (± SD) and the results were analyzed for statistical significance using the paired non-parametric Wilcoxon test. The level of significance was set at $p<0.05$.

RESULTS

MPA-DC induced alloantigen-specific anergy in both naive and memory $CD8^+$ T cells.

Purified $CD8^+$ T lymphocytes (10^5) were mixed with 3 x 10^4 allogeneic DC (pretreated with either LPS or both MPA and LPS). T cell proliferation was assessed on day 5. As shown in Figure 1A, we first demonstrated that mDC supported the proliferation of purified allogeneic $CD8^+$ T cells independently of CD4 cells, whereas MPA-DC did not (14375 cpm ± 790 versus 3086 cpm ± 245). Since it has previously been suggested that contaminating components of adherent PBMC (especially NK cells) might have a role in the activation of allogeneic $CD8^+$ T cells in the absence of $CD4^+$ helper T cells (33), we carried out experiments in which we used CD14 positively-selected monocytes in order to obtain highly purified DC (>97% purity as assessed by DC-SIGN expression). As shown in Figure 1A, highly purified mDC were as effective as DC derived from adherent monocytes in inducing

$CD8^+$ T cell proliferation (dark hatched bar), and highly purified MPA-DC derived from CD14 positively-selected monocytes could not induce $CD8^+$ T cell proliferation (Figure 1A, light hatched bar). This suggested that the inhibition of CD8 proliferation by MPA-DC was truly due to its impact on DC.

Since the requirements to activate naive or memory $CD8^+$ cells are quite different, we decided to assess whether MPA-DC could affect both memory and naive $CD8^+$ T cells. Positively selected $CD45RA^+$ T cells (naive) and $CD45RA^+$-depleted T cells (memory) were used as responders in MLR with allogeneic MPA-DC. We first confirmed that the CD45RA-depleted cells were all positive for the CD45RO marker, thus indicating the effectiveness of the depletion (data not shown). As shown in Figure 1B, both $CD8^+$ $CD45RA^+$ and $CD8^+$ $CD45RO^+$ T cells exhibited lower proliferative ability in response to MPA-DC compared to mDC. This result indicated that MPA reduced the ability of DC to activate both naive and memory $CD8^+$ T cells.

As IL-2 is important in the activation and the proliferation of T cells, we hypothesized that cells activated by MPA-DC did not produce enough IL-2 to sustain their own proliferation. As shown in Figure 1C, adding exogenous IL-2 during MLR with MPA-DC resulted in a strong response of allogeneic $CD8^+$ T cells. This suggested that poor IL-2 availability during coculture with MPA-DC might be involved in the hyporesponsiveness.

As reported in seminal studies by Schwartz and Jenkins (34), anergy is a state in which T cells are incapable of producing their own IL-2 on restimulation with antigen and this is reversed by stimulating the cells in the presence of exogenous IL-2. We therefore added exogenous IL-2 during the second MLR and found that T cells became fully reactive to the first donor mature DC (Figure 1D, black bar). This demonstrated that $CD8^+$ T cells reactive to the first donor did not undergo apoptosis during the first activation but suggested instead that they became anergic.

Finally, we tested whether $CD8^+$ T cell anergy induced by MPA-DC was restricted to T cells specifically reactive to alloantigens expressed by DC. As shown in Figure 1D, $CD8^+$ T cells first activated by first party allogeneic MPA-DC highly proliferated in response to mDC from a third party (hatched bars) whereas they remained non-responsive to restimulation with mDC from the first donor (filled bars), demonstrating the antigen-specificity of the hyporesponsiveness. These findings taken together strongly suggested that MPA-DC induced alloantigen-specific anergy of $CD8^+$ T cells.

Phenotype characteristics of $CD8^+$ T cells after 6 days of coculture with either mDC or MPA-DC

We analyzed the phenotype characteristics of $CD8^+$ T cells after 6 day-coculture with either mDC or MPA-DC. Markers such as CD25, CD28, CD69, CD152 (CTLA-4) and CD134 (Ox40) associated with T cell activation were tested. In addition, we also analyzed CD103 (β7 integrin) which has previously been reported to be expressed by a subpopulation of $CD8^+$ T cells with regulatory ability (35). Moreover, we assessed the expression of CD39 that has been demonstrated to define distinct cytotoxic subsets within alloactivated human $CD8^+$ T cells (36). Not surprisingly, we found that mDC and MPA-DC induced different levels of expression of activation markers such as CD25 and CD69 on allogeneic $CD8^+$ T cells (36.7% ±7 versus 19.4% ±9, p=0.008 and 27.1% ±11 versus 16.9% ±9, p=0.018, respectively, n=6) (Figure 2). These results confirmed that MPA strongly reduced the ability of mDC to activate purified CD8 cells. We also examined the influence of MPA-DC on the expression of several co-stimulatory molecules of $CD8^+$ T cells. As shown in Figure 2, MPA-DC induced lower percentages of positive cells for both CD134 (11.7% ±5 versus 23.8% ±7, p=0.016) and for intracellular CD152 (9.3% ±5 versus 39.2% ±9, p=0.016). Interestingly, the percentage of $CD28^{high}$ cells was reduced in response to MPA-DC (13.3% ±9 versus 40.9% ±9, p=0.008). The expression of CD62L was similar in the two populations ($p>0.05$) and the expression of the CD103 molecule was only marginally affected (18.2% ±8 versus 22.9% ±9, p=0.031). Finally, $CD8^+$[MPA-DC] exhibited much lower expression of CD39 compared to $CD8^+$[mDC] on day 6 of culture (Figure 2).

$CD8^+$ T cells stimulated by MPA-DC secreted high levels of IL-4, IL-5, IL-10 and TGF-β and low levels of TNF-α

Having demonstrated that MPA-DC were poor stimulators of allogeneic $CD8^+$ T cells, we next investigated how MPA-DC could alter the cytokine synthesis pattern of $CD8^+$ T cells. To this end, $CD8^+$ T cells were activated by mDC or MPA-DC for 6 days and production of TNF-α, TGF-β, IL-4, IL-5 and IL-10 was measured by ELISA. The results presented in Figure 3 show that TNF-α was mainly produced by $CD8^+$ T cells activated with mDC, whereas TGF-β, IL-4, IL-5 and IL-10 were significantly higher in the supernatants of $CD8^+$ activated with MPA-DC ($p<0.05$) (Figure 3). Taken together, these findings indicated that MPA-DC induced a shift in the T cell cytokine pattern towards a Tc2 profile.

CD8$^+$ T cells activated by MPA-DC exhibited low cytotoxic activity

Finally, we investigated whether CD8$^+$[mDC] and CD8$^+$[MPA-DC] populations had different cytotoxic activity against allogeneic targets by using a test based on double staining with CFSE / 7-AAD, as previously described by Lecoeur et al (37). CFSE staining was used to label target cells (PBMC), and 7-AAD positive cells identified the dead cells among these targets. The cytotoxicity assay was carried out at different effector:target ratios (E:T). After staining PBMC with CFSE, cells were mixed with previously allosensitized CD8$^+$[mDC] or CD8$^+$[MPA-DC] effector cells for 7 hours as described in the *Materials and Methods.* Cell mixtures were then stained with 7-AAD and analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 4A, the percentage of specific lysis (PSL) induced by CD8$^+$[mDC] was 50.2% compared to only 28.8% with CD8$^+$[MPA-DC] at a E:T ratio of 1:1. Figure 4B demonstrates that PBMC lysis correlated well with the E:T ratio and that PSL induced by CD8$^+$[MPA-DC] was consistently lower than with CD8$^+$[mDC] whatever the E:T ratio used (black symbols, Figure 4B). We also performed experiments with PBMC target cells from a third party and found that the two subsets were not able to lyse PBMC from an unrelated donor, thus confirming that the cytotoxicity of CD8$^+$ was antigen-specific (empty symbols, Figure 4B).

Since CD4-independent memory CD8$^+$ T cells are powerful mediators of allograft rejection (38, 39), we checked whether MPA-DC could reduce the cytotoxic activity in this subset. As shown in Figure 4C, both naive and memory CD8$^+$ T cells exhibited a reduced cytotoxic function in response to MPA-DC.

To provide a more complete assessment of the functionality of CD8$^+$ T cells, we also analyzed markers associated with cytotoxic granules such as granzymes, perforin (40, 41) and CD107 expressed on the surface of effector cytotoxic cells after degranulation (42, 43). Figure 5A shows that the percentage of positive cells expressing perforin was significantly decreased in CD8$^+$ T cells stimulated by MPA-DC (9.83% ± 2.1 *vs* 17.7% ± 2.6 ; p=0.016). Similarly, levels of expression of granzymes A and B were decreased in CD8$^+$[MPA-DC] compared to CD8$^+$[mDC] (7.23% ± 1 *vs* 16.3% ± 2.8 and 10.15% ± 1.8 *vs* 20.23% ± 2.4, respectively ; p=0.016). Finally, the percentage of CD107-positive cells was also lower in CD8$^+$[MPA-DC] (15.05% ± 9 compared to 29.3% ± 10 in CD8$^+$ T cells activated by mDC, p=0.031) (Figure 5A). Taken together these findings demonstrated that MPA diminished the ability of DC to induce cytotoxic functions in CD8$^+$ cells. In agreement with this, we also found that production of IFN-γ, analyzed by both intracellular staining and by ELISA, was significantly lower in the CD8$^+$[MPA-DC] population (Figure 5B and 5C).

CD8$^+$ T cells activated by MPA-DC had no regulatory activity.

Given that the CD8$^+$[MPA-DC] were able to produce regulatory cytokines such as IL-10 and TGF-β, and in view of their low proliferative capacity, we examined their ability to regulate allogeneic CD4$^+$ T cell proliferation. CD8$^+$ cells preactivated by MPA-DC were mixed with responding autologous CD4$^+$ T cells and mature DC obtained from the same donor as MPA-DC (the donor used to stimulate CD8$^+$ T cells). As shown in Figure 6A, addition of these CD8$^+$[MPA-DC] did not affect the proliferation of responding CD4$^+$ T cells activated with mDC over 5 days (41590 cpm ± 7292 *vs* 35576 cpm ± 5092 ; $p>0.05$, at a ratio of 1:1). We also checked that CD8$^+$[MPA-DC] remained unresponsive after restimulation with mature DC (3204 cpm ± 510, first bar in Figure 6A). Taken together, this suggested that CD8$^+$[MPA-DC] did not suppress the proliferation of CD4$^+$ T cells. We also assessed the secretion of IFN-γ in these MLR. As shown in Figure 6B, high IFN-γ concentrations were found in the supernatants of CD4$^+$ T cells activated with mDC and addition of CD8$^+$[MPA-DC] had no effect on this secretion (18467 pg/ml ± 4803 *vs* 15468 pg/ml ± 2852 ; $p>0.05$, n=5). We checked that CD8$^+$ T cells first activated with MPA-DC secreted very low levels of this cytokine after restimulation with mature DC (1501 pg/ml ± 686), suggesting that the concentration observed in MLR with CD4-positive cells mainly originated from the CD4$^+$ T lymphocytes. However, to assess definitively that CD8$^+$[MPA-DC] did not affect the level of IFNγ production by CD4$^+$ cells, we carried out double staining for CD4 and intracytoplasmic IFNγ in MLR in the presence or absence of CD8$^+$[MPA-DC] cells and found similar fractions of CD4$^+$ T cells expressing this cytokine in both conditions (Figure 6C).

Exogenous IFN-γ completely restored IL-12 and TNF-α synthesis in MPA-DC and partially reconstituted their ability to activate CD8$^+$ T cells.

Full activation of CD8$^+$ T cells required not only a cognate interaction between the TCR and the MHC-peptide complex, but also co-stimulatory signals. We analyzed whether decreased expression of several maturation markers and co-stimulatory molecules on DC might be involved in the poor ability of MPA-DC to activate CD8 T cells. We found that MPA-DC and LPS-DC expressed similar levels of CD83, CD25, CD80, CD86, CD40, CD54 and CD58 (Figure 7A). Recent studies in rodents have suggested that the interaction between CD70 on DC and CD70L (CD27) on T cells might be an important costimulatory signal for CD8 activation (44-46). We therefore analyzed the role of this interaction in our experimental model. We found that neither mDC nor MPA-DC expressed this molecule (Figure 7A, right

histogram). Therefore, these aforementioned molecules are probably not involved in our model.

We then investigated whether differential cytokine expression by DC might account for the poor ability of MPA-DC to prime $CD8^+$ T cells. Interestingly, ELISA analysis demonstrated significantly decreased secretion of IL-12p70, IFN-γ and TNF-α by MPA-DC compared to LPS-DC (Figure 7B). In addition, double staining for DC-SIGN and intracytoplasmic IFN-γ showed that MPA decreased the number of double positive cells (33.4% for MPA-DC versus 71.2% for mDC) confirming that MPA affected the production of IFN-γ in DC (Figure 7C). In order to explore whether this deficit in IFN-γ synthesis by MPA-DC was involved in the unresponsiveness of $CD8^+$ T cells, DC maturation was induced in the presence of exogenous IFN-γ and MPA. As shown in Figure 7D, recombinant human IFN-γ totally restored the production of TNF-α and IL-12 in MPA-DC and significantly increased their ability to activate $CD8^+$ T cells (2826 cpm ± 650 versus 8320 cpm ± 510; p=0.05 Figure 7E). Interestingly, the addition of recombinant human IL-12 or TNF-α during DC maturation did not influence their ability to activate $CD8^+$ T cells (data not shown). Taken together, these findings indicate that IFN-γ synthesis by DC is important to prime DC for CD8 activation via an autocrine loop and that the modulation of IFN-γ synthesis induced by MPA in DC has a role.

DISCUSSION

Cytotoxic $CD8^+$ T cells have a critical role in allograft rejection (22, 47). The activation of memory allogeneic-reactive $CD8^+$ T cells appears to be a major obstacle for tolerance induction (3, 4, 38, 39). Moreover, the high frequency of memory T cells in human adults might be one of the reasons why successful tolerance-inducing strategies in rodents have failed in primates (6). While many early studies focused on the role of CD4-dependent $CD8^+$ T cells, the role of CD4-independent $CD8^+$ T cells in rejection has been emphasized more recently (21). Analyzing this type of response in humans might therefore be of interest for transplantation. Our findings showed that human DC activated with LPS were able to induce cytotoxic effector functions in allogeneic $CD8^+$ T cells in the absence of help from $CD4^+$ T cells. These results were consistent with previous reports (31, 32, 44). We then demonstrated that MPA disabled human DC to induce cytotoxic functions in allogeneic $CD8^+$ T cells via the direct pathway in both naive and memory $CD8^+$ T cell compartments. This finding might be

important for transplantation since the apoptosis of graft cells is mainly mediated by the perforin/granzyme pathway (48). In addition, a recent study in humans suggested a role for the direct pathway of antigen presentation in long term allograft injury (49). Furthermore, it has been shown in mice that $CD8^+$ T cells can be activated via the direct pathway in the absence of donor-derived DC (50). Taken together, these results suggest that the activation of $CD8^+$ T cells via the direct pathway might be active and lead to tissue damage for a much longer period than previously thought. Given the wide diversity of the T cell repertoire in reacting to allo-MHC via this pathway (51), it is really important to inhibit this response over long periods. In this context, the use of MPA-treated DC might be considered since the potency of DC for the induction of T cell tolerance in rodent models has been widely reported (26).

Different peripheral mechanisms such as deletion, suppression or induction of anergy can lead to T cell hyporesponsiveness. We demonstrated in this study that MPA-DC induced $CD8^+$ T cell anergy. Anergy is immunologically defined as the inability of antigen-specific T cells to produce IL-2 and to expand clonally on rechallenge with fully competent APC (52). This is an active process that occurs when T-cell receptors (TCRs) are ligated by antigen in the absence of effective co-stimulation signals. While anergy in $CD4^+$ T cells has been widely reported, it is less well characterized in $CD8^+$ T cells. Many studies have interrelated anergy and suppression in both $CD4^+$ T cells (53, 54) and $CD8^+$ T cells (55). Interestingly, in this study we report antigen-specific anergic $CD8^+$ T cells devoid of suppressive ability. This is in accordance with other studies showing that anergic and regulatory T cells can be distinguished by gene expression analysis (56).

We then explored further how MPA modulated the ability of DC to activate CD8 lymphocytes. Variable ability of stimuli to activate DC to elicit primary CD8 T cell expansion without the help of $CD4^+$ T cells might be accounted for by differential expression of co-stimulatory molecules and/or cytokines. We described here that MPA in the presence of LPS, contrary to what we have previously reported with TNF-α did not affect the upregulation of several co-stimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86 (29). In the presence of LPS, the ability of MPA to disable DC in the activation of $CD8^+$ T cells is not therefore accounted for by the reduction of these co-stimulatory molecules. We also analyzed the expression of CD70 since other studies have highlighted its critical role in the promotion of $CD8^+$ cytotoxic T cell activation (44-46). However, in contrast to the situation in mice, we were unable to demonstrate any expression of CD70 on human mature DC, and thus CD70 is probably not involved in the generation of cytotoxic $CD8^+$ T cells by LPS-matured DC.

We next investigated the involvement of cytokines such as IL-12 and IFN-γ. To ascertain IFN-γ production by human DC, we used intracytoplasmic staining and found that DC SIGN-positive cells were positive for IFN-γ after LPS stimulation. This suggested that human LPS-treated DC produced IFN-γ. Synthesis of IFN-γ by DC is still a matter of debate and its role has not been firmly established. Our results confirmed those of Fricke *et al,* who showed convincingly that human DC infected with Mycobacteria or stimulated with LPS could produce IFN-γ (57), and those of Li *et al* (58). For the first time, we demonstrated by intracytoplasmic staining that MPA inhibited the synthesis of IFN-γ in human DC. Interestingly, we found that adding exogenous IFN-γ to DC cultures with MPA and LPS restored IL-12 and TNF-α synthesis by DC, whereas exogenous IL-12 had no effect. In conclusion, our findings indicate that LPS is sufficient to raise human DC to a certain activation state capable of expanding $CD8^+$ T cells and inducing fully functional cytotoxic cells in the absence of $CD4^+$ T cells. Our results also suggested that IFN-γ synthesis by mature DC is important for their ability to activate cytotoxic $CD8^+$ T cells. Moreover, we also demonstrated that MPA-DC induce profound CD8 T cell-anergy in both memory and naive compartments and that inhibition of IFN-γ secretion in DC contributes to this process.

The possibility of generating human tolerogenic MPA-DC opens up new therapeutic avenues for the treatment of allogeneic transplantation and autoimmune diseases. Finally, the inclusion of tolerogenic MPA-DC in future therapeutic regimens may minimize the dependence on the nonspecific immunosuppressive drugs currently used for the treatment of autoimmune disorders and transplant rejection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Etablissement Français du Sang du Centre Atlantique of Tours for providing blood samples from healthy donors and Doreen Raine for revising the English text.

REFERENCES

1. Wu, Z., Y. Wang, F. Gao, X. Shen, Y. Zhai, and J. W. Kupiec-Weglinski. 2008. Critical role of CD4 help in CD154 blockade-resistant memory CD8 T cell activation and allograft rejection in sensitized recipients. *J Immunol 181:1096-1102*.
2. Li, Z., F. S. Benghiat, L. M. Charbonnier, C. Kubjak, M. N. Rivas, S. P. Cobbold, H. Waldmann, V. De Wilde, M. Petein, F. Schuind, M. Goldman, and A. Le Moine. 2008. CD8+ T-Cell depletion and rapamycin synergize with combined coreceptor/stimulation blockade to induce robust limb allograft tolerance in mice. *Am J Transplant 8:2527-2536*.
3. Le Moine, A., and M. Goldman. 2003. Non-classical pathways of cell-mediated allograft rejection: new challenges for tolerance induction? *Am J Transplant 3:101-106*.
4. Csencsits, K. L., and D. K. Bishop. 2003. Contrasting alloreactive CD4+ and CD8+ T cells: there's more to it than MHC restriction. *Am J Transplant 3:107-115*.
5. Zhai, Y., L. Meng, F. Gao, R. W. Busuttil, and J. W. Kupiec-Weglinski. 2002. Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients. *J Immunol 169:4667-4673*.
6. Adams, A. B., M. A. Williams, T. R. Jones, N. Shirasugi, M. M. Durham, S. M. Kaech, E. J. Wherry, T. Onami, J. G. Lanier, K. E. Kokko, T. C. Pearson, R. Ahmed, and C. P. Larsen. 2003. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest 111:1887-1895*.
7. Newell, K. A., G. He, Z. Guo, O. Kim, G. L. Szot, I. Rulifson, P. Zhou, J. Hart, J. R. Thistlethwaite, and J. A. Bluestone. 1999. Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells. *J Immunol 163:2358-2362*.
8. Trambley, J., A. W. Bingaman, A. Lin, E. T. Elwood, S. Y. Waitze, J. Ha, M. M. Durham, M. Corbascio, S. R. Cowan, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 1999. Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection. *J Clin Invest 104:1715-1722*.
9. Guo, Z., L. Meng, O. Kim, J. Wang, J. Hart, G. He, M. L. Alegre, J. R. Thistlethwaite, Jr., T. C. Pearson, C. P. Larsen, and K. A. Newell. 2001. CD8 T cell-mediated rejection of intestinal allografts is resistant to inhibition of the CD40/CD154 costimulatory pathway. *Transplantation 71:1351-1354*.
10. Boleslawski, E., F. Conti, S. Sanquer, P. Podevin, S. Chouzenoux, F. Batteux, D. Houssin, B. Weill, and Y. Calmus. 2004. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection. *Transplantation 77:1815-1820*.
11. Cardin, R. D., J. W. Brooks, S. R. Sarawar, and P. C. Doherty. 1996. Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med 184:863-871*.
12. Flano, E., D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 1999. Requirement for CD4+ T cells in V beta 4+CD8+ T cell activation associated with latent murine gammaherpesvirus infection. *J Immunol 163:3403-3408*.
13. Wild, J., M. J. Grusby, R. Schirmbeck, and J. Reimann. 1999. Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol 163:1880-1887*.
14. Andreasen, S. O., J. E. Christensen, O. Marker, and A. R. Thomsen. 2000. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J Immunol 164:3689-3697*.
15. Larsson, M., D. Messmer, S. Somersan, J. F. Fonteneau, S. M. Donahoe, M. Lee, P. R. Dunbar, V. Cerundolo, I. Julkunen, D. F. Nixon, and N. Bhardwaj. 2000. Requirement

of mature dendritic cells for efficient activation of influenza A-specific memory CD8+ T cells. *J Immunol 165:1182-1190*.

16. Santodonato, L., G. D'Agostino, R. Nisini, S. Mariotti, D. M. Monque, M. Spada, L. Lattanzi, M. P. Perrone, M. Andreotti, F. Belardelli, and M. Ferrantini. 2003. Monocyte-derived dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cell response. *J Immunol 170:5195-5202*.
17. Shedlock, D. J., J. K. Whitmire, J. Tan, A. S. MacDonald, R. Ahmed, and H. Shen. 2003. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during Listeria monocytogenes infection. *J Immunol 170:2053-2063*.
18. Haskova, Z., N. Usiu, J. S. Pepose, T. A. Ferguson, and P. M. Stuart. 2000. CD4+ T cells are critical for corneal, but not skin, allograft rejection. *Transplantation 69:483-487*.
19. Vu, M. D., F. Amanullah, Y. Li, G. Demirci, M. H. Sayegh, and X. C. Li. 2004. Different costimulatory and growth factor requirements for CD4+ and CD8+ T cell-mediated rejection. *J Immunol 173:214-221*.
20. Habiro, K., H. Shimmura, S. Kobayashi, M. Kotani, Y. Ishida, K. Tanabe, H. Toma, and R. Abe. 2005. Effect of inflammation on costimulation blockade-resistant allograft rejection. *Am J Transplant 5:702-711*.
21. Jones, N. D., M. Carvalho-Gaspar, S. Luo, M. O. Brook, L. Martin, and K. J. Wood. 2006. Effector and memory CD8+ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4+ T cell help. *J Immunol 176:2316-2323*.
22. Gelman, A. E., M. Okazaki, J. Lai, C. G. Kornfeld, F. H. Kreisel, S. B. Richardson, S. Sugimoto, J. R. Tietjens, G. A. Patterson, A. S. Krupnick, and D. Kreisel. 2008. CD4+ T lymphocytes are not necessary for the acute rejection of vascularized mouse lung transplants. *J Immunol 180:4754-4762*.
23. Ueno, H., E. Klechevsky, R. Morita, C. Aspord, T. Cao, T. Matsui, T. Di Pucchio, J. Connolly, J. W. Fay, V. Pascual, A. K. Palucka, and J. Banchereau. 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev 219:118-142*.
24. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol 9:271-296*.
25. Roncarolo, M. G., M. K. Levings, and C. Traversari. 2001. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med 193:F5-9*.
26. Morelli, A. E., and A. W. Thomson. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol 7:610-621*.
27. Adu, D., J. Cross, and D. R. Jayne. 2001. Treatment of systemic lupus erythematosus with mycophenolate mofetil. *Lupus 10:203-208*.
28. Mele, T. S., and P. F. Halloran. 2000. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology 47:215-245*.
29. Lagaraine, C., C. Hoarau, V. Chabot, F. Velge-Roussel, and Y. Lebranchu. 2005. Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. *Int Immunol 17:351-363*.
30. Lagaraine, C., R. Lemoine, C. Baron, H. Nivet, F. Velge-Roussel, and Y. Lebranchu. 2008. Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J Leukoc Biol 84:1057-1064*.
31. Young, J. W., and R. M. Steinman. 1990. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med 171:1315-1332*.

32. Lunsford, K. E., P. H. Horne, M. A. Koester, A. M. Eiring, J. P. Walker, H. L. Dziema, and G. L. Bumgardner. 2006. Activation and maturation of alloreactive CD4-independent, CD8 cytolytic T cells. *Am J Transplant 6:2268-2281*.
33. Taraban, V. Y., S. Martin, K. E. Attfield, M. J. Glennie, T. Elliott, D. Elewaut, S. Van Calenbergh, B. Linclau, and A. Al-Shamkhani. 2008. Invariant NKT cells promote CD8+ cytotoxic T cell responses by inducing CD70 expression on dendritic cells. *J Immunol 180:4615-4620*.
34. Jenkins, M. K., D. Mueller, R. H. Schwartz, S. Carding, K. Bottomley, M. J. Stadecker, K. B. Urdahl, and S. D. Norton. 1991. Induction and maintenance of anergy in mature T cells. *Adv Exp Med Biol 292:167-176*.
35. Uss, E., A. T. Rowshani, B. Hooibrink, N. M. Lardy, R. A. van Lier, and I. J. ten Berge. 2006. CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells. *J Immunol 177:2775-2783*.
36. Gouttefangeas, C., I. Mansur, M. Schmid, H. Dastot, C. Gelin, G. Mahouy, L. Boumsell, and A. Bensussan. 1992. The CD39 molecule defines distinct cytotoxic subsets within alloactivated human CD8-positive cells. *Eur J Immunol 22:2681-2685*.
37. Lecoeur, H., M. Fevrier, S. Garcia, Y. Riviere, and M. L. Gougeon. 2001. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods 253:177-187*.
38. Akbar, A. N., P. L. Amlot, A. Timms, G. Lombardi, R. Lechler, and G. Janossy. 1990. The development of primed/memory CD8+ lymphocytes in vitro and in rejecting kidneys after transplantation. *Clin Exp Immunol 81:225-231*.
39. Yang, J., M. O. Brook, M. Carvalho-Gaspar, J. Zhang, H. E. Ramon, M. H. Sayegh, K. J. Wood, L. A. Turka, and N. D. Jones. 2007. Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A 104:19954-19959*.
40. Peters, P. J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukuda, O. Krahenbuhl, J. Tschopp, J. W. Slot, and H. J. Geuze. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med 173:1099-1109*.
41. Trapani, J. A., and M. J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol 2:735-747*.
42. Betts, M. R., J. M. Brenchley, D. A. Price, S. C. De Rosa, D. C. Douek, M. Roederer, and R. A. Koup. 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods 281:65-78*.
43. Mittendorf, E. A., C. E. Storrer, C. D. Shriver, S. Ponniah, and G. E. Peoples. 2005. Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+ cells recognizing HER2/neu vaccine peptides. *Breast Cancer Res Treat 92:85-93*.
44. Bullock, T. N., and H. Yagita. 2005. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J Immunol 174:710-717*.
45. Schildknecht, A., I. Miescher, H. Yagita, and M. van den Broek. 2007. Priming of CD8+ T cell responses by pathogens typically depends on CD70-mediated interactions with dendritic cells. *Eur J Immunol 37:716-728*.
46. Yamada, A., A. D. Salama, M. Sho, N. Najafian, T. Ito, J. P. Forman, R. Kewalramani, S. Sandner, H. Harada, M. R. Clarkson, D. A. Mandelbrot, A. H. Sharpe, H. Oshima, H. Yagita, G. Chalasani, F. G. Lakkis, H. Auchincloss, Jr., and M. H. Sayegh. 2005. CD70 signaling is critical for CD28-independent CD8+ T cell-mediated alloimmune responses in vivo. *J Immunol 174:1357-1364*.
47. Oberbarnscheidt, M. H., Y. H. Ng, and G. Chalasani. 2008. The roles of CD8 central and effector memory T-cell subsets in allograft rejection. *Am J Transplant 8:1809-1818*.

48. Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1994. CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol 24:3068-3072*.
49. Bestard, O., P. Nickel, J. M. Cruzado, C. Schoenemann, O. Boenisch, A. Sefrin, J. M. Grinyo, H. D. Volk, and P. Reinke. 2008. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol 19:1419-1429*.
50. Kreisel, D., A. S. Krupnick, A. E. Gelman, F. H. Engels, S. H. Popma, A. M. Krasinskas, K. R. Balsara, W. Y. Szeto, L. A. Turka, and B. R. Rosengard. 2002. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med 8:233-239*.
51. Benichou, G., and A. W. Thomson. 2009. Direct versus indirect allorecognition pathways: on the right track. *Am J Transplant 9:655-656*.
52. Schwartz, R. H. 1996. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med 184:1-8*.
53. Chai, J. G., I. Bartok, P. Chandler, S. Vendetti, A. Antoniou, J. Dyson, and R. Lechler. 1999. Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo. *Eur J Immunol 29:686-692*.
54. Lombardi, G., S. Sidhu, R. Batchelor, and R. Lechler. 1994. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science 264:1587-1589*.
55. Steinbrink, K., E. Graulich, S. Kubsch, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood 99:2468-2476*.
56. Knoechel, B., J. Lohr, S. Zhu, L. Wong, D. Hu, L. Ausubel, and A. K. Abbas. 2006. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol 176:6473-6483*.
57. Fricke, I., D. Mitchell, J. Mittelstadt, N. Lehan, H. Heine, T. Goldmann, A. Bohle, and S. Brandau. 2006. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol 176:5173-5182*.
58. Li, H., W. Wojciechowski, C. Dell'Agnola, N. E. Lopez, and I. Espinoza-Delgado. 2006. IFN-gamma and T-bet expression in human dendritic cells from normal donors and cancer patients is controlled through mechanisms involving ERK-1/2-dependent and IL-12-independent pathways. *J Immunol 177:3554-3563*.

FIGURES

Figure 1

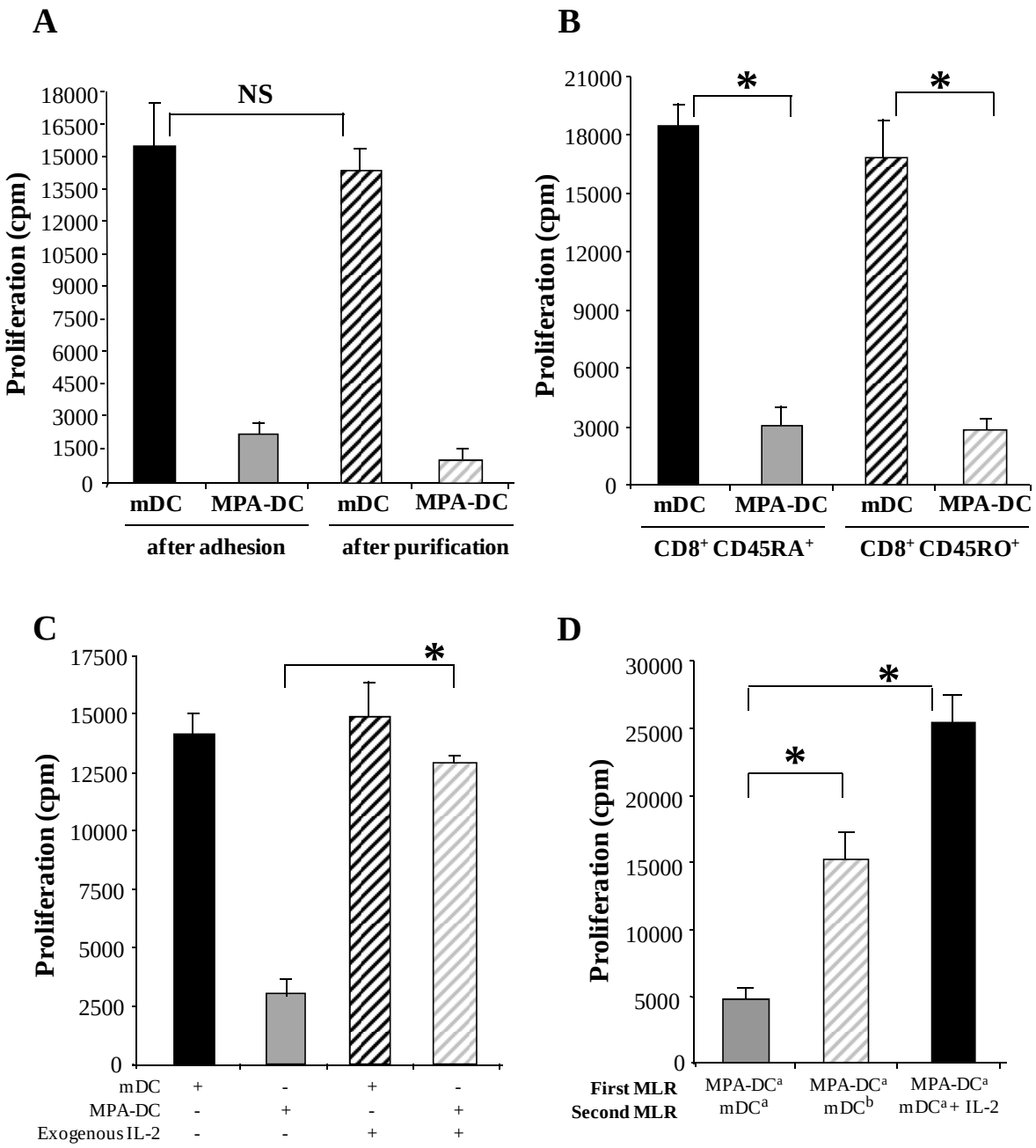


Figure 1: MPA-DC induced antigen-specific anergy in both naive and memory allogeneic CD8$^+$ T cells.

MPA-DC and mDC designate DC matured with LPS (50ng/ml) for 2 days in the presence or absence of MPA (100µM). **A)** *MPA-DC induced CD8$^+$ T cell unresponsiveness.* mDC and MPA-DC obtained after monocyte adhesion (filled bars) or after CD14-positive selection (hatched bars) were co-cultured for 5 days with allogeneic purified CD8$^+$ T lymphocytes at a DC:T ratio of 1:3. T cell proliferation was measured by incorporation of 1µCi [3H]-thymidine added for the last 18 hours of culture. **B)** *Naive and memory CD8$^+$ T cells were non-responsive to MPA-DC.* CD8$^+$ CD45RA$^+$ (filled bars) and CD8$^+$ CD45RO$^+$ (hatched bars) T cells were isolated from purified CD8$^+$ T lymphocytes and then co-cultured with allogeneic MPA-DC or mDC for 5 days at a DC:T ratio of 1:3. T cell proliferation was measured as described above. **C)** *IL-2 prevented CD8$^+$ T cell hyporesponsiveness.* Purified CD8$^+$ T lymphocytes were co-cultured with allogeneic MPA-DC or mDC in the presence or absence of exogenous IL-2 (100 IU/ml). T cell proliferation was measured as described above. **D)** *MPA-DC induced donor-specific anergy.* First co-culture of allogeneic CD8$^+$ T cells with MPA-DC was performed, followed by a second stimulation in the presence (black bar) or absence (gray bar) of exogenous IL-2 (100 IU/ml) with mDC from the donor used in the first co-culture. Donor-specific unresponsiveness was assessed by a second stimulation using mDC from the first DC-donor (mDC^a ; gray bar) or a third party (mDC^b ; hatched bars). T cell proliferation was measured on day 4 by incorporation of [3H]-thymidine. Results are expressed as mean counts per minute (cpm) ± SD obtained from triplicate wells and are representative of one out of seven experiments. * $p< 0.05$.

Figure 2

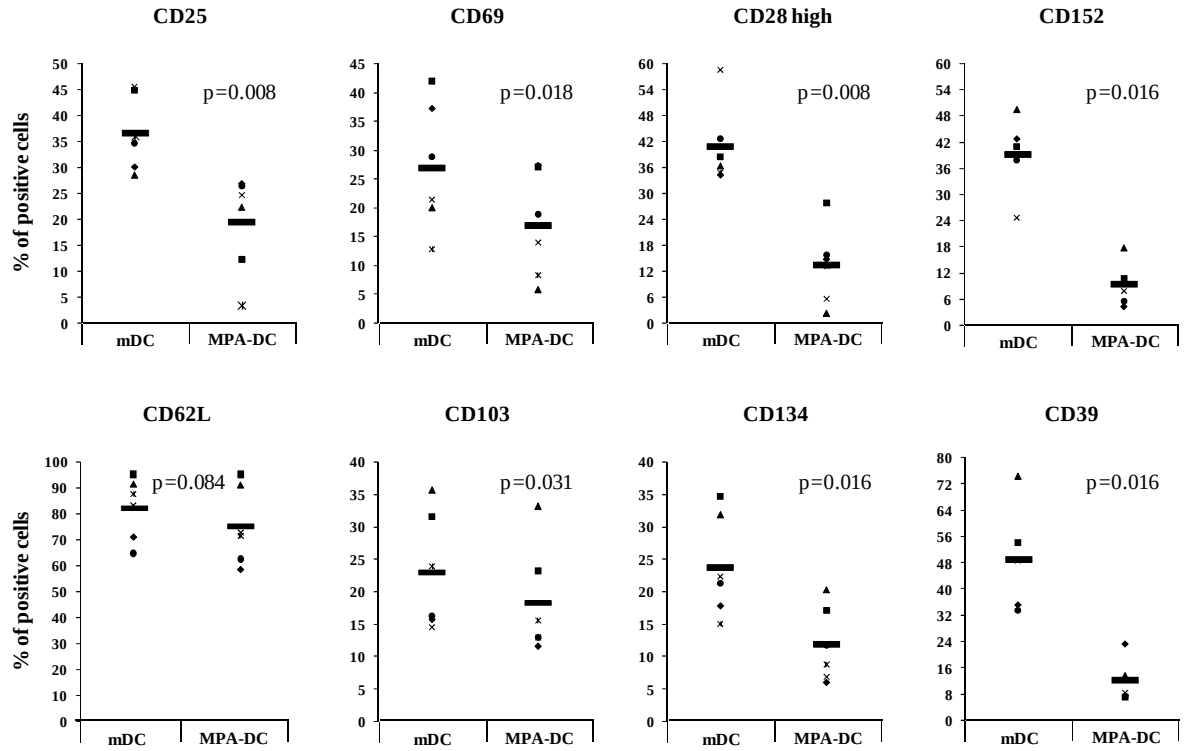


Figure 2: Phenotype characteristics of CD8$^+$ after 6 days of coculture with either mDC or MPA-DC

Purified CD8$^+$ T lymphocytes were cocultured for 6 days with allogeneic MPA-DC or mDC. At the end of coculture, cells were harvested and expression of CD25, CD69, CD28, CD152, CD62L, CD103, CD134 and CD39 was assessed by FACS analysis for each condition: CD8$^+$[mDC] (left column of each histogram) and CD8$^+$[MPA-DC] (right column). Each point represents one experiment and the black bar represents the mean of 6 independent experiments. Wilcoxon test was used to calculate statistical differences between groups. The *p* value is indicated on each histogram of the figure. * $p<0.05$.

Figure 3

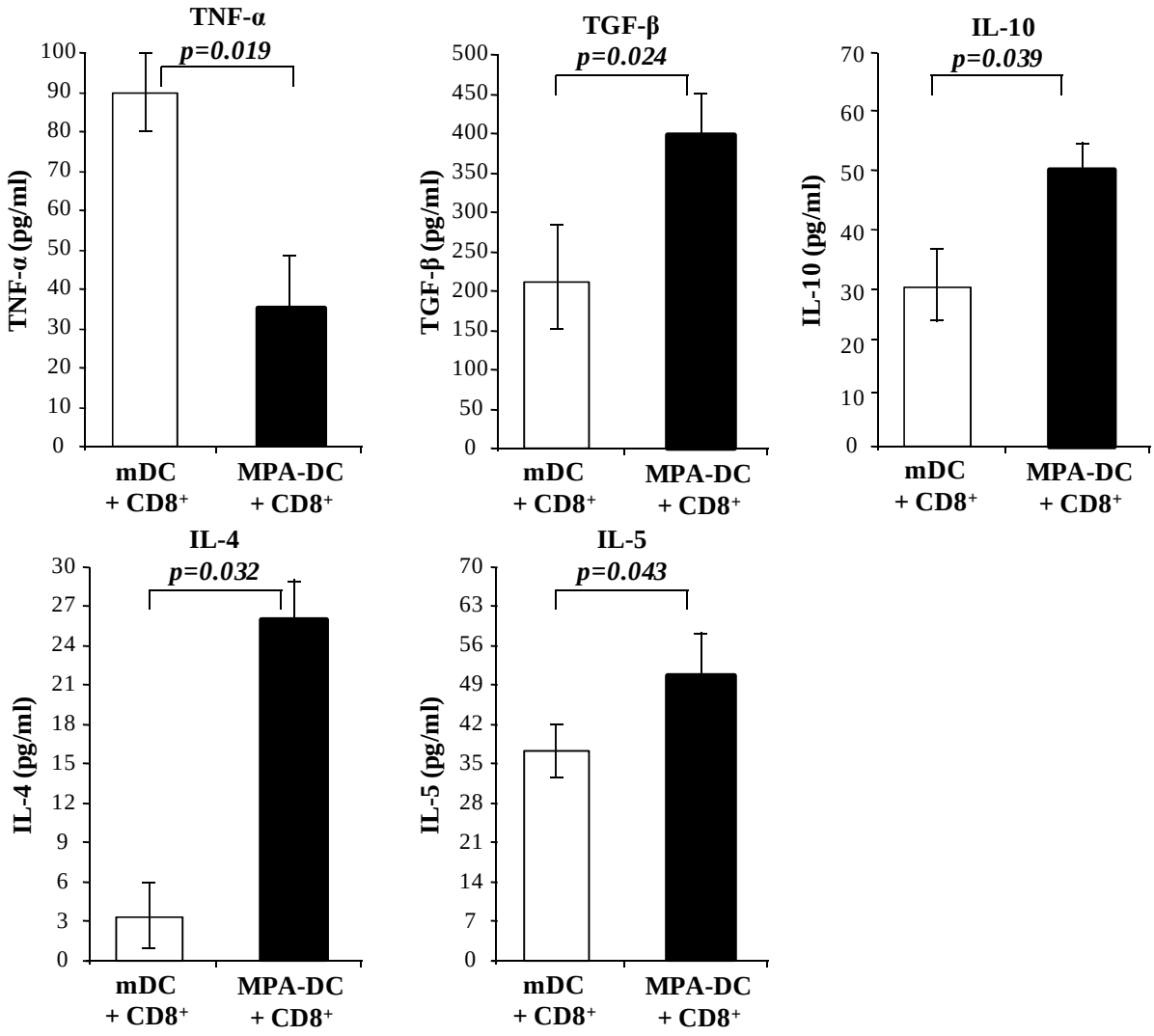


Figure 3: CD8$^+$ T cells cocultured with MPA-DC synthesized high levels of TGF-β, IL-4 and IL-5 and low levels of TNF-α. CD8$^+$ T cells were cocultured with either MPA-DC or mDC for 6 days and levels of TGF-β, IL-4, IL-5, IL-10 and TNF-α in supernatants were analyzed by ELISA. The samples were acidified and then neutralized to activate latent TGF-β1. The results are expressed in picograms per milliliter as mean ± SD of nine experiments. Wilcoxon test was used to calculate statistical differences between groups. The *p* value is indicated on each histogram of the figure. * $p<0.05$

Figure 4

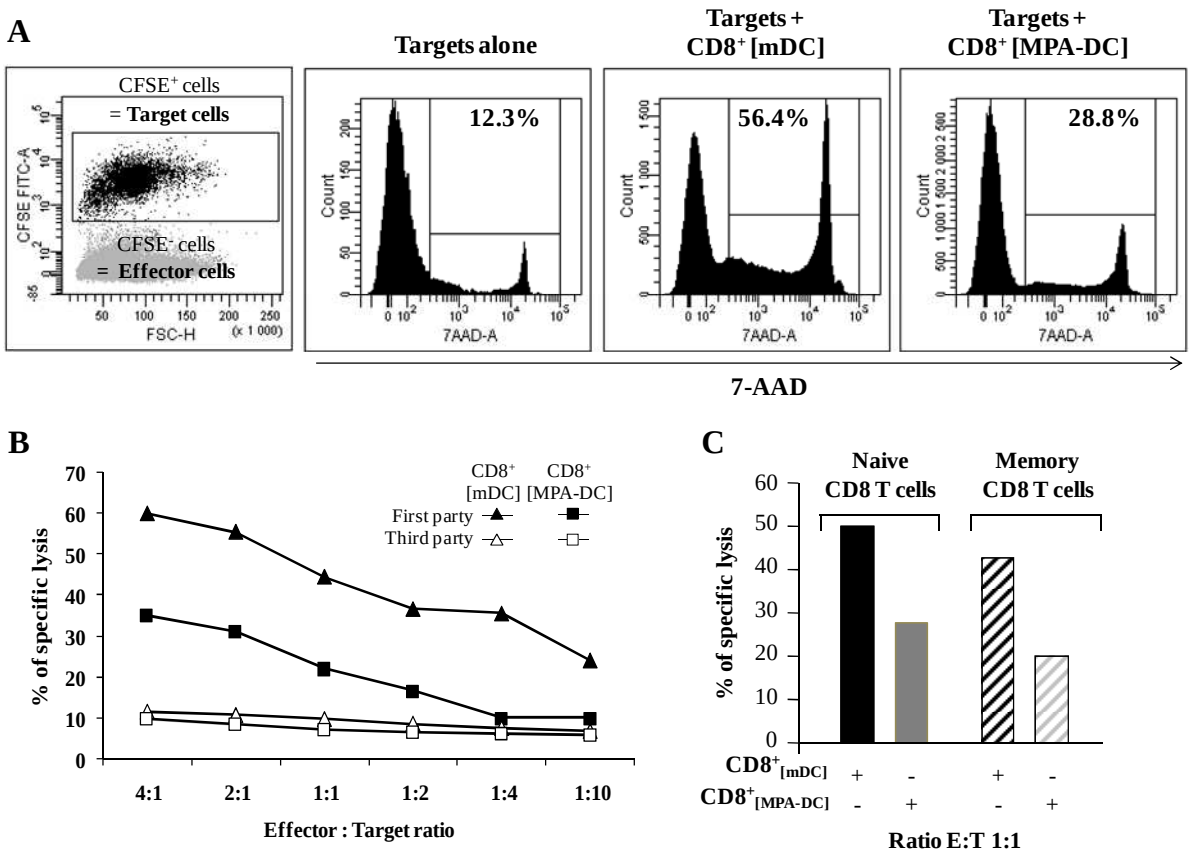


Figure 4: Decreased cytotoxic activity of both naive and memory CD8$^+$ [MPA-DC].

Effectors cells (E) were incubated at different E:T ratios in the presence of CFSE-labeled PBMC target cells (T) for 7 hours, as described in *Materials and Methods.* **A)** Target cell lysis was quantified by analyzing 7-AAD staining in CFSE-positive cells. CFSE and 7-AAD histograms from a representative experiment are shown and the percentages of 7-AAD-positive cells are indicated in each histogram. Basal lysis was measured on target cells incubated in the absence of effectors (target alone). **B)** To assess the specificity of CD8 cytotoxic function, CD8$^+$ [mDC] (triangles) or CD8$^+$ [MPA-DC] (squares) were mixed with PBMC from the first donor of DC (black curves) or from an unrelated donor (white curves) for 7 hours. PBMC lysis was assessed by CFSE/7-AAD staining and the percentage of specific target lysis was calculated as described in *Materials and Methods*. Results of one out of eight independent experiments are presented for six different E:T ratios. **C)** Percentage of specific lysis induced by naive (CD45RA$^+$) or memory (CD45RO$^+$) CD8$^+$ T cells cocultured with either mDC or MPA-DC was determined using PBMC from the first donor of DC at a E:T ratio of 1:1. Results of one out of three independent experiments are presented.

Figure 5

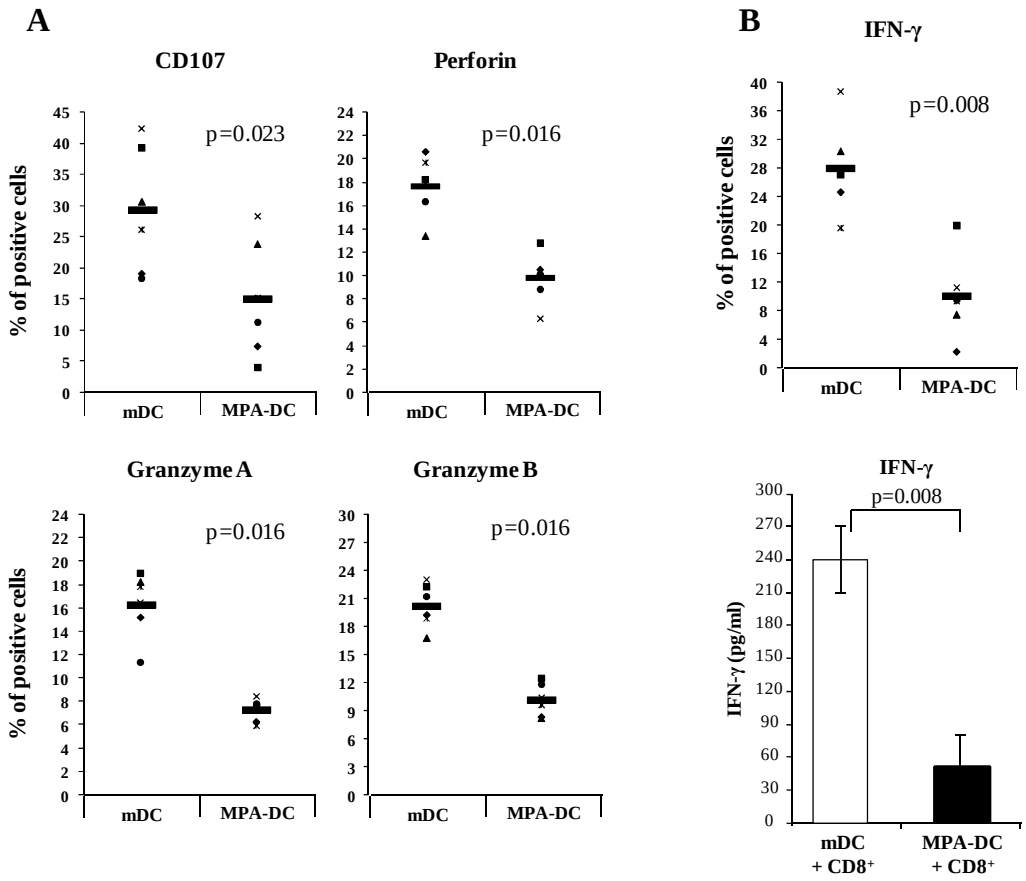


Figure 5: CD8$^+$ T cells cocultured with MPA-DC expressed low levels of both cytotoxicity associated proteins and IFN-γ.

Purified CD8$^+$ T cells were cocultured for 6 days with allogeneic MPA-DC or mDC. For intracellular staining, cells were incubated with Golgi Stop solution for the last 5 hours of culture. Each point represents one experiment and the black bar represents the mean of 6 independent experiments. The *p* value is indicated on each histogram of the figure. * $p<0.05$

A) At the end of coculture, cells were harvested and expression of the CD107a PE, Granzyme A PE, Granzyme B FITC and Perforin PE markers was assessed by FACS analysis.

B) IFN-γ synthesis was assessed by flow cytometry (upper panel) and by ELISA (lower panel) for CD8$^+$ T cells cocultured with mDC or MPA-DC. For intracytoplasmic staining of IFN-γ, results are expressed as percentage of positive cells expressing this cytokine. For secretion of IFN-γ in supernatants of cocultures, results are expressed in picograms per milliliter as mean ± SD of nine experiments. Wilcoxon test was used to calculate statistical differences between groups. * $p<0.05$.

Figure 6

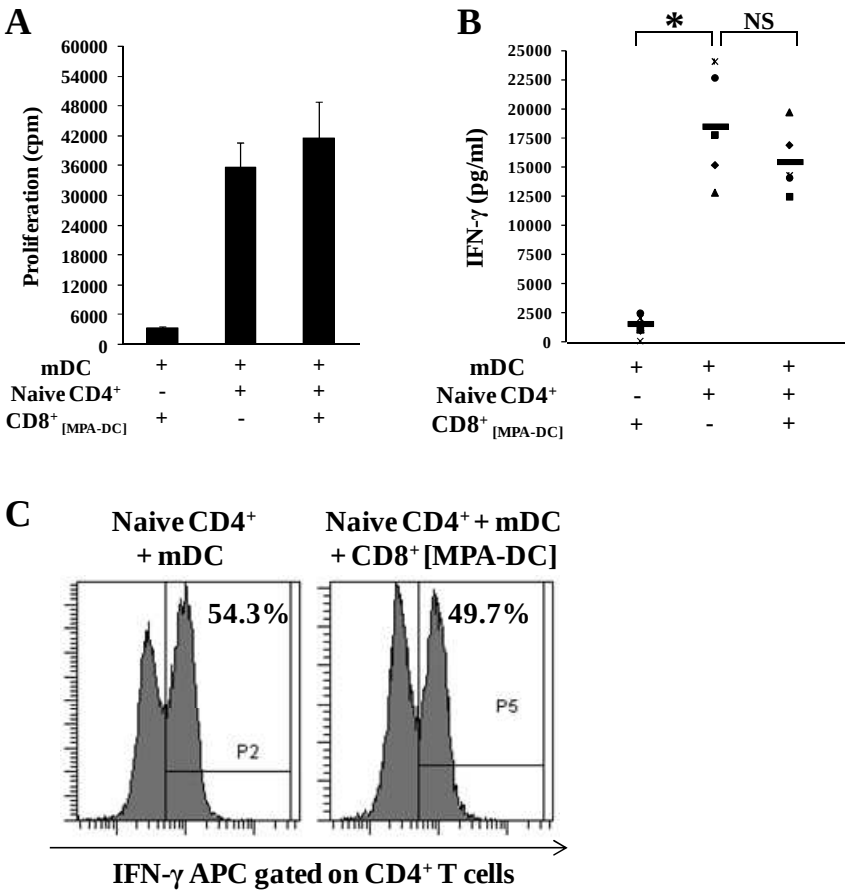


Figure 6: CD8$^+$ T cells cocultured with MPA-DC had no regulatory capacity *in vitro.*
Purified CD8$^+$ T cells were cocultured for 6 days with allogeneic mDC or MPA-DC. **A)** *CD8$^+$[MPA-DC] did not suppress the proliferation of responder CD4$^+$ T cells.* At day 6, CD8$^+$ [mDC] and CD8$^+$ [MPA-DC] were tested for their suppressive activity in MLR. Responder CD4$^+$ T cells (designated by the term naive CD4$^+$) were cocultured with allogeneic mature DC (mDC) for 5 days at a DC:T ratio of 1:3 and were used as a positive control. CD8$^+$ [mDC] or CD8$^+$ [MPA-DC] were added to the MLR at a CD8:CD4 ratio of 1:1. T-cell proliferation was assessed by 3H-thymidine incorporation during the last 18 hours of the 5 day MLR (mean cpm ± SD of triplicate wells). Data are representative of one out of six experiments. **B)** *CD8$^+$[MPA-DC] did not inhibit the secretion of IFN-γ in MLR.* At the end of the secondary MLR, the level of IFN-γ (pg/ml) was detected by ELISA in supernatants. Each point represents one experiment and the black bars represent the mean of 5 independent experiments. Wilcoxon test was used to calculate statistical differences between groups. *p<0.05 and NS=Not Significant.
C) *CD8$^+$[MPA-DC] did not inhibit intracellular IFN-γ expression of CD4$^+$ T cells.* Responder CD4$^+$ T cells were cocultured with allogeneic mDC in the presence (right dot plot) or absence (left dot plot) of CD8$^+$[MPA-DC] at a ratio of 1:1 for 5 days. At the end of coculture, cells were harvested and CD4 FITC / IFN-γ APC double staining was assessed by FACS analysis for the 2 conditions. The percentage of IFN-γ-positive cells among CD4-positive cells is shown in panel C. Results are representative of one out of 4 independent experiments.

Figure 7

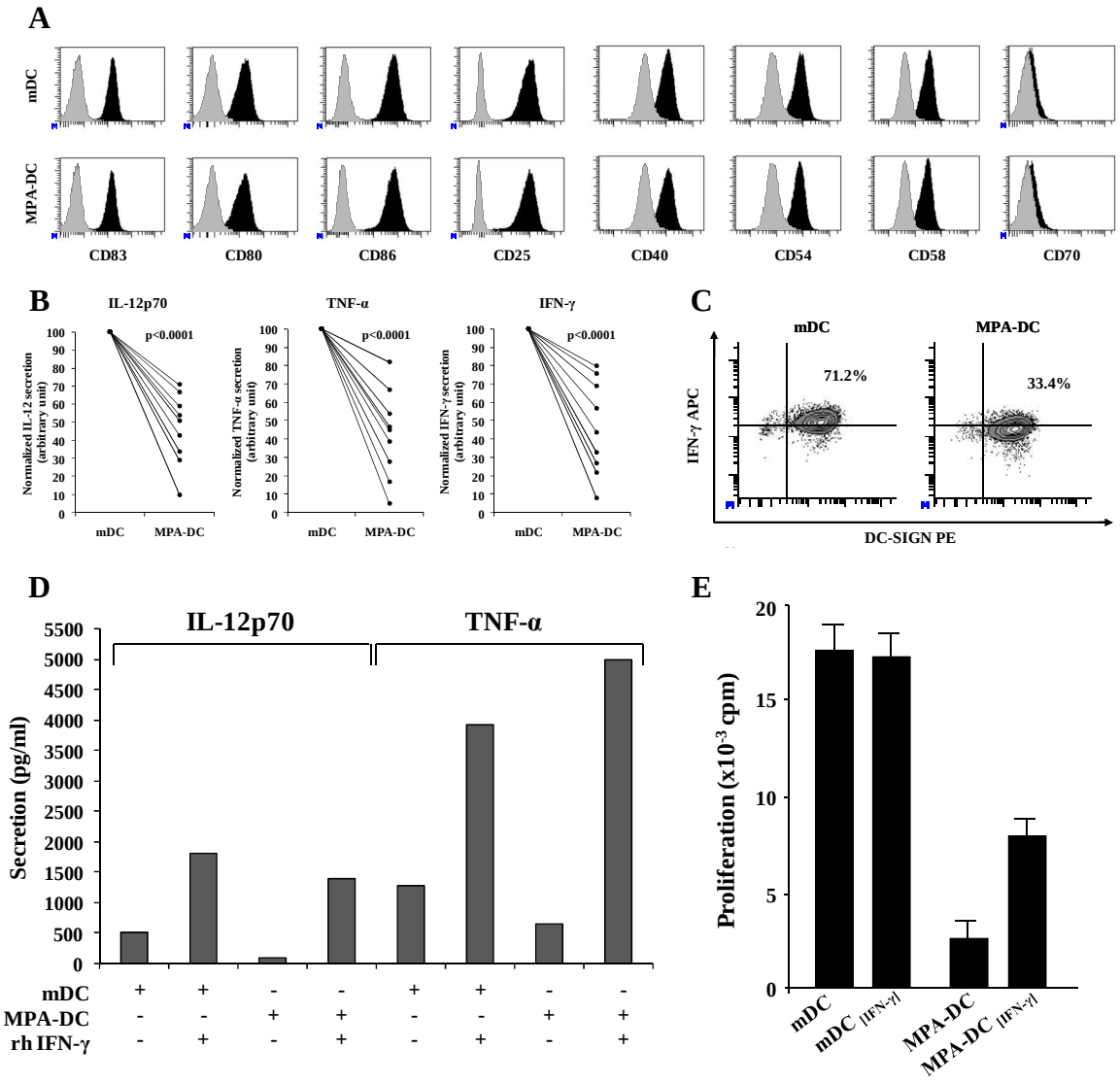


Figure 7: Exogenous IFN-γ completely restored IL-12 and TNF-α synthesis in MPA-DC and partially reconstituted their ability to activate $CD8^+$ T cells.

A) *MPA did not affect maturation marker expression induced by LPS on DC.* Surface marker expression was analyzed on human DC after maturation with LPS (50ng/ml) in the presence or absence of MPA (MPA-DC or mDC, respectively). Black histograms and gray histograms represent the expression of the cell-surface markers indicated and isotype control mAbs, respectively. **B)** *MPA inhibited cytokine synthesis by DC.* The levels of IL-12, IFN-γ and TNF-α were detected by ELISA in supernatants of mDC and MPA-DC cultures. The results are expressed in arbitrary units where the value 100 was given to mDC. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon test for paired non-parametric data. Significance is indicated by *p* value. **C)** *Intracytoplasmic IFN-γ in MPA-DC or in mDC.* Cells were double

stained for DC-SIGN and intracytoplasmic IFN-γ. The percentage of double positive cells is indicated on the figure. These results are representative of one out of five experiments. **D)** *IFN-γ completely restored IL-12 and TNF-α synthesis of MPA-treated DC.* When mentioned, recombinant human IFN-γ (10ng/ml) was added to immature DC 1 hour before LPS in the presence or absence of MPA. Levels of IL-12p70 and TNF-α were analyzed by ELISA in supernatants. One typical experiment out of three is shown. **E)** *IFN-γ partially restored the ability of MPA-DC to activate $CD8^+$ T cells.* Immature DC were incubated with rhIFN-γ and matured with LPS in the presence or absence of MPA (MPA-$DC_{[IFN-\gamma]}$ or $mDC_{[IFN-\gamma]}$, respectively) for 2 days. After maturation, DC were mixed with allogeneic purified $CD8^+$ T cells for 5 days. T cell proliferation was assessed by 3H-thymidine incorporation during the last 18 hours of MLR (mean cpm ± SD of triplicate wells). Results are representative of three donors.

2. Les cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique induisent des cellules T régulatrices

Situation :

Aujourd'hui encore de nombreuses pathologies conduisent à une défaillance irréversible de la fonction d'un tissu ou d'un organe pour laquelle aucune thérapie n'est possible. La transplantation reste alors l'unique solution pour pallier à ce déficit mais encore aujourd'hui, la greffe se heurte à de nombreuses difficultés et notamment aux problèmes de rejet chronique. En effet, ce dernier, défini comme la perte à long terme de la capacité fonctionnelle du greffon, est mal maîtrisé par les immunosuppresseurs. D'autre part, l'immunosuppression fait appel à des stratégies dont le but est de déprimer de manière globale l'immunité du receveur. Ce manque de spécificité est un problème majeur puisqu'il conduit à long terme à une fréquence augmentée des infections opportunistes et des tumeurs chez le patient ainsi traité. L'utilisation de protocoles d'induction de tolérance spécifique et permanente d'une allogreffe d'organe pourrait ainsi changer la face de la transplantation humaine actuelle.

Des études précédemment réalisées au laboratoire ont mis en évidence que les cellules dendritiques humaines traitées *in vitro* par l'acide mycophénolique pendant leur maturation avaient un profil dit « tolérogène ». En effet, ces cellules ont une faible expression des molécules de costimulation et/ou d'adhésion, elles sécrètent peu d'IL-12 mais de l'IL-10 et se révèlent incapables d'activer efficacement les lymphocytes T $CD4^+$ alloréactifs. Les cellules T cocultivées avec des cellules dendritiques traitées au MPA (MPA-DC) expriment peu le marqueur d'activation CD25 et prolifèrent très peu (Lagaraine et al., 2005).

Objectifs et résumé des résultats :

Ces observations nous ont amené à nous poser la question d'une possible induction de lymphocytes T régulateurs par les cellules dendritiques traitées par l'acide mycophénolique. De nombreuses études ont démontré que les DC dites tolérogènes étaient capables d'induire des populations T régulatrices après 7 à 10 jours de coculture. Ces cultures courtes ont été testées avec les DC-MPA mais les lymphocytes T $CD4^+$ ainsi cultivés ne possédaient pas de fonction suppressive. Nous nous sommes donc intéressés à un modèle de culture longue décrit

par Jonuleit *et al.* (Jonuleit et al., 2000). Après différentes mises au point afin d'adapter leur protocole à notre modèle, les lymphocytes T $CD4^+$ déplétés en $CD25^+$ (pour éliminer les Trég naturels) ont été cultivés pendant une semaine avec des DC matures (DC-TNF) ou avec des DC prétraitées avec du MPA en présence de TNF (DC-MPA). Après une semaine de culture, les lymphocytes $CD4^+$ sont restimulés trois fois à intervalle régulier d'une semaine par des DC-MPA ou des DC-TNF provenant du même donneur de départ. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-4 et d'IL-2 afin de limiter la mortalité des cellules. Au terme des 4 semaines de culture, nous avons analysé le profil des lymphocytes T $CD4^+$. Pour cela, nous avons étudié leur phénotype, leur synthèse de cytokines et leur fonctionnalité. Les cellules T stimulées par des DC-MPA sont anergiques à la fin de la culture longue puisqu'elles sont incapables de répondre à toute nouvelle activation induite par des DC matures.

Nos résultats démontrent que les lymphocytes T $CD4^+$ stimulés par des DC-MPA possèdent une activité suppressive puisqu'ils inhibent la prolifération de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs et pré-activés. Cette activité suppressive apparaît comme étant antigène spécifique et contact-dépendant. Les populations de lymphocytes T activés par les DC-MPA sont caractérisées par l'augmentation de l'expression des marqueurs CD25, GITR, CTLA-4, CD95 et du facteur de transcription Foxp3 ainsi que par une sécrétion importante d'IL-10 et de TGF-β comparées aux cultures avec des DC-TNF.

Ces résultats obtenus *in vitro* démontrent que les DC-MPA humaines induisent des lymphocytes T régulateurs allospécifiques qui pourraient être potentiellement utilisés en thérapie cellulaire afin de promouvoir une tolérance d'allogreffe.

Article paru dans « Journal of Leukocyte Biology »

Induction of human CD4$^+$ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells

Christine Lagaraine,*,[1,2] Roxane Lemoine,*,[1] Christophe Baron,* Hubert Nivet,* Florence Velge-Roussel,*,† and Yvon Lebranchu*

*JE 2448, "Cellules Dendritiques et Greffes," and †UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

Abstract: Depending on their degree of maturation, costimulatory molecule expression, and cytokine secretion, dendritic cells (DC) can induce immunity or tolerance. DC treated with mycophenolic acid during their maturation (MPA-DC) have a regulatory phenotype and may therefore provide a new approach to induce allograft tolerance. Purified CD4$^+$ T cells stimulated in a human in vitro model of mixed culture by allogeneic MPA-DC displayed much weaker proliferation than T cells activated by mature DC and were anergic. This hyporesponsiveness was alloantigen-specific. Interestingly, T cells stimulated by MPA-DC during long-term coculture in four 7-day cycles displayed potent, suppressive activity, as revealed by marked inhibition of the proliferation of naive and preactivated control T cells. These regulatory T cells (Tregs) appeared to have antigen specificity and were contact-dependent. Tregs induced by MPA-DC were CD25$^+$glucocorticoid-induced TNFR$^+$CTLA-4$^+$CD95$^+$, secreted IL-5 and large amounts of IL-10 and TGF-β, and displayed enhanced forkhead box p3 expression. These results obtained in vitro demonstrate that human MPA-DC can induce allospecific Tregs that may be exploited in cell therapy to induce allograft tolerance. *J. Leukoc. Biol.* 84: 1057–1064; 2008.

Key Words: *tolerance · suppression · T lymphocytes*

INTRODUCTION

During organ transplantation, interactions between dendritic cells (DC) and T cells lead to the activation, proliferation, and secretion of various cytokines by T cells, thus allowing the development of an expanded population of mature effector cells responsible for the cellular and humoral mechanisms of rejection [1, 2]. Nevertheless, DC can also be tolerogenic [3–5] and therefore, can be used to inactivate alloreactive T lymphocytes selectively to achieve graft tolerance [6, 7]. Many studies have therefore been undertaken to induce tolerogenic DC, in particular, using pharmacological agents [8, 9]. In fact, we have shown previously that mycophenolic acid (MPA) impairs the maturation and functions of human DC that acquire regulatory properties (low expression of CD83, CD40, CD80, CD86, and class II molecules, high secretion of IL-10, and low levels of IL-12) but have a mature, migratory phenotype [10]. These MPA-DC are unable to induce full T cell proliferation in response to alloantigens.

It is therefore important to clarify the effects of MPA-DC on human alloreactive CD4$^+$ T cells to devise a strategy for inducing allograft tolerance. Peripheral tolerance can be a result of anergy [11–13], apoptosis by activated-induced cell death [14], or suppression by regulatory T cells (Tregs) [15–20].

To shed light on the mechanisms of the inhibitory effects of MPA-DC on allogeneic T cells, we analyzed the characteristics of purified human CD4$^+$ T cells stimulated by allogeneic DC treated with MPA during their maturation with regard to phenotype, proliferation, and cytokine production. We demonstrated that CD4$^+$ T cells induced by MPA-DC could not be fully activated, proliferated only weakly, and synthesized small amounts of IFN-γ. In an in vitro model of mixed secondary coculture, first with MPA-DC and then with mature DC (mDC), we also showed that CD4$^+$ T cells induced by MPA-DC were hyporesponsive and that anergy was alloantigen-specific. Interestingly, we found that four cycles of 7-day coculture with MPA-DC resulted in the appearance of Tregs that displayed potent, suppressive activity against naive and activated T cells. Moreover, this regulatory activity was alloantigen-specific and contact-dependent. Tregs induced by MPA-DC secreted large amounts of IL-10 and TGF-β, had high expression of CD25, glucocorticoid-induced TNFR (GITR), CTLA-4, and CD95, and displayed up-regulated expression of forkhead box p3 (Foxp3).

MATERIALS AND METHODS

Isolation of CD4$^+$ and CD4$^+$CD25$^-$ T lymphocytes

Blood from healthy donors was obtained by cytapheresis (informed consent was obtained from volunteers). Human PBMC were then isolated by centrifuging over Ficoll hypaque (Lymphoprep, Abcys, France). PBMC were first depleted of adherent cells by two 45-min adhesion cycles on plastic. CD4$^+$ T lymphocytes were then isolated using anti-CD4-coated Dynabeads®, followed by Detachabeads® (Dynal, Compiegne, France), according to the manufacturer's instructions. When specified, purified CD4$^+$ T cells were depleted of CD25$^+$ using anti-CD25 (mouse IgG1, clone M-A251) and Dynabeads coated with a human anti-mouse IgG, according to the manufacturer's instructions.

[1] These authors contributed equally to this work.

[2] Correspondence: Université Francois-Rabelais de Tours, JE 2448, "Cellules Dendritiques et Greffes," 10 Bd Tonnelle, Tours, 37000, France. E-mail: lebranchu@med.univ-tours.fr

Received October 26, 2007; revised April 21, 2008; accepted May 11, 2008. doi: 10.1189/jlb.1007716

Generation of DC

Monocyte-derived DC were differentiated with IL-4 and GM-CSF as described previously [10]. On Day 5, immature DC were harvested, washed, and resuspended in culture medium with IL-4 and GM-CSF. TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was added at 20 ng/mL for 2 days, with or without 100 μM MPA (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), to obtain MPA-DC or mDC, respectively. On Day 7, DC were harvested, washed extensively, and used for subsequent experiments.

Allogeneic MLR

MPA-DC or mDC were placed in 96-well flat-bottomed culture plates (Falcon, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) at 3×10^4 cells in 100 μL per well (unless otherwise indicated), and $CD4^+$ T cells (10^5 cells/100 μL) were added to each well (when specified, IL-2 was added to the culture at 100 IU/mL, R&D Systems). Cell proliferation was assessed from the incorporation of 1 μCi [^{3}H]-thymidine (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) during the last 18 h of 5 days' culture and measured by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2550 TR/LL, Packard, Downers Grove, IL, USA).

In some experiments, we carried out secondary allogeneic MLRs: Allogeneic $CD4^+$ T cells (10^7 cells/sample) were first cocultured with 3×10^6 mDC or MPA-DC in 20 mL RPMI-10% FCS in 25 cm^2 flasks (when specified, IL-2 was added to the culture at 100 IU/mL). On Day 5, cells were harvested, washed, and cocultured with irradiated mDC from the same donor or from an unrelated donor in 96-well flat-bottomed plates in 200 μl of the same culture medium as used above with a DC:T cell ratio of 1:3 (when specified, IL-2 was added to the wells at 100 IU/mL). $CD4^+$ T cell proliferation was then assessed as in the first MLR.

Long-term coculture

$CD4^+$ T cells were cocultured with allogeneic mDC or MPA-DC during the first incubation at a density of 2×10^6 T cells with 0.6×10^6 DC without any exogenous cytokine. At Day 7, T cells were restimulated with 0.6×10^6 mDC or MPA-DC generated from the same donor as for the first coculture (stored at −80°C in RPMI-10% FCS+10% DMSO until use), as described by Jonuleit et al. [15], in culture medium containing 2 IU/ml IL-2 and 25 ng/ml IL-4. Two more cycles of mDC or MPA-DC restimulation were performed after intervals of 7 days.

At the end of coculture, experimental and control T cells were harvested, counted, and used in V-bottomed culture wells (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) to carry out a MLR with mDC from the same donor as used in the first activation. An equal number of MPA-DC-induced T cells or mDC-induced T cells and a 1:3 DC:T cell ratio were used in the tests [when specified, IL-10 mAb (clone 23738) and IL-10 Rβ mAb (clone 90220) or TGF-β1 mAb (clone 9016) were added to the wells at 20 μg/mL, 5 μg/mL, and 20 μg/ml, respectively (R&D Systems)]. Transwell membranes (0.2 μm, NUNC A/S) were used in some experiments. MPA-DC- or mDC-induced T cells were above the transwell membrane, and DC with allogeneic $CD4^+CD25^-$ responder T cells were in the bottom well. In some experiments, $CD4^+$ T cells were cocultured with mDC for 4 weeks without restimulation. These presensitized T cells were then used as responders in suppression tests. Proliferation was measured 4 days later by thymidine incorporation. When specified, MPA-DC-induced T cells were irradiated at 16 Gy.

Analysis of cytokine production

$CD4^+$ T cells were cocultured for 5 days or 4 weeks with MPA-DC or mDC as described above. At the end of short-term coculture, T cells were harvested, enumerated, and then stimulated with the Dynabeads CD3/CD28 T cell expander (at a ratio of one bead:five cells) for 48 h. Supernatants were also harvested and stored at −20°C until analysis. Cytokine levels of IL-5, IL-10, IFN-γ, and TGF-β1 were determined using appropriate human ELISA kits (eBiosciences, Montrouge, France), according to the manufacturer's protocols. The samples were acidified (1 N HCl) and then neutralized (1 N NaOH) to activate latent TGF-β1.

Analysis of cell-surface molecule expression by flow cytometry

At the end of 4 weeks' coculture, $CD4^+$ T cells were harvested, and 2×10^5 cells/sample were resuspended in PBS. Cells were then incubated with saturating concentrations of the different fluorochrome-conjugated mAb for 30 min at 4°C. The stained cells were washed twice in PBS and then fixed in 0.5% paraformaldehyde PBS solution until analyzed by flow cytometry. Cell-surface expression was analyzed using a 488-nm laser flow cytometer (FACSCanto®, Becton Dickinson) using Diva® software (Becton Dickinson). Data were analyzed for geometric mean fluorescence intensity (MFI) of the antibody of interest/MFI of the control isotype and for the percentage of marker-positive cells (at least 20,000 cells/sample were analyzed). The following mouse anti-human mAb were used: FITC-anti-CD4 (IgG1, clone 13B8.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), allophycocyanin (APC)-anti-CD25 (IgG1, M-A251, Becton Dickinson), APC-anti-CD45RO (IgG2a, UCHL1, Becton Dickinson), PE-anti-CD95 (IgG1, UB2, Beckman Coulter), PE-anti-GITR (IgG1, 110416, R&D Systems), and PE-anti-CD152 (IgG2a, BN13, Beckman Coulter) and were analyzed by FACS.

For intracellular staining of Foxp3, $CD4^+$ T cells from the two subsets were surface-stained with APC-anti-CD25 and then fixed and permeabilized with a kit purchased from eBiosciences and subsequently stained for Foxp3 (IgG2a, PCH101, from eBiosciences).

RT-PCR for Foxp3 expression

For RT-PCR, RNA was extracted from 1×10^6 snap-frozen cell pellets kept at −80°C with Dynabeads mRNA Direct™ kit (Dynal). First-strand cDNA was synthesized using 1 μl avian myeloblastosis virus RT (15 U), 4 μl 5× RT buffer, 1 μl RNase Out, and 1 μl DTT (0.1 M; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The gene expression profile of the transcription factor Foxp3 was measured using the iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I (Eurogentec, San Diego, CA, USA).

The following primers were used: β-actin (forward) 5′-GCCCTAGACTTCGAGCAAGA-3′, β-actin (reverse) 5′-AGGAAGGAAGGCTGAAGAG-3′; Foxp3 (forward) 5′-GGGCACAATGTCTCCTCCA-3′, Foxp3 (reverse) 5′-CTTCTCCTTCTCCAGCACCA-3′. The amplification protocol consisted of an initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 60 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 10 s, extension at 72°C for 10 s, followed by a final extension at 72°C for 6 min. The relative expression of Foxp3 was determined by normalizing the expression of each target to the housekeeping gene, β-actin.

Statistical analysis

Statistical significance of parametric data was calculated using standard methods. Results are reported as the mean ± SD and were compared using Student's *t*-test. The statistical significance of nonparametric results was evaluated by the Wilcoxon test. For all tests, a P value of <0.05 was regarded as statistically significant.

RESULTS

$CD4^+$ T cells cocultured with MPA-DC proliferated weakly and were anergic

We have shown previously that treating human DC with MPA resulted in decreased expression of costimulatory molecules and increased synthesis of IL-10 compared with mDC [10]. We decided to investigate the ability of these MPA-DC to induce allogeneic $CD4^+$ T cell activation in 5-day MLR cultures. Allogeneic $CD4^+$ T cells (10^5) were mixed with mDC or MPA-DC (3×10^4). Cell proliferation and expression of activation markers were assessed on Day 5. As shown in **Figure 1A**, allogeneic $CD4^+$ T cells cocultured with MPA-DC exhibited a lower proliferative response and lower expression of activation markers such as CD25 [10], CD54, CD40 ligand, and CD134 molecules compared with mDC (data not shown). Moreover, $CD4^+$ T cells first depleted of natural $CD25^+$ Tregs were also hyporesponsive to allogeneic MPA-DC (Fig. 1A), suggesting that $CD25^+$ natural Tregs were not involved in this phenomenon.

We then investigated whether $CD4^+$ T cell unresponsiveness was alloantigen-specific by restimulation with third-party mDC. Figure 1B shows that $CD4^+$ T cells cocultured with MPA-DC were fully responsive to the third-party DC (hatched bars), whereas they remained hyporesponsive to subsequent

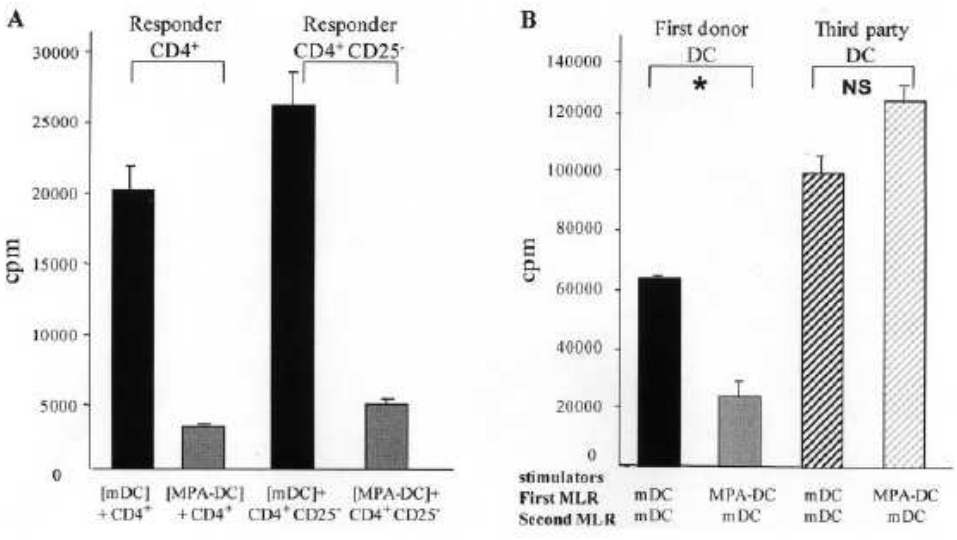


Fig. 1. MPA-DC induce donor-specific $CD4^+$ T cell unresponsiveness independently of the presence of $CD25^+$ natural Tregs. MPA-DC and mDC designate DC matured with TNF-α (20 ng/ml) for 2 days in the presence or absence of MPA (100 μM), respectively. (A) Purified $CD4^+$ T lymphocytes depleted of $CD25^+$ natural Tregs or left undepleted were cocultured with allogeneic MPA-DC or mDC for 5 days at a DC:T ratio of 1:3. T cell proliferation was measured by incorporation of 1 μCi [3H]-thymidine added for the last 18 h of culture. (B) Donor-specificity unresponsiveness was assessed by a second stimulation using mDC from the first DC donor (filled bars) or a third party (hatched bars). T cell proliferation was measured on Day 3 by incorporation of [3H]-thymidine. Data are expressed in mean of cpm ± SD obtained from triplicate wells. Results are representative of four independent experiments; *, $P < 0.005$. NS, Not significant.

stimulations with mDC from the first donor (filled bars). These findings demonstrated that MPA-DC-induced hyporesponsiveness was alloantigen-specific.

Exogenous IL-2 prevented but did not reverse the induction of T cell hyporesponsiveness

We also demonstrated that $CD4^+$ T cells stimulated with MPA-DC produced less IL-2 mRNA than $CD4^+$ T cells activated with mDC (data not shown). Given the role of IL-2 in lymphocyte proliferation, we also addressed the question of whether a lower availability of IL-2 might be involved in this hyporesponsiveness. We demonstrated that adding exogenous IL-2 during the first round of stimulation with MPA-DC restored the response to subsequent stimulation with mDC from the first donor, whereas in the absence of IL-2, $CD4^+$ T cells remained hyporesponsive to subsequent stimulation with the first donor mDC (**Fig. 2A**). We next demonstrated that exogenous IL-2 supplementation during the second coculture of $CD4^+$ T cells with mDC did not abrogate the T cell hyporesponsiveness once it had been induced (Fig. 2B). These findings suggested that inhibition of IL-2 synthesis was essential for the induction of CD4 T cell hyporesponsiveness. However, once induced, hyporesponsiveness could not be reversed by exogenous IL-2.

MPA-DC-induced Th2-type allogeneic $CD4^+$ T cells

Cytokine measurement in supernatants harvested at the end of coculture between $CD4^+$ T cells and MPA-DC revealed drastically reduced production of IFN-γ (**Fig. 3**). Moreover, $CD4^+$ T cells cocultured with MPA-DC and restimulated with anti-CD3/CD28 antibodies secreted large amounts of IL-10 and IL-5 compared with $CD4^+$ T cells cocultured with mDC (Fig. 3). Taken together, these findings indicate that MPA-DC induce a shift in the T cell cytokine pattern toward a Th2 profile.

$CD4^+$ T cells repeatedly stimulated with MPA-DC acquired antigen-specific, suppressive activity

We therefore explored the possible regulatory properties of these $CD4^+$ T cells. As the suppressive activity was barely detectable at the end of the first coculture, we assessed long-term cocultures with weekly restimulation by fresh mDC or MPA-DC.

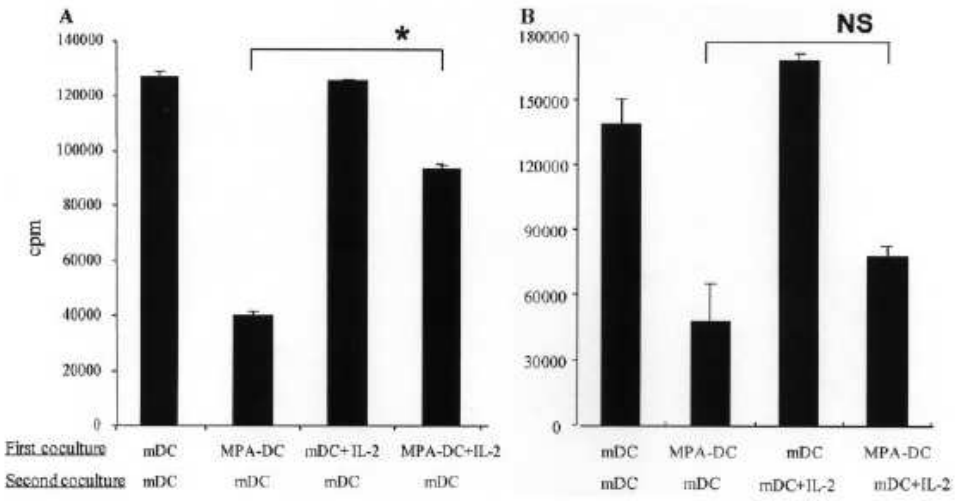


Fig. 2. Exogenous IL-2 prevents the induction of T cell hyporesponsiveness (A) but does not abrogate T cell anergy once it has been induced by MPA-DC (B). (A) First coculture of allogeneic $CD4^+$ T cells with MPA-DC or mDC was performed for 5 days in the presence or absence of exogenous IL-2 (100 IU/ml), followed by secondary, 3-day coculture with mDC from the donor used in the first coculture. (B) First coculture of allogeneic $CD4^+$ T cells was performed with MPA-DC or mDC, followed by a second stimulation in the presence or absence of exogenous IL-2 (100 IU/ml) with mDC from the donor used in the first coculture. Proliferation was assessed at Day 3 of the second coculture by [3H]-thymidine incorporation (mean±SD of a triplicate). Data are representative of one of three experiments; *, $P < 0.005$.

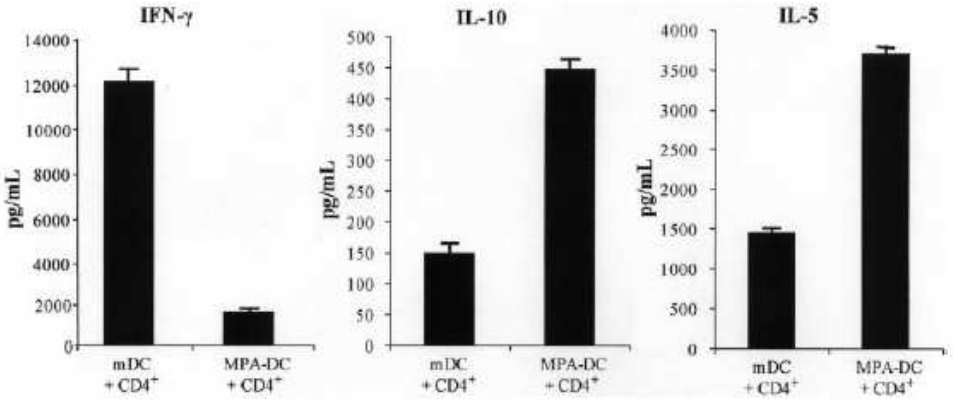


Fig. 3. T cells cocultured with MPA-DC and restimulated with anti-CD3/CD28 produce high levels of IL-10 and IL-5 and low levels of IFN-γ. $CD4^+$ T cells activated by MPA-DC or mDC for 5 days were then restimulated with anti-CD3/CD28 for 48 h. The levels of cytokines produced were assessed by ELISA. The results are expressed in picograms per milliliter as mean ± SD of triplicate determination. Data are representative of one of six experiments.

One week of stimulation with MPA-DC without cytokines, followed by three rounds of weekly restimulation with MPA-DC, were performed in the presence of IL-2 and IL-4 (as described in Materials and Methods) to obtain anergic T cells. At the end of this long-term coculture, allogeneic mDC from Donor A were used to activate naïve, responding $CD4^+CD25^-$ T cells from Donor B in the presence or absence of an equal number of anergic $CD4^+$ T cells from Donor B, obtained after long-term stimulation with MPA-DC from Donor A. Proliferation was assessed on Day 4. As shown in **Figure 4A**, $CD4^+$ T cells cocultured with MPA-DC in these conditions remained anergic (light gray bar) and strongly suppressed the proliferation of responder $CD4^+$ $CD25^-$ T cells activated by allogeneic mDC (Fig. 4, dark gray bars). In contrast, $CD4^+$ T cells repeatedly stimulated with allogeneic mDC in the same conditions (activated control T cells) inhibited the alloproliferative response of naive T cells only slightly (Fig. 4A, fine grid bar), although they had become hyporesponsive at the end of the

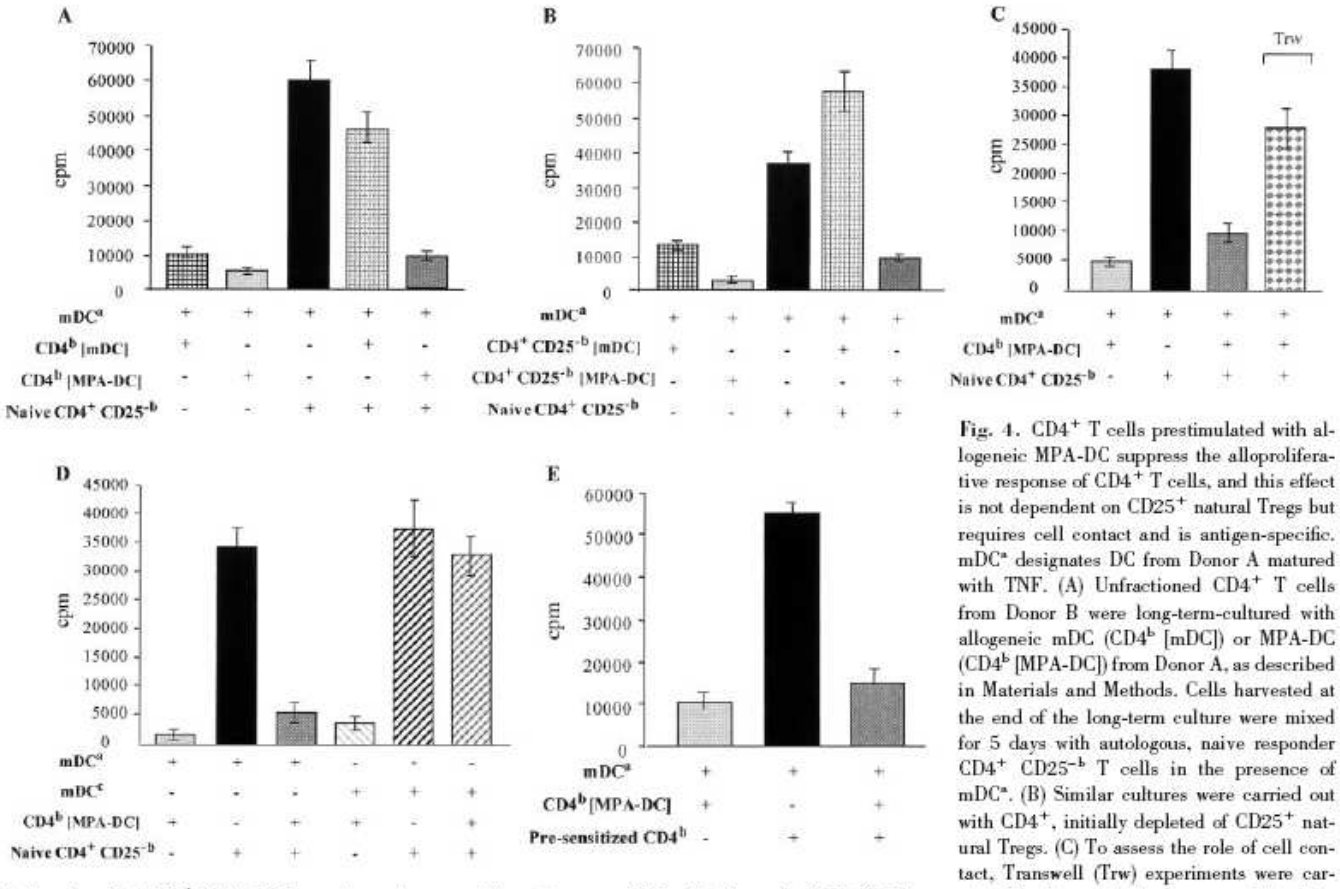


Fig. 4. $CD4^+$ T cells prestimulated with allogeneic MPA-DC suppress the alloproliferative response of $CD4^+$ T cells, and this effect is not dependent on $CD25^+$ natural Tregs but requires cell contact and is antigen-specific. mDC^a designates DC from Donor A matured with TNF. (A) Unfractioned $CD4^+$ T cells from Donor B were long-term-cultured with allogeneic mDC ($CD4^b$ [mDC]) or MPA-DC ($CD4^b$ [MPA-DC]) from Donor A, as described in Materials and Methods. Cells harvested at the end of the long-term culture were mixed for 5 days with autologous, naive responder $CD4^+$ $CD25^{-b}$ T cells in the presence of mDC^a. (B) Similar cultures were carried out with $CD4^+$, initially depleted of $CD25^+$ natural Tregs. (C) To assess the role of cell contact, Transwell (Trw) experiments were carried out in which $CD4^b$ [MPA-DC] were above the transwell membrane, and DC with allogeneic $CD4^+$ $CD25^-$ responder T cells were in the bottom well. At Day 4, [^{3}H]-thymidine was added to bottom wells to assess proliferation. (D) To assess specificity of donor suppression, $CD4^b$ [MPA-DC] were irradiated at 16 Gy at the end of long-term culture and then mixed with naive $CD4^+$ $CD25^-$ responders and mDC from the donor of MPA-DC (dark, shaded bar) or from a third-party donor (right-hatched bar). (E) Presensitized $CD4^b$ designate $CD4^+$ T lymphocytes precultured with allogeneic mDC^a. At the end of long-term culture, $CD4^b$ [MPA-DC] were mixed for 5 days with mDC^a and autologous, presensitized $CD4^+$ T cells as responder cells. T cell proliferation was assessed by [3H]-thymidine incorporation during the last 18 h of the 5-day MLR (mean cpm±SD of triplicate). Results shown in each panel are representative of three independent experiments.

four cycles of restimulation (Fig. 4A, heavy grid bar). These experiments demonstrated that repeated stimulation with allogeneic MPA-DC drove $CD4^+$ T cells to acquire regulatory activity, whereas repeated stimulation with mDC did not.

In addition, repeated stimulation of $CD4^+$ T cells initially depleted of natural $CD25^+$ Tregs led to similar regulatory capacity (Fig. 4B). This suggested that suppression was not dependent on the presence of $CD25^+$ natural Tregs.

The role of cell contact was then assessed to further characterize the suppressive activity. Transwell experiments were carried out in which $CD4^+$ T cells induced by repeated stimulation with MPA-DC were above the transwell membrane, and DC and allogeneic responder T cells were in the bottom well. Figure 4C shows that suppression was abrogated when Tregs were not in contact with DC or responding T cells (checkered bar).

Antigenic specificity was explored by testing the ability to suppress a third-party alloresponse. However, as the cell population containing the Treg was fully responsive to third-party mDC, we decided to irradiate this population before testing its suppressive activity, according to a protocol described by Hamdi et al. [21]. These authors demonstrated that γ-irradiation did not affect the suppressive capacity of antigen-specific Tregs after they had been generated in vitro. First, in our model, we confirmed that irradiation did not affect the capacity of Tregs to suppress the response to the first-party DC (dark, shaded bar in Fig. 4D), and then we demonstrated that they could not inhibit a third-party response (right-hatched bar in Fig. 4D). This result indicates that first-party DC need to be present to develop the suppressive activity of Tregs. Therefore, MPA-DC-induced $CD4^+$ T cells appeared to have antigen specificity.

We also tested the suppressive ability of our Tregs on presensitized T cells. $CD4^+$ T cells prestimulated for 4 weeks with mDC were used as responders in suppression tests. We demonstrated that MPA-DC-induced $CD4^+$ T cells were able to suppress the proliferation of $CD4^+$ T cells preactivated by mDC (Fig. 4E).

AnnexinV/7-amino actinomycin staining was performed to check the viability of the anergic T cells after long-term coculture. There were no significant differences between the numbers of apoptotic and necrotic cells in MPA-DC-stimulated $CD4^+$ T cells compared with control T cells (data not shown). The suppressive activity of anergic T cells was therefore not attributable to increased apoptosis of MPA-DC-stimulated T cells.

$CD4^+$ Treg population, long-term-cultured with MPA-DC, synthesized large amounts of IL-5, IL-10, and TGF-β

To further characterize the population of $CD4^+$ Tregs obtained after several cycles of coculture with MPA-DC, we measured the cytokine production of $CD4^+$ T cells at the end of 4 weeks' coculture. These experiments showed that $CD4^+$ T cells cocultured with MPA-DC secreted large amounts of IL-10 and IL-5 and produced less IFN-γ than $CD4^+$ T cells cultured for 4 weeks with mDC (**Fig. 5**). They also secreted high levels of TGF-β.

The role of IL-10 and TGF-β in such suppression was confirmed, as they have already been implicated in many models of T cell regulation. We used a mixture of anti-IL-10 and anti-IL-10R antibodies to block the IL-10 pathway and an anti-TGF-β1 antibody to inhibit TGF-β in the final MLR. We found that blocking the IL-10 or the TGF-β pathways did not affect the suppressive activity of $CD4^+$ T cells stimulated with MPA-DC (**Fig. 6, A** and **B**).

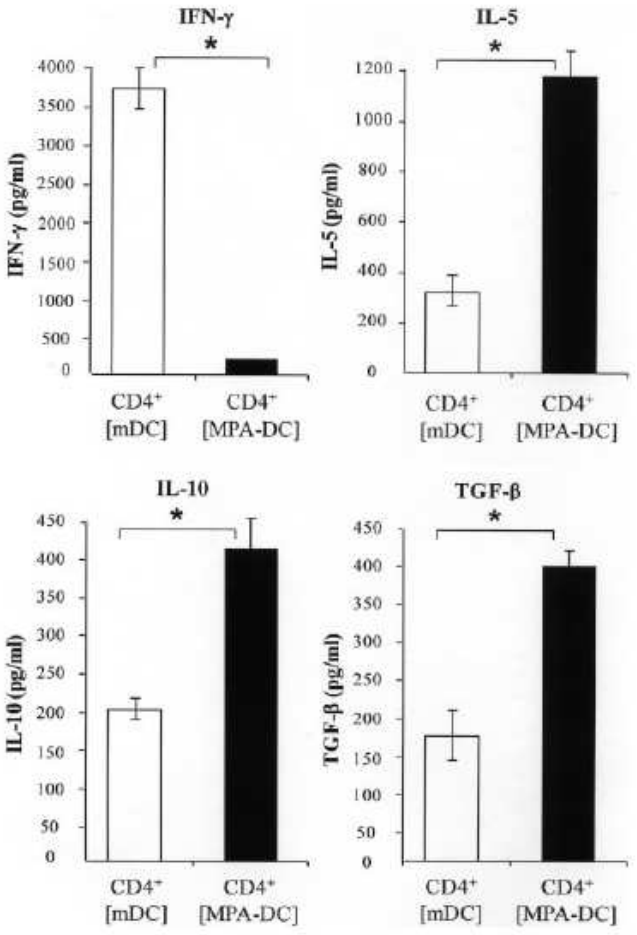


Fig. 5. $CD4^+$ T cells cultured with MPA-DC for 4 weeks synthesize high levels of IL-5, IL-10, and TGF-β and low levels of IFN-γ. The production of IL-10, IFN-γ, IL-5, and TGF-β was assessed by ELISA at the end of long-term coculture. The bars represent mean ± SD of cytokine concentrations in the culture supernatants of six independent experiments. Statistical significance is indicated on the figure. *, $P < 0.005$.

Surface phenotype and expression of Foxp3 in $CD4^+$ T cells after long-term coculture with MPA-DC

Several markers such as CD25, GITR, CD95, and CTLA-4 have been reported previously to be expressed on Tregs. We therefore investigated their expression on $CD4^+$ T cells after long-term coculture with MPA-DC or mDC. After four cycles of stimulation, we found more positive cells expressing CD25 and GITR in $CD4^+$ T cells cultured with MPA-DC compared with mDC (33.8% vs. 12.1% for CD25 and 20.4% vs. 2.4% for GITR). In particular, $CD25^{high}$ cells were barely detectable among $CD4^+$ T lymphocytes stimulated with mDC (<1%), whereas they represented 8.9% of $CD4^+$ T cells stimulated by MPA-DC. Moreover, the intensity of expression of these markers was also higher in the MPA condition (MFI were 7281 vs. 4031 for CD25 and 11559 vs. 5977 for GITR; **Fig. 7A**). Intracellular expression of CTLA-4 was increased in the $CD4^+$

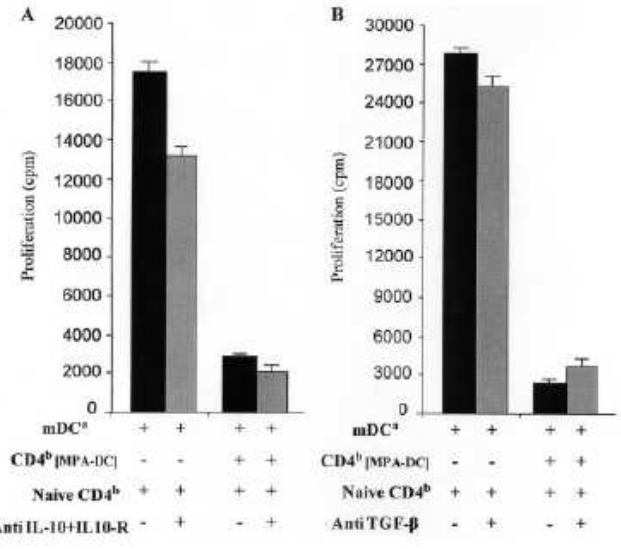


Fig. 6. Anti-IL-10/IL-10R and anti-TGF-β antibodies do not inhibit the suppressive activity of CD4+ [MPA-DC]. Unfractioned CD4+ T cells from Donor B were first long-term-cultured with allogeneic MPA-DC[a] (CD4[b] [MPA-DC]), as described in Materials and Methods. (A) Cells harvested at the end of the long-term culture were mixed for 5 days with autologous CD4+ responder cells and mDC[a] in the presence (shaded bars) or absence (solid bars) of a mix of anti-IL-10 (20 μg/ml) and anti-IL-10R (5 μg/mL) mAb. (B) Similar cultures were performed in the presence (shaded bars) or absence (solid bars) of an anti-TGF-β1 (20 μg/ml) mAb. T cell proliferation was assessed from the incorporation of [3H]-thymidine during the last 18 h of the assay (mean±SD of a triplicate). Similar results were obtained in three independent experiments.

T cell population induced by MPA-DC (Fig. 7B). We also found CD95+ cells (18.1%) among T lymphocytes stimulated with MPA-DC (Fig. 7A). Finally, we analyzed the expression of the transcription factor Foxp3 in long-term-cocultured CD4+ T cells by flow cytometry and quantitative RT-PCR. As shown in Figure 7C, we found a higher proportion of Foxp3-positive cells among CD4+ T cells stimulated with MPA-DC (17%) compared with mDC (4.5%). Moreover, quantitative PCR experiments showed that CD4+ T cells cocultured with MPA-DC expressed ~38 times higher Foxp3 mRNA levels than CD4+ T cells stimulated with mDC (Fig. 7D).

DISCUSSION

We have shown in a previous study that MPA treatment oriented DC toward a regulatory profile, characterized by low expression of costimulatory molecules and high levels of IL-10 synthesis but low levels of IL-12 secretion, resulting in the inability to induce allogeneic CD4+ T cell proliferation [10]. In this study, we further explored the immunoregulatory capacities of MPA-DC in the context of the alloimmune response.

We demonstrated here that CD4+ T cells stimulated by MPA-DC were hyporesponsive to further restimulation. This hyporesponsiveness was alloantigen-specific. This contrasted with their strong, proliferative response to mDC from a third party. Several studies have shown previously that treating DC with drugs such as dexamethasone [22], vitamin D3 analogs [23], antioxidant vitamins [24], or rapamycin [25], as well as cytokines such as IL-10 [20] or TGF-β [26] used alone or in combination, leads to T cell unresponsiveness in relevant cocultures. The alloantigen-specific anergy reported in the present study contrasts with the nonantigen-specific T cell hyporesponsiveness induced by vitamin D3-treated DC [23] but is consistent with the results obtained with DC treated with IL-10, vitamin C, or rapamycin [20, 24, 27, 28]. Once the unresponsiveness of CD4+ T cells had been established in a primary coculture with allogeneic MPA-DC, it could not be re-

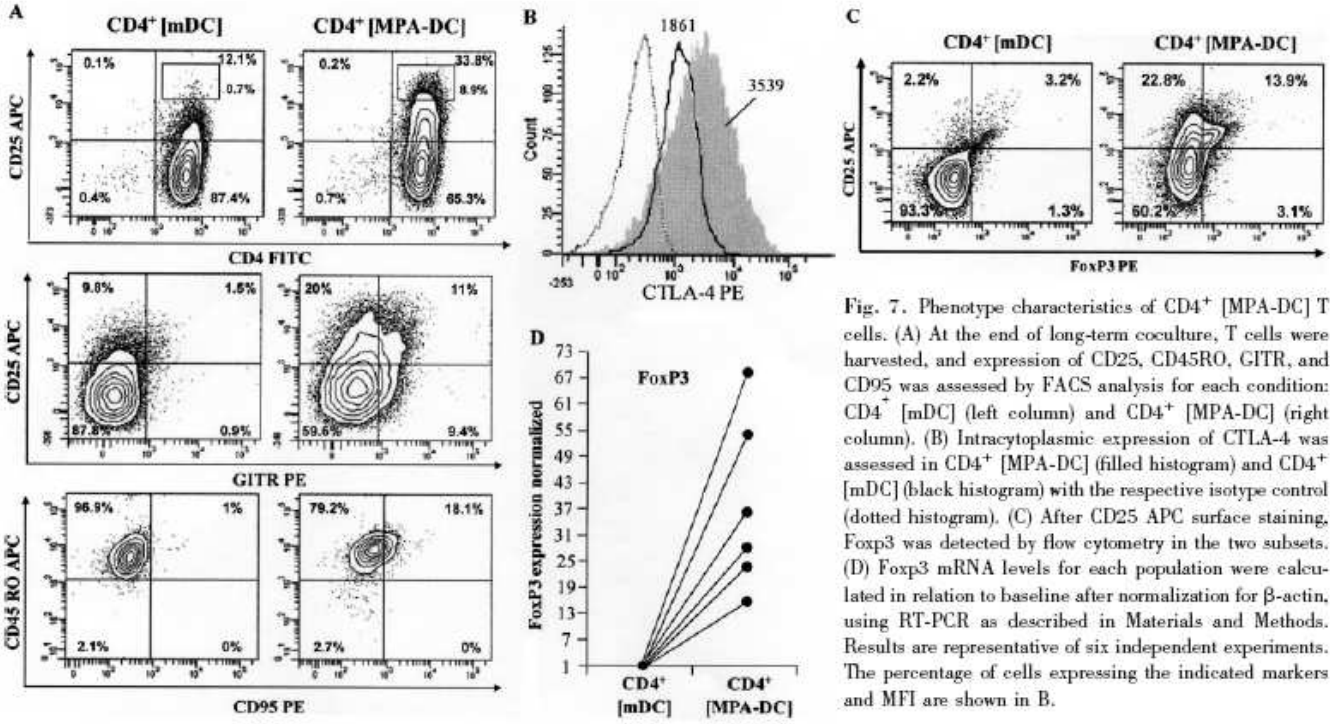


Fig. 7. Phenotype characteristics of CD4+ [MPA-DC] T cells. (A) At the end of long-term coculture, T cells were harvested, and expression of CD25, CD45RO, GITR, and CD95 was assessed by FACS analysis for each condition: CD4+ [mDC] (left column) and CD4+ [MPA-DC] (right column). (B) Intracytoplasmic expression of CTLA-4 was assessed in CD4+ [MPA-DC] (filled histogram) and CD4+ [mDC] (black histogram) with the respective isotype control (dotted histogram). (C) After CD25 APC surface staining, Foxp3 was detected by flow cytometry in the two subsets. (D) Foxp3 mRNA levels for each population were calculated in relation to baseline after normalization for β-actin, using RT-PCR as described in Materials and Methods. Results are representative of six independent experiments. The percentage of cells expressing the indicated markers and MFI are shown in B.

8. Lagaraine, C., Lebranchu, Y. (2003) Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. *Transplantation* **75**, 37S–42S.
9. Hackstein, H., Thomson, A. W. (2004) Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 24–34.
10. Lagaraine, C., Hoarau, C., Chabot, V., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y. (2005) Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. *Int. Immunol.* **17**, 351–363.
11. Quill, H., Schwartz, R. H. (1987) Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol.* **138**, 3704–3712.
12. Schwartz, R. H. (2003) T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334.
13. Soares, L., Seroogy, C., Skrenta, H., Anandasabapathy, N., Lovelace, P., Chung, C. D., Engleman, E., Fathman, C. G. (2004) Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. *Nat. Immunol.* **5**, 45–54.
14. Green, D. R., Droin, N., Pinkoski, M. (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* **193**, 70–81.
15. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, A. H. (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1213–1222.
16. Jonuleit, H., Schmitt, E. (2003) The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* **171**, 6323–6327.
17. Wood, K. J., Sakaguchi, S. (2003) Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 199–210.
18. Bach, J. F. (2003) Regulatory T cells under scrutiny. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 189–198.
19. Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., Bhardwaj, N. (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, 233–238.
20. Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., Enk, A. H. (2002) CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**, 2468–2476.
21. Hamdi, H., Godot, V., Maillot, M. C., Prejean, M. V., Cohen, N., Krzysiek, R., Lemoine, F. M., Zou, W., Emilie, D. (2007) Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* **110**, 211–219.
22. de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Kapsenberg, M. L. (1999) Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 201–204.
23. Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B. E., Dal Cin, E., Allavena, P., Di Carlo, V. (2000) Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **164**, 4443–4451.
24. Tan, P. H., Sagoo, P., Chan, C., Yates, J. B., Campbell, J., Beutelspacher, S. C., Foxwell, B. M., Lombardi, G., George, A. J. (2005) Inhibition of NF-κ B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J. Immunol.* **174**, 7633–7644.
25. Taner, T., Hackstein, H., Wang, Z., Morelli, A. E., Thomson, A. W. (2005) Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce Ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am. J. Transplant.* **5**, 228–236.
26. Lu, L., Lee, W. C., Takayama, T., Qian, S., Gambotto, A., Robbins, P. D., Thomson, A. W. (1999) Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-β, and CTLA4Ig). *J. Leukoc. Biol.* **66**, 293–296.
27. Lutz, M. B., Suri, R. M., Niimi, M., Ogilvie, A. L., Kukutsch, N. A., Rossner, S., Schuler, G., 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.
28. Sato, K., Yamashita, N., Matsuyama, T. (2002) Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell. Immunol.* **215**, 186–194.
29. Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., Alt, F. W. (1995) Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* **3**, 521–530.
30. Utting, O., Teh, S. J., Teh, H. S. (2000) A population of in vivo anergized T cells with a lower activation threshold for the induction of CD25 exhibit differential requirements in mobilization of intracellular calcium and mitogen-activated protein kinase activation. *J. Immunol.* **164**, 2881–2889.
31. Vanasek, T. L., Khoruts, A., Zell, T., Mueller, D. L. (2001) Antagonistic roles for CTLA-4 and the mammalian target of rapamycin in the regulation of clonal anergy: enhanced cell cycle progression promotes recall antigen responsiveness. *J. Immunol.* **167**, 5636–5644.
32. Read, S., Malmstrom, V., Powrie, F. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **192**, 295–302.
33. Taams, L. S., Smith, J., Rustin, M. H., Salmon, M., Poulter, L. W., Akbar, A. N. (2001) Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1122–1131.
34. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., Sakaguchi, S. (2002) Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* **3**, 135–142.
35. Wing, K., Ekmark, A., Karlsson, H., Rudin, A., Suri-Payer, E. (2002) Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* **106**, 190–199.
36. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336.
37. Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., de St Groth, B. F., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., Bluestone, J. A. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1701–1711.
38. Valmori, D., Tosello, V., Souleimanian, N. E., Godefroy, E., Scotto, L., Wang, Y., Ayyoub, M. (2006) Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells. *J. Immunol.* **177**, 944–949.
39. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151–1164.
40. Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., Lloyd, C. M. (2005) Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.* **202**, 1539–1547.
41. Tang, Q., Henriksen, K. J., Bi, M., Finger, E. B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E. L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., Bluestone, J. A. (2004) In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* **199**, 1455–1465.
42. Tarbell, K. V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., Steinman, R. M. (2004) CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* **199**, 1467–1477.
43. Koenen, H. J., Fasse, E., Joosten, I. (2005) CD27/CFSE-based ex vivo selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory T cells. *J. Immunol.* **174**, 7573–7583.
44. Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smiroldo, S., Davalli, A. M., Adorini, L. (2001) Regulatory T cells induced by 1 α,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J. Immunol.* **167**, 1945–1953.
45. Turnquist, H. R., Raimondi, G., Zahorchak, A. F., Fischer, R. T., Wang, Z., Thomson, A. W. (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**, 7018–7031.
46. Fujita, S., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Kubo, M., Yamashita, N. (2007) Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4+CD25+Foxp3+regulatory T cells. *Blood* **110**, 3793–3803.
47. Jiang, S., Camara, N., Lombardi, G., Lechler, R. I. (2003) Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. *Blood* **102**, 2180–2186.
48. Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P., Thomas, R. (2003) Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* **18**, 155–167.
49. Gao, W., Lu, Y., El Essawy, B., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. (2007) Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am. J. Transplant.* **7**, 1722–1732.

3. Les lymphocytes T CD4$^+$ régulateurs induits reprogramment des DC matures en DC semi-matures avec des propriétés tolérogènes

Situation :

Les lymphocytes T CD4$^+$ CD25$^+$ régulateurs humains sont primordiaux pour le maintien de la tolérance au soi (Sakaguchi et al., 2001). Les Trég sont définis par leur activité suppressive qu'ils exercent principalement sur les cellules T effectrices. Les études concernant leurs effets sur des cellules dendritiques sont beaucoup moins nombreuses. Quelques études ont rapporté les effets suppresseurs *in vitro* des Trég naturels sur les DC murines et humaines. Ce phénomène inclut l'inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II, la diminution de la fonction de présentation antigénique dans une MLR et la modification de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-6 et TNF-α (Bayry et al., 2007; Cederbom et al., 2000; Liang et al., 2008; Mahnke et al., 2007; Misra et al., 2004; Oderup et al., 2006; Onishi et al., 2008; Veldhoen et al., 2006). Ce processus implique principalement des facteurs solubles (*IL-10 et TGF-β*) et des molécules de surface exprimées par les Trég telles que LFA-1, CTLA-4 ou encore LAG-3 (Bayry et al., 2007; Oderup et al., 2006; Onishi et al., 2008). Ces résultats mettent en évidence une interaction mutuelle entre les Trég et les DC permettant ainsi le maintien de l'immunosuppression.

Objectifs et résumé des résultats :

Dans l'article précédent, nous avons montré que les cellules dendritiques humaines traitées au MPA (*DC-MPA*) induisent des lymphocytes T CD4$^+$ régulateurs antigène-spécifiques (*iTreg*) capables de supprimer la prolifération de cellules T CD4$^+$ CD25$^-$ naïves *in vitro.* Cette activité suppressive ne dépend pas de facteurs solubles mais est contact-dépendant puisqu'elle requiert des interactions cellulaires entre les iTreg et les DC avec les cellules T répondeuses.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux modifications des propriétés des DC induites par des lymphocytes T. Nous avons ainsi comparé les effets des iTreg à ceux des lymphocytes T non régulateurs appelés Teff sur des DC immatures mais aussi sur des DC matures (*DC-LPS*). L'analyse a portée sur une dizaine de marqueurs phénotypiques tels que

les molécules de co-stimulation (*CD80, CD86*), les marqueurs de maturation (*CD83, CD25*), les récepteurs de chimiokines (*CCR7, CXCR4, CCR5*) et les récepteurs inhibiteurs (*ILT3 et ILT4*). Nous avons également mesuré la synthèse de différentes cytokines (*IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α et IFN-γ*). La capacité allostimulatrice des DC après culture avec différentes populations T a aussi été étudiée.

Nos résultats suggèrent que l'expression des marqueurs de surface ainsi que les productions de cytokines sont modifiées différemment selon la culture des DC avec les populations T. Ainsi, les DC matures cultivées en présence de lymphocytes T régulateurs induits par des DC traitées au MPA acquièrent un phénotype mixte caractérisé par une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation et des marqueurs de maturation CD25 et CD83 mais une augmentation des molécules CCR5 (*récepteur dirigeant la migration vers les tissus périphériques*), ILT3 et ILT4. Nous démontrons aussi que les iTreg confèrent des propriétés tolérogènes aux cellules dendritiques humaines matures caractérisées par une production importante d'IL-10 et une diminution de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. A l'inverse, les DC matures incubées avec des lymphocytes T effecteurs gardent un phénotype mature, une faible expression des récepteurs inhibiteurs et une synthèse largement augmentée des cytokines TNF-α, IL-6, IL-12 et IFN-γ. De plus, après purification des DC stimulées par les iTreg, leur capacité allostimulatrice est significativement plus faible que celle des DC cultivées avec des Teff.

Concernant les DC immatures, nous avons observé que les iTreg ne modifient pas l'expression du CD80, CD25, CD83 et du CD86 à leur surface à l'opposé des T effecteurs qui entraînent une maturation phénotypique des DCimm. Pour les récepteurs de chimiokines, CCR5 est augmenté sur les DC immatures après incubation avec des iTreg alors que l'incubation avec des Teff entraîne l'augmentation de CCR7 (*récepteur dirigeant la migration vers les organes lymphoïdes secondaires*). Par ailleurs, les iTreg induisent une augmentation de la sécrétion d'IL-10 alors que l'incubation avec des T effecteurs entraîne une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6, de TNF-α et d'IFN-γ. Notons également que les Teff induisent la synthèse d'IL-12 contrairement aux iTreg. Enfin, la capacité allostimulatrice des DCimm préalablement modifiées par les iTreg est similaire à celle des DC immatures cultivées seules. En revanche, les DCim préalablement incubées avec des Teff sont capables d'induire la prolifération de lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques, suggérant ainsi une capacité allostimulatrice proche de celle des DC matures. L'ensemble de ces données suggère que les

iTreg transforment les DC immatures en DC « pro-tolérogènes » alors que les Teff induisent des DC activées.

Nous montrons ensuite que la modulation de la fonction des DC par des iTreg passe par de nombreux mécanismes impliquant à la fois des interactions cellulaires via les molécules CTLA-4 et LFA-1 mais aussi des facteurs solubles tels que l'IL-10 et le TGF-β. Pour conclure, on peut dire que les cellules T $CD4^+$ influencent fortement les propriétés immunologiques des DC et par conséquent aussi l'immunité innée au niveau du microenvironnement local.

Article soumis dans « Journal of Immunology »

REGULATORY CD4$^+$ T CELLS INDUCED BY MYCOPHENOLIC ACID-TREATED DENDRITIC CELLS REPROGRAM MATURE INTO SEMI-MATURE DC WITH TOLEROGENIC PROPERTIES

Roxane LEMOINE[1], Florence Velge-Roussel[1], Hubert NIVET[1,2], Yvon LEBRANCHU[1,2], Christophe BARON[1,2],

Author affiliation :

1. UPRES EA 4245 « Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes », UFR de Médecine, Université François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France

2. Service de Néphrologie et d'Immunologie Clinique, CHRU de Tours, 2 bis Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, FRANCE

Address correspondence to Roxane LEMOINE, Université François Rabelais, EA 4245 « Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes », UFR de Médecine, 10 Bd Tonnellé, 37000 Tours, France.

Telephone: +33 2 47 36 61 22 ; Fax : +33 2 47 36 61 47 ; e-mail : roxlem@orange.fr

ABBREVIATIONS : DC = dendritic cells ; iTreg = induced-CD4$^+$ regulatory T cells ; LPS = lipopolysaccharide ; MPA = Mycophenolic Acid ; Teff = effector CD4$^+$ T cells

INTRODUCTION

Human $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells (Treg) are critical for maintaining peripheral self-tolerance {Sakaguchi, 2001 #14}. As regulatory T cells are defined by their suppressive activity exerted on effector T cells, little is known about their impact on other immune cells as dendritic cells. However, several reports have shown the *in vitro* suppressive effects of Treg on murine and human DC. This phenomenon included the down regulation of co-stimulatory molecules and MHC II, the reduced antigen presentation function in MLR and the modification of cytokine's production such as the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-12, IL-6 and TNF-α. {Oderup, 2006 #1;Bayry, 2007 #2;Onishi, 2008 #11;Mahnke, 2007 #5;Liang, 2008 #6;Veldhoen, 2006 #8;Misra, 2004 #9;Cederbom, 2000 #10}. This process could involve immunosuppressive cytokines (e.g IL-10 and TGF-β) and cell surface molecules expressed on Treg such as LFA-1, CTLA-4 or LAG-3 {Oderup, 2006 #1;Bayry, 2007 #2;Onishi, 2008 #11}. Importantly, it was also shown that Treg could condition DC to express indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a potent regulatory molecule which is known to induce the production of pro-apoptotic metabolites from the catabolism of tryptophan, resulting in the suppression of effector T cells through a mechanism dependent on interactions between CTLA-4 and CD80/CD86 {Mellor, 2004 #22;Fallarino, 2003 #21}. These findings established a mutual interaction between DC and Treg for the upkeep of immunosuppression. Moreover, we have recently showed that DC treated by mycophenolic acid (MPA) induced antigen-specific $CD4^+$ regulatory T cells (iTreg) which are capable of suppressing the proliferation of naïve $CD4^+$ $CD25^-$ T cells *in vitro*. This suppressive activity is not depending on soluble factors but is contact-dependent and thus requires cellular interactions between iTreg and DC with responder T cells {Lagaraine, 2008 #12}.

In this study, we investigated the consequences of interactions between monocyte-derived DC and either effector $CD4^+$ T cells or induced regulatory $CD4^+$ T cells. The analysis was focused on different markers of phenotype and several cytokines, as examples for pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Our data suggested that basal expression of cell-surface markers and some cytokine productions, which are initiated following DC stimulation with LPS, are modified in distinctly different ways by interaction with the two T cell populations. Moreover, iTreg cause DC to exhibit a mixed phenotype that includes down-regulation of costimulatory molecules and maturation markers such as CD25 and CD83 but up-regulation of CCR5, ILT3 and ILT4. We also demonstrated that $CD4^+$ T cells activated by MPA-treated DC conferred tolerogenic properties to human DC characterized by high level of IL-10

secretion and low levels of pro-inflammatory cytokine synthesis. The modulation of DC function by iTreg is dependent of multiple mechanisms through cellular interactions including CTLA-4 and LFA-1 molecules but also through soluble factors such as IL-10 and TGF-β. Thus, the mutual interactions between DC and $CD4^+$ T cells are likely to influence the immune responses in the local microenvironment.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of $CD4^+$ T lymphocytes

Blood from healthy donors was obtained by cytapheresis (informed consent was obtained from volunteers). Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were then isolated by centrifuging over Ficoll hypaque (Lymphoprep; Abcys, France). PBMC were first depleted of adherent cells by two 45-min adhesion cycles on plastic. $CD4^+$ T lymphocytes were then isolated using anti-CD4 coated Dynabeads®, followed by Detachabeads® (Dynal, Compiegne, France) according to the manufacturer's instructions. The purity of $CD4^+$ T population was >95% (data not shown).

Generation of dendritic cells

Human PBMC from healthy blood donors were isolated with Ficoll Hypaque, as described above. Monocyte-derived DC were differentiated with IL-4 and GM-CSF as previously described {Lagaraine, 2005 #13}. On day 5, immature DC were harvested, washed and resuspended in culture medium with IL-4 and GM-CSF. TNF-α (R&D Systems) was added at 20 ng/mL for 2 days, with or without 100µM MPA (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), to obtain MPA-DC or mature DC (mDC) respectively. On day 7, DC were harvested, extensively washed and used for subsequent experiments.

Generation of two different T cell subsets in long-term culture

$CD4^+$ T cells were cocultured with allogeneic mDC or MPA-DC during the first incubation at a density of $2x10^6$ T cells with $0.6x10^6$ DC without any exogenous cytokines. At day 7, T cells were restimulated with $0.6x10^6$ mDC or MPA-DC generated from the same donor as for the first coculture (stored at -80°C in RPMI-10% FCS + 10% DMSO until use), as described by Jonuleit {Jonuleit, 2000 #15}, in culture medium containing 2 IU/ml IL-2 and 25 ng/ml IL-4. Two more cycles of mDC or MPA-DC restimulations were performed after intervals of

7 days. As previously described {Lagaraine, 2008 #12}, MPA-DC induced human antigen-specific $CD4^+$ regulatory T cells (iTreg) contrary to mDC which induced activated $CD4^+$ T cells designed by the term "Teff".

DC-T cell coculture

Immature or LPS (50ng/ml) mature DC were cultured alone or cocultured with T cell subsets at a DC:T ratio of 1:3 for 48h in P96 plates. After 2 days of coculture, T cells were depleted from DC-T cell cocultures using CD3 beads (Dynal, Compiegne, France). When specified, monoclonal anti-IL-10 antibody (clone 23738) (20µg/ml) and monoclonal anti-IL-10R antibody (clone 90220) (5µg/ml) or monoclonal anti-TGF-β1 antibody (clone 9016) (20µg/ml) obtained from R&D Systems or monoclonal anti-CTLA-4 (clone 8H5) (10µg/ml) or monoclonal anti-LFA-1 (clone IB4) (10µg/ml) from Ancell were added to the wells. Transwell membranes (0.2µm, NUNC, Roskilde, Denmark) were used in some experiments in which iTreg or Teff were above the transwell membrane while immature or mature DC were in the bottom well.

Analysis of cytokine production

DC were cocultured for 2 days with iTreg or Teff as described above. At the end of short-term coculture, supernatants were harvested and stored at -20°C until analysis. Cytokine levels of IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-γ and TNF-α were determined using appropriate human enzyme-linked immunosorbent assay ELISA kits (eBiosciences, Montrouge, France) according to the manufacturer's protocols.

Analysis of cell surface molecule expression by flow cytometry

DC-T cell cocultures were harvested and $1x10^5$ cells/sample were resuspended in phosphate-buffer saline (PBS). Cells were then incubated with saturating concentrations of the different fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies for 30 min at 4°C. The stained cells were washed twice in PBS, and then fixed in 0.5% paraformaldehyde PBS solution until analyzed by flow cytometry. Cell surface expression was analyzed using a 488-nm laser flow cytometer (FACSCanto®, Becton Dickinson, Mountain View, USA) using Diva® software (Becton Dickinson). The following mouse anti-human mAbs were used: PE-anti-CD209 (DC SIGN) (IgG, clone), PeCy5-anti-ILT3 (IgG1, clone ZM3.8), PE-anti-ILT4 (IgG2a, clone 42D1) and PE-anti-CD80 (IgG1, clone MAB104) from Beckman Coulter, PE-anti-CCR7 from R&D Systems, APC-anti-CD25 (IgG1, M-A251), FITC-anti-CD83 (IgG1, clone HB15e), PeCy5-

anti CD86 (IgG1κ, clone 2331), PE-anti-HLA-DR (IgG2b, clone B8.12.2), PE-anti-CCR5 (IgG2a, clone 150503) and PE-anti-CXCR4 (IgG2a, clone 12G5) from Becton Dickinson.
For intracellular cytokine staining, cells were incubated with Golgi Stop solution (Becton Dickinson) for the last 5 hours of culture. DC-T cocultures from the different conditions were then harvested, surface stained with PE-anti CD209 (DC-SIGN) and permeabilized with fix and perm solutions from Caltag Laboratories. IFN-γ APC (IgG1, clone B27), IL-10 APC (IgG2a, clone JES3-19F1) and IL-4 PE (IgG1κ, clone 8D4-8) -conjugated mAbs were purchased from BD Pharmingen with isotype control. Data were analyzed for geometric mean fluorescence intensity (MFI of the antibody of interest/MFI of the control isotype) and for the percentage of marker-positive cells (at least 20000 cells/sample were analyzed).

Proliferation assay

Purified DC were placed in 96-well flat-bottomed culture plates (Falcon, Becton Dickinson) at $3x10^4$ cells in 100 µL per well and responder $CD4^+$ T cells (10^5 cells/100 µL) were added to each well. Cell proliferation was assessed from the incorporation of 1 µCi [^{3}H]-thymidine (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England) during the last 18 hours of 5 days' culture and measured by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2550 TR/LL, Packard).

Statistical analysis

Statistical significance of parametric data was calculated using standard methods. Results are reported as the mean ± SD, and were compared using Student's t test. The statistical significance of nonparametric results was evaluated by the Mann-Whitney U test. For all tests, a *p*- value of <0.05 was regarded as statistically significant.

RESULTS

iTreg and Teff : two populations with distinct characteristics

Before investigating the effect of different T cell populations on DC *in vitro,* we first cocultured $CD4^+$ T cells with MPA-treated DC or mature-DC in a model of long-term culture in order to generate two populations named respectively iTreg for $CD4^+$ T cells induced by MPA-DC and Teff for $CD4^+$ T cells cultured with allogeneic mature-DC.
We have previously shown that DC pretreated with MPA during the maturation process had a weak T cell priming ability and induced activation of $CD4^+$ T cells with regulatory capacity {Lagaraine, 2008 #249} after several rounds of stimulation (as described in materials and

methods). These $CD4^+$ T cells were characterized by high level expression of GITR, CD95, CTLA-4 and Foxp3 markers (iTreg) (Figure 1A). On the contrary, $CD4^+$ T cells activated with fully mature DC according to the same protocol were devoid of regulatory function and did not express Foxp3 (named in this article Teff).

We further characterize these two populations of $CD4^+$ T cells generated in long-term-culture, by measuring cytokine secretions by ELISA. As shown in Figure 1B, iTreg secreted large amounts of IL-5, IL-10 and TGF-β whereas Teff synthesized high levels of IFN-γ and IL-2 (Figure 1C). We also confirmed their suppressive activity on naïve allogeneic $CD4^+$ T cells in MLR. As shown in Figure 1C, induced-$CD4^+$ regulatory T cells (iTreg) failed to proliferate after restimulation with mature DC (second bar) and strongly suppressed the proliferation of naive $CD4^+$ responder T cells (Fig. 1C, light gray bar). In contrast, $CD4^+$ T cells repeatedly stimulated with allogeneic mature-DC (Teff) did not inhibit the proliferative response of $CD4^+$ T cells (Fig. 1C, grid bar), although they had become hyporesponsive at the end of four cycles of stimulation (Fig. 1C, first bar).

Thus, we confirmed that MPA-treated DC drove $CD4^+$ T cells to acquire regulatory activity, whereas repeated stimulation with fully mature-DC did not. These results demonstrated that iTreg and Teff are two phenotypically and functionally defined subsets.

iTreg do not induce expression of maturation markers on immature DC contrary to Teff

We then decided to characterize the effects of these two different T cell populations on phenotypic, cytokine secretions and functional profiles of immature DC. In this way, immature monocyte-derived DC (iDC) were cocultured with iTreg or Teff for 48 hours at a ratio DC:T of 1:3. Firstly, the expression of various cell surface markers was observed (Figure 2). In comparison, DC were cultured in the absence of T cells in culture medium containing GM-CSF and IL-4 (hereafter called iDC alone). Following culture with Teff, iDC exhibited phenotypic changes including increased expression of maturation marker CD83, costimulatory molecules CD80 and CD86 but also the alpha chain IL-2 receptor named CD25 in comparison with iDC cultured alone (Figure 2, panel A). No significant difference was observed for the percentage of positive cells expressing HLA-DR between DC cultured alone and DC cultured with either iTreg or Teff (data not shown). Interestingly, a distinct phenotype was observed when DC have been cultured with iTreg. The level expression (% and MFI) of CD83, CD25, CD80 and CD86 molecules was poorly modified on the surface of iDC in the presence of iTreg compared to iDC alone (Figure 2A). However, the expression of chemokine

receptors on DC was differently modulated by iTreg versus Teff (Figure 2, panel B). Thus, Teff induced a greater up-regulation of CCR7 which is a chemokine receptor involved in the migration of DC toward the secondary lymphoid organs {Banchereau, 2000 #16}, than did the iTreg population (Figure 2B). Unlike Teff, iTreg induced up-regulation of CCR5 which is typically associated with immature DC {Banchereau, 2000 #16} (Figure 2B). The expression of CXCR4 which is associated with DC maturation is down-regulated on DC after culture with iTreg and increased with Teff.

Interestingly, we found that iTreg specifically induced expression of the inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on iDC whereas Teff had the opposite effect (Figure 2C). This HLA-G receptor has been previously reported to be expressed by a subpopulation of DC with tolerogenic properties {Chang, 2002 #17;Manavalan, 2003 #18}. These findings taken together indicated that Teff led to the maturation of iDC whereas iTreg did not. Finally, we also demonstrated that LPS did not upregulate maturation marker expressions on DC pre-conditioned with iTreg (data not shown). This suggested that iTreg induced a resistance to maturation signals in DC.

Immature DC pre-conditioned with iTreg have a weak allostimulatory capacity and produce large amounts of IL-10

Having demonstrated that iTreg and Teff differently affect the phenotype of immature DC, we then investigated how iTreg and Teff could alter the cytokine synthesis pattern of immature DC. To this end, immature DC were cultured with iTreg or Teff for 2 days at a ratio of 1:3 and productions of IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-12, IFN-γ and IL-10 were measured by ELISA.

The pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α), IL-12 and IFN-γ were decreased in cocultures in the presence of iTreg whereas IL-10 was significantly increased (Figure 3A).

To precisely characterize the DC cytokine profile in these cocultures, we combined cell surface (DC-SIGN) and intracellular cytokine stainings (IFN-γ, IL-10, or IL-4) by FACS analysis (Figure 3B). We found that addition of Teff resulted in a strong increase of IFN-γ secretion in DC whereas iTreg induced a strong IL-10 production in DC. Thus, these results confirmed that iTreg and Teff differently affected the production of cytokine by DC.

Interestingly, we found that IL-4 (usually produced by $CD4^+$ T cells type Th2) could also be produced by a significant fraction of immature DC in presence of iTreg (31.7% for DC with iTreg versus 11.4% with Teff).

To provide a more complete assessment of the functionality of immature DC, we also examined their capacity to stimulate T cell proliferation. To this end, DC were efficiently purified from DC-T cocultures and added to allogeneic responder $CD4^+$ T cells in a 3 day-MLR (Figure 3C). Purified $CD4^+$ T lymphocytes (10^5) were mixed with either allogeneic 3.10^4 "DC alone", Teff- or iTreg-conditioned DC. T cell proliferation was assessed on day 3. Immature DC cultured in medium alone induced a very weak proliferation of $CD4^+$ T cells compared to immature DC precultured with Teff (8120 cpm versus 21850 cpm) whereas iTreg-conditioned DC induced a weaker T cell proliferation (10410 cpm). Of note, viability of $CD4^+$ T cells and DC measured by trypan blue exclusion did not differ significantly between MLR driven either by control or iTreg- or Teff-conditioned DC (data not shown).

Thus, DC-preconditioned by iTreg have elicited a weak alloresponse, synthesize low levels of pro-inflammatory and Th1-inducing cytokines but produce large amounts of IL-10. On the contrary, Teff induce full maturation of iDC with potent APC capacity and high inflammatory profile.

Induced-CD4$^+$ regulatory T cells convert fully mature DC into semimature DC

We next decided to investigate the effects of the two different T cell populations on the phenotype of mature DC. Thus, DC were treated with Lipopolysaccharide (LPS), an agonist of TLR4, for 48 hours and then cocultured with either Teff or iTreg. As shown in Figure 4, addition of Teff to the mature DC had minor impact on the expression of costimulatory molecules (CD80, CD86) and other markers such as CCR7, CCR5, CD83 and CD25 (Figure 4A, 4B). Conversely, iTreg induced a strong down-regulation of CD83, CD25, CD86 and CXCR4 and induced the expression of CCR5 and ILT4 on LPS-stimulated DC (Figure 4A, 4B and 4C). Similar results were observed when DC were matured with TNF-α (data not shown). These results showed that iTreg were able to decrease maturation markers expression on fully mature DC and induced the expression of CCR5 that is a characteristic of immature DC.

Induced-CD4$^+$ regulatory T cells down-regulate pro-inflammatory cytokine secretions and induced IL-10 production in fully mature DC

We also assessed how iTreg and Teff affect the production of cytokines by mature DC. Incubation of mature DC with Teff resulted in an upregulation of the expression of IL-6, TNF-α, IL-12 and IFN-γ as assessed by ELISA, whereas iTreg had opposite effects (Figure

5A). Moreover, a much stronger secretion of IL-10 was exhibited in culture of iTreg with LPS-matured DC. In addition, FACS analysis of intracellular IFN-γ expression in DC-SIGN positive cells confirmed that Teff upregulated IFN-γ synthesis in mature DC while iTreg strongly decreased its production (26.6% for mDC with iTreg versus 77.5% for mDC with Teff) (Figure 5B). Finally, intracellular staining showed that iTreg induced a substantial increase of DC expressing IL-4 and IL-10 (Figure 5B).

Induced-CD4$^+$ regulatory T cells decrease the T cell allostimulatory capacity of mature DC

Finally, we analyzed how iTreg and Teff modified T cell priming ability of LPS-matured DC. To determine how contact with different T cell populations affected the function of LPS-matured DC, DC were purified after 2 day-cocultures with either iTreg or Teff and were tested for their ability to stimulate T cell proliferation in 5 day-MLR (Figure 6). As shown in Figure 6A, LPS-matured DC previously cultured alone or with Teff induced comparable level of proliferation of allogeneic CD4$^+$ T cells (33480 cpm versus 27760 cpm, first and second bars). On the contrary, DC pre-exposed with iTreg induced a much lower response of CD4$^+$ T cells (12530 cpm, third bar of the figure 6).

We also quantified the levels of several cytokines such as IFN-γ, TNF-α and IL-10 present in those MLR (Figure 6B). IFN-γ and TNF-α were significantly lower in MLR with iTreg-conditioned DC compared to Teff-conditioned DC while IL-10 was higher (Figure 6B).

These data provided additional evidence for the ability of iTreg to down-regulate the function of LPS-treated DC contrary to Teff which further enhance their inflammatory potential.

Effects of induced-CD4$^+$ regulatory T cells are dependent on multiple mechanisms

Finally, we investigated the mechanisms by which iTreg might affect DC surface phenotype expression and cytokine synthesis. Regulatory T cells might modify DC functions through the production of soluble factors or by interactions with surface receptors. To this end, we decided to explore the role of IL-10 and TGF-β cytokines as well as two surface molecules such as LFA-1 and CTLA-4. CTLA-4 has been previously involved in the function of Treg cells {Tang, 2008 #19;Read, 2000 #20}. Furthermore, LFA-1 and CTLA-4 are implicated in Treg/DC interactions and are responsible for the down-modulation of CD80/CD86 expression on murine DC {Onishi, 2008 #11}.

To address this possibility, mature DC were cocultured for 2 days with iTreg in the presence of blocking-antibodies (either a combination of anti-IL10 and anti-IL10R, or anti-TGF-β, or

anti-LFA-1 or anti-CTLA-4). Then, we analyzed the expression of CD25 and CD86 and the production of IL-12 and intracytoplasmic IFN-γ. As shown in Figure 7A, only anti-IL-10 and anti-TGF-β were clearly able to reverse the inhibition of CD25 expression induced by iTreg on mature DC, while anti-LFA-1 could not and anti-CTLA-4 had only little effect. On the other hand, anti-LFA-1 or anti-CTLA-4 could reconstitute the expression of CD86 on DC in the presence of iTreg whereas anti-IL-10 and anti-TGF-β had no effect on the expression of this marker. These findings thus indicate that $CD4^+$-induced regulatory T cells can actively down-regulate DC expression of CD86 (but also CD80) in both a CTLA-4- and LFA-1-dependent manner.

Moreover, as shown in Figure 7B, anti- IL-10 antibodies resulted in an increase of IL-12 and IFN-γ synthesis in DC and reversed the effect of iTreg on DC. This result suggested that IL-10 played an important role in the regulation of cytokine synthesis in DC induced by iTreg. Strikingly, anti-TGF-β inhibited IL-12 synthesis. This suggested that a number of different mechanisms contributed to Treg-mediated inhibition of DC maturation.

DISCUSSION

We have previously reported that MPA-treated DC induced $CD4^+$ regulatory T cells which suppressed the proliferation of unprimed and presensitized $CD4^+$ T cells allogeneic $CD4^+$ responder T cells through a contact-dependent manner {Lagaraine, 2008 #12}. In this report, we studied the interactions of DC with induced-regulatory $CD4^+$ T cells in comparison with effector $CD4^+$ T cells. Interestingly, iTreg and Teff were found to exert contrasting effects on DC function. Previous studies have shown that human natural Treg can inhibit some aspects of DC maturation {Bayry, 2007 #558;Onishi, 2008 #391} but it is the first study using induced regulatory T cells in humans.

Thus, we demonstrated that iTreg stimulate DC to exhibit phenotypic changes in immature DC: this included increased expression of CCR5, ILT3 and ILT4 and low expression levels of co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) and maturation markers such as CD25 and CD83. These data suggested that the CCR5 up-regulation on DC after co-culture with iTreg might indicate that those DC could retain their ability to move to secondary lymphoid organs, *in vivo*, but this hypothesis will require further demonstration. On the contrary, immature DC conditioned with effector T cells acquire phenotypically mature characteristics such as strong increase in the expression of CD83, CD25 and also CCR7, markers typically associated with

DC maturation. This molecule has been implicated in the migration of monocyte-derived DC into lymph nodes {Ohl, 2004 #49;Jang, 2006 #50}. Therefore, Teff-conditioned DC can be described as being mature.

Modulation of immune responses is essential for optimal protection against invading microorganisms, prevention of self-reactivity, and damage control preventing immune pathology due to excessive effector responses. Given how crucial regulation of T cell responses is, it stands to reason that there are several mechanisms operative which involve, for instance, differential action of cytokines. DC play a critical role in the balance between tolerance and immunity, bridging the innate and adaptive branches of the immune system via presentation of Ag and provision of costimulatory molecules together with stimulatory or inhibitory cytokines {Banchereau, 1998 #431}. We also analyzed the effects of T cells on cytokine production by DC in the presence or not of strong inflammatory signals, because this would more accurately reflect the *in vivo* scenario in which they would have to function. The different cytokines we focused on, IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-12 and IL-10, are typical representatives of pro- and anti-inflammatory cytokines. In this study, we show that *in vitro* initiation of an immune response in the absence of maturation stimulus does not induce the production of pro-inflammatory cytokines as well as IL-12. Under these conditions, there is unlikely to be cell recruitment *in vivo*, and subsequently no need to manage any immune response {Pasare, 2004 #38}. After LPS stimulation, pro-inflammatory cytokines and especially IL-12 are produced by DC. The *in vitro* addition of effector T cells increased the production of these cytokines whereas the addition of iTreg to DC resulted in a strong block of IL-12 production in agreement with the role of these cells in down-regulation of inflammatory responses {Sakaguchi, 2001 #39;Taguchi, 1996 #40;Seddon, 1999 #41;Shevach, 2000 #42;Green, 2002 #43}. We also found that iTreg were still able to modulate mature DC responses by enhancing synthesis of the anti-inflammatory cytokine IL-10, whose immunosuppressive action in immune responses to numerous pathogens and immune pathologies is well documented {Maloy, 2001 #44;Moore, 2001 #45}. Mice carrying a deletion of the IL-10 gene are highly susceptible to inflammatory bowel disease {Kuhn, 1993 #46} and mount an excessive, host damaging response when infected with malaria parasites {Li, 1999 #47} or other organisms {Moore, 2001 #45}. Although IL-10 was originally described as a Th2 cytokine, it is now recognized that Th1, Treg, B cells, macrophages and DC also make IL-10 {McGuirk, 2002 #48;Moore, 2001 #45}.

In addition to modulating the properties of immature DC, we also found that iTreg could inhibit DC maturation initiated by exposure to LPS, a TLR4 ligand. This result appears to be in accordance with a previous study using human natural Treg {Bayry, 2007 #2}. This result is in contrast with what has been observed for mouse bone marrow-derived DC, where pretreatment with maturation-inducing stimuli such as anti-CD40; LPS or CpG DNA was shown to render DC insensitive to the negative regulatory effects of Treg {Serra, 2003 #32}. However, this could reflect a difference between mouse and human DC, since Treg have been shown to inhibit the maturation of human monocyte-derived DC that were pre-exposed to anti-CD40 {Misra, 2004 #9}. In speculating about the physiological significance of Treg inhibition of TLR ligand-induced DC maturation, two issues should be taken into consideration. First, the ratio of iTreg to Teff recognizing Ag on DC was a key factor in determining the overall effect on DC maturation. This ratio could be affected by the relative presentation of self-protein-derived vs pathogen-derived peptides. Notably, DC have been shown to preferentially present, in association with MHC class II, Ags phagocytosed in combination with TLR ligands rather than Ags taken up without a TLR {Blander, 2006 #31}. Hence, DC exposed to infectious agents would be expected to be biased in presentation of pathogen-associated rather than self-Ags and the ratio of Teff: iTreg recognizing Ags on these DC should be high. The iTreg-down-modulation of DC maturation could provide a fail-safe mechanism, should presentation of self-Ag predominate on a TLR-stimulated DC, helping to prevent induction of autoimmunity during the context of infection. Secondly, in addition to their role in maintaining self-tolerance, Treg have been shown to participate in the control of immune responses against infection, helping to avoid pathology that could be associated with excessive responses {Belkaid, 2002 #28;Toka, 2004 #30;Suvas, 2003 #29}. Down-modulatory effects on DC maturation could contribute to this aspect of Treg function as well.

The mechanisms underlying the effect of Treg on cytokine productions and phenotypically changes by DC are not all still known. However, a number of molecules were shown to play a role in the modulation of DC properties by Tregs. Direct evidence for the participation of IL-10, TGF-β, CTLA-4 and LFA-1 was provided by experiments using the relevant neutralizing Abs. Interestingly, each factor was involved in mediating a unique combination of responses by the DC. We addressed the functional significance and the mechanisms responsible for these changes. In this report, we presented data indicating that the down-modulation of costimulatory molecules of DC by iTreg is CTLA-4 dependent. Addition of blocking anti-CTLA-4 to *in vitro* cocultures of iTreg with DC strongly reversed this down-

modulation. One of the possibilities to explain this process is that CTLA-4 secreted or shed locally in the cell contact area, would block the expression of the costimulatory molecules. CTLA-4 has been implicated in Treg cell function both *in vivo* and *in vitro* {Oderup, 2006 #1; Takahashi, 2000 #25;Read, 2000 #26}. However, the roles of CTLA-4 for Treg function have been controversial {Thornton, 2004 #24; Kataoka, 2005 #23}. Some studies reported that CTLA-4$^{-/-}$ Treg cells were able to suppress *in vitro* T cell proliferation whereas blockade of CTLA-4 solely expressed by Tregs can abrogate the suppression {Kataoka, 2005 #33;Birebent, 2004 #34;Takahashi, 2000 #25}. It was also shown *in vivo* in a colitis model that anti-CTLA-4 mAb inhibited suppression via direct effects on Tregs, and not via hyperactivation of effector T cells {Read, 2006 #35}. Interestingly, however, accumulation of Tregs in the model was not inhibited by the presence of anti-CTLA-4 mAb; their absolute number even increased. This suggests that CTLA-4 blockade may inhibit *in vivo* suppression not by impairing accumulation of Tregs or their conjugation with APCs but by affecting their other functions, such as their ability to down-regulate CD80/86 expression on DCs. It remains to be determined whether the development of a fatal lymphoproliferative disease in CTLA-4$^{-/-}$ mice might be due to inefficiency of CTLA-4$^{-/-}$ Tregs to down-regulate CD80/86 expression on DCs *in vivo* {Tivol, 1995 #36;Waterhouse, 1995 #37}. Moreover, addition of neutralizing anti-IL-10 or TGF-β only slightly affects the down-modulation of CD80/CD86 expressions. The expressions of chemokine receptors *(CCR5, CXCR4)* and inhibitory molecules *(ILT3 and ILT4)* are only partially regulated by surface molecules CTLA-4 and LFA-1 and by soluble factors IL-10 and TGF-β. On the other hand, it is likely that *de novo* induction of soluble factors rather than cell surface interactions play an important role in this effect. For example, IL-10 led to decreased secretions of IL-12 and pro-inflammatory cytokines IL-6, IFN-γ and TNF-α induced by iTreg in DC whereas blocking TGF-β had the opposite effects. The data demonstrate that the iTreg differ from Teff in their effects on DC due to the expression of molecules that actively suppress DC maturation (i.e., TGF-β, IL-10, CTLA-4 and LFA-1). These findings further illustrate that DC maturation is not simply a coordinated, all-or-none response, but rather is a flexible process that is controlled at multiple levels. Hence, T cells expressing different combinations of cell surface molecules and cytokines have the potential to fine-tune the function of DC.

Finally, we also demonstrated that phenotypic changes and cytokine modifications induced by iTreg on DC are functionally significant because iTreg-conditioned DC induced poor T-cell proliferation responses which is in accordance with previous studies {Bayry, 2007

#2;Veldhoen, 2006 #8;Misra, 2004 #9}. The low allostimulatory capacity of iTreg-conditioned DC could not be causally linked to an immature state but rather to a tolerogenic state as we found that iTreg significantly enhanced IL-10 production and increased ILT3 expression by DC after maturation with LPS. Several studies demonstrated that ILT3, an inhibitory receptor, is associated with tolerogenic DC {Brenk, 2009 #27;Chang, 2002 #17;Manavalan, 2003 #18}. On the contrary, DC pre-cultured with effector T cells strongly induced the proliferation of responder $CD4^+$ T cells probably due to their high expression of costimulatory molecules and especially to their increased secretion of pro-Th1 cytokine IFN-γ and IL-12.

To conclude, these data suggest that iTreg induce the generation of semi-mature DC with tolerogenic properties whereas DC cocultured with Teff become potent APC, underlying the high plasticity of human DC.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Etablissement Français du Sang du Centre Atlantique of Tours for providing blood samples from healthy donors and Doreen Raine for revising the English text.

FIGURES

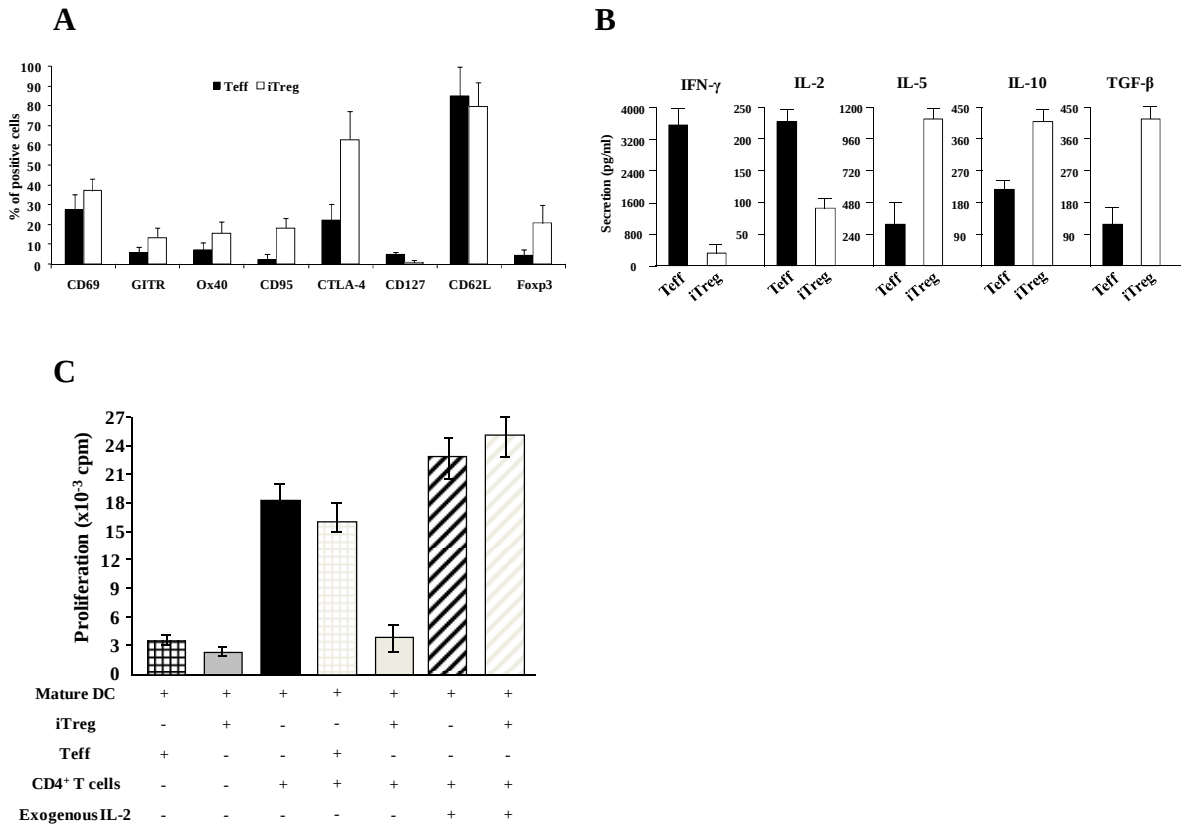


Figure 1: Phenotype, cytokine secretions and suppressive activity of effector and induced-regulatory T cell populations.

Purified $CD4^+$ T cells were long-term-cultured with allogeneic mature DC (Teff) or MPA-treated DC (iTreg), as describe in materials and methods.

(A) Expressions of CD25, CD69, GITR, Ox40, CD95, CD127, CD62L, intracellular CTLA-4 and Foxp3 were assessed by FACS analysis for Teff (black histograms) and iTreg (white histograms). The mean percentage of positive cells ± SD from six experiments is depicted.

(B) Productions of IFN-γ, IL-2, IL-5, IL-10 and TGF-β were assessed by ELISA. The bars represent mean ± SD of cytokine concentrations in the culture supernatants of six independent experiments.

(C) Autologous $CD4^+$ responder T cells were mixed for 5 days with allogeneic mature DC in the presence of either iTreg or Teff. T cell proliferation was assessed by [3H]-thymidine incorporation during the last 18h of the MLR (mean cpm ± SD of triplicate). One experiment out of six independent experiments is represented.

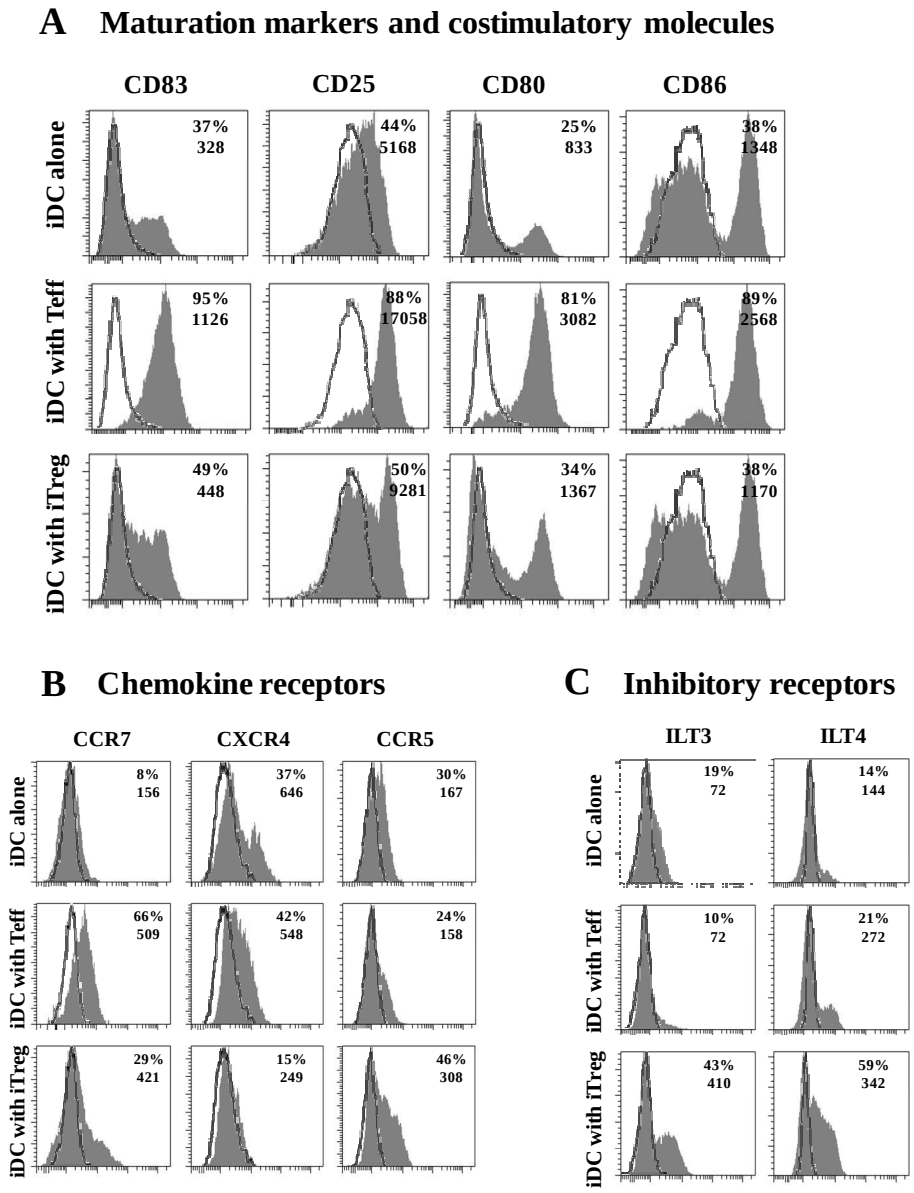


Figure 2: iTreg maintain DC in an immature state contrary to Teff which strongly induce DC maturation. Day 5 immature DC were either untreated (iDC alone) or cocultured for 48h with allogeneic effector $CD4^+$ T cells (iDC with Teff) or with induced-regulatory $CD4^+$ T cells (iDC with iTreg) at a ratio DC:T of 1:3. (A) At the end of coculture, cells were harvested and expression of CD83, CD25, CD80 and CD86 on gated-DC SIGN positive cells was assessed by FACS analysis for each condition. Expression of chemokine receptors CCR7, CXCR4, CCR5 (B) and immunoglobulin-like transcripts ILT3 and ILT4 (C) was also analyzed by flow cytometry. Filled histograms represent the expression of cell-surface markers indicated with the respective isotype control (open histograms). A typical experiment out of eight is shown and the percentage of marker-positive cells and mean fluorescence intensities (MFI) are indicated in the upper right corner of each histogram.

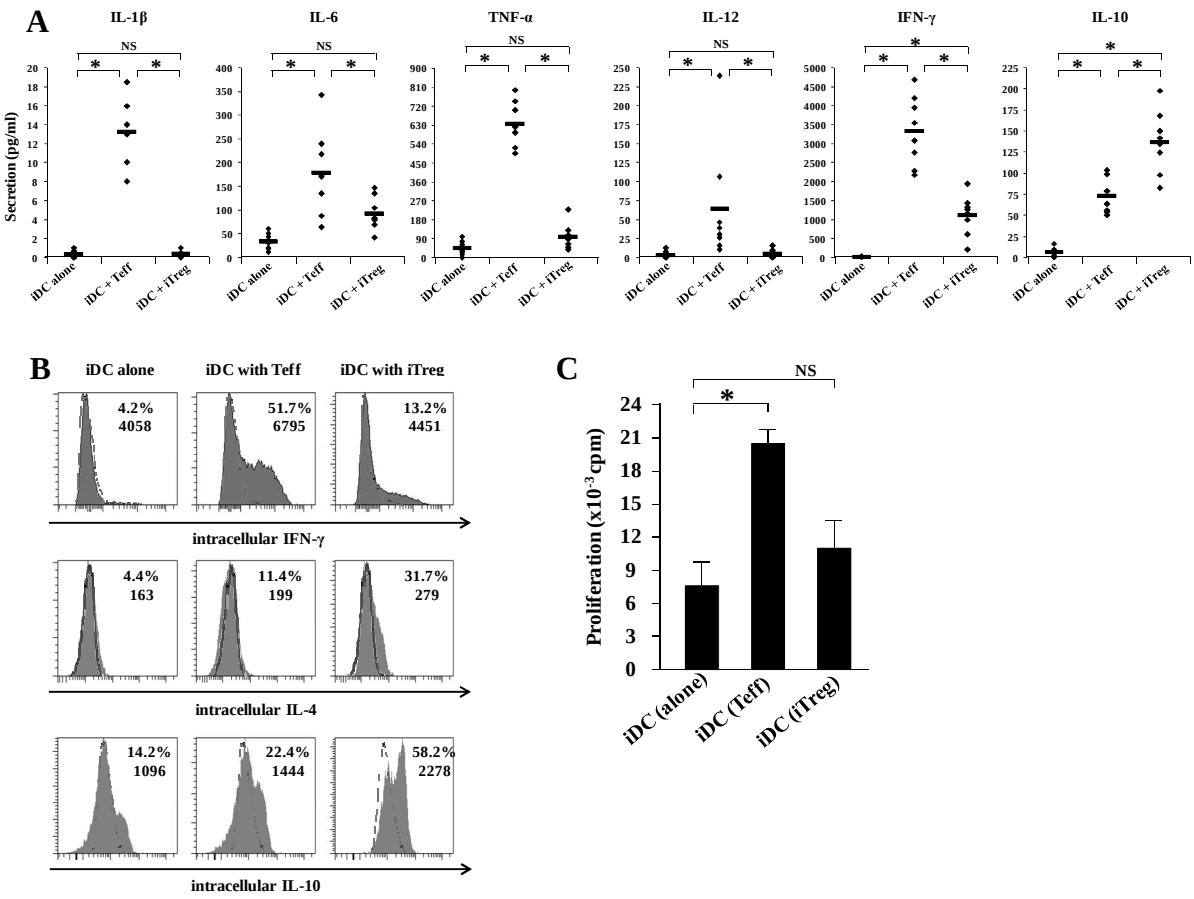


Figure 3: Immature DC pre-conditioned with iTreg have a weak allostimulatory capacity and produce large amounts of IL-10. Day 5 immature DC were either untreated (iDC alone) or cocultured for 48h with allogeneic effector $CD4^+$ T cells (iDC + Teff) or with induced-regulatory $CD4^+$ T cells (iDC + iTreg) at a ratio DC:T of 1:3. **(A)** Supernatants from the cocultures were harvested and levels of indicated cytokines were measured by ELISA. Results are expressed in picograms per milliliter. Each point represents one experiment and the black bar represents the mean of eight independent experiments. Mann-Whitney U test was used to calculate statistical differences between groups. * $p<0.05$. NS: Not significant. **(B)** For intracellular staining, cells were incubated with Golgi Stop solution for the last 5 hours of culture. After DC-SIGN surface staining, intracytoplasmic expression of IFN-γ and intracellular expressions of IL-4 and IL-10 cytokines **(C)** were assessed by flow cytometry for immature DC cultured alone or with either Teff or iTreg. The percentage of positive cells and MFI are indicated in the upper right corner of each histogram. A typical experiment out of six is shown. Filled histograms represent the expression of the cell-surface markers indicated with the respective isotype control (open histograms). **(D)** Immature DC (iDC) were cultured alone (left histogram) or cocultured with allogeneic Teff (middle histogram) or iTreg (right histogram) at a ratio DC:T of 1:3. After 48h, T cells were depleted from the cocultures by Dynal beads and DC were examined for their ability to stimulate the proliferation of $CD4^+$ T cells. Briefly, 3.10^4 purified DC were cultured with allogeneic 10^5 $CD4^+$ responder T cells at a ratio DC:T of 1:3 during 3 days. T cell proliferation was measured by incorporation of 1µCi [3H]-thymidine added for the last 18 hours of culture. Data are expressed as mean counts per minute (cpm) ± SD obtained from triplicate wells. Data are representative of one out of two donors. * $p<0.05$. NS : not significant.

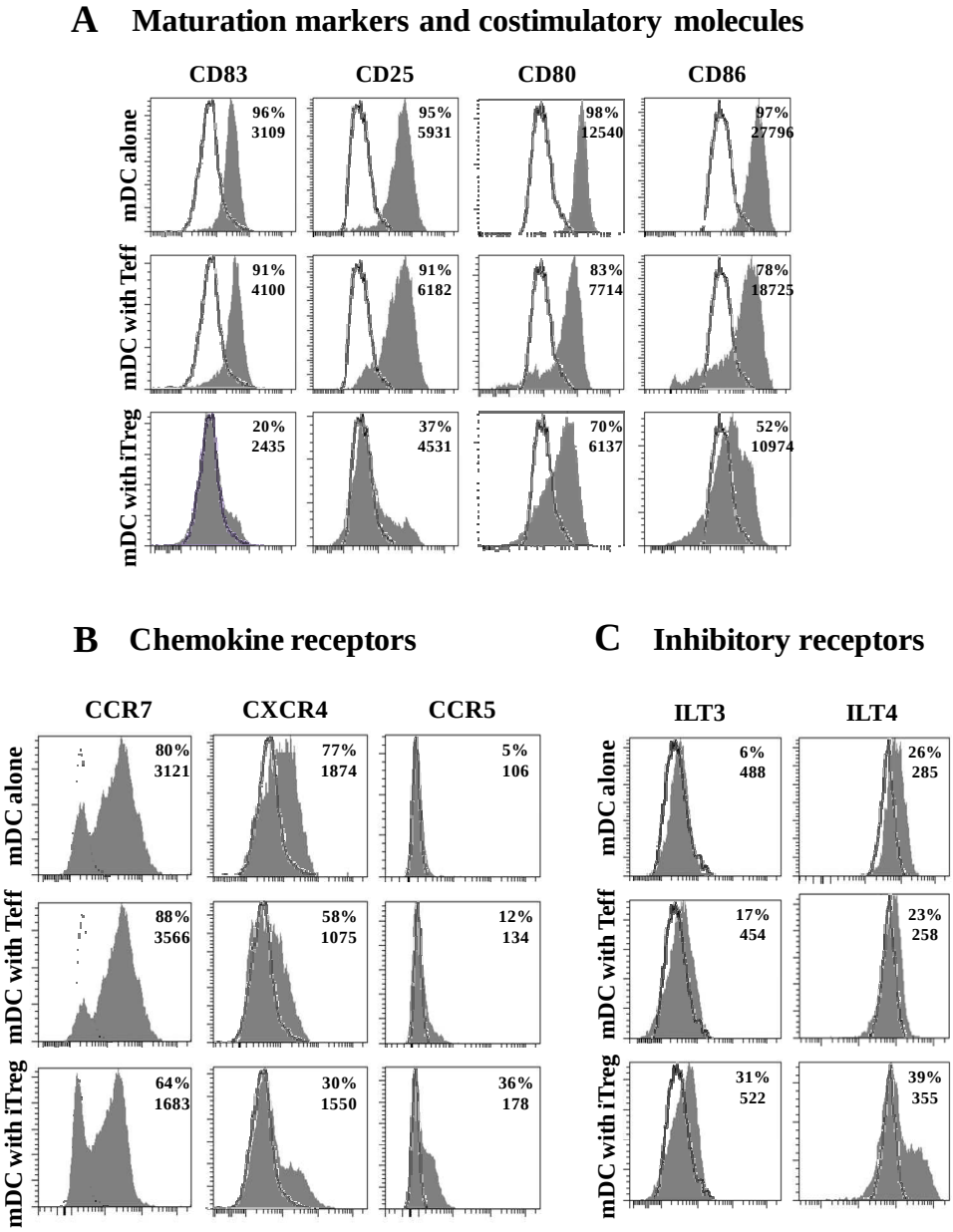


Figure 4: Induced-CD4$^+$ regulatory T cells convert fully mature DC into semimature DC.

LPS-matured DC were either untreated (DC alone) or cocultured for 48h with allogeneic effector CD4$^+$ T cells (DC with Teff) or with induced-regulatory CD4$^+$ T cells (DC with iTreg) at a ratio DC:T of 1:3. **(A)** At the end of coculture, cells were harvested and expressions of CD80, CD83, CD86, CD25 and HLA-DR were assessed by FACS analysis for each condition. **(B)** Expressions of chemokine receptors CCR7, CXCR4, CCR5 and immunoglobulin-like transcripts ILT3 and ILT4 were also analyzed by flow cytometry. Filled histograms represent the expression of cell-surface markers indicated with the respective isotype control (open histograms). A typical experiment out of eight is shown and the percentage of marker-positive cells and mean fluorescence intensities (MFI) are indicated in the upper right corner of each histogram.

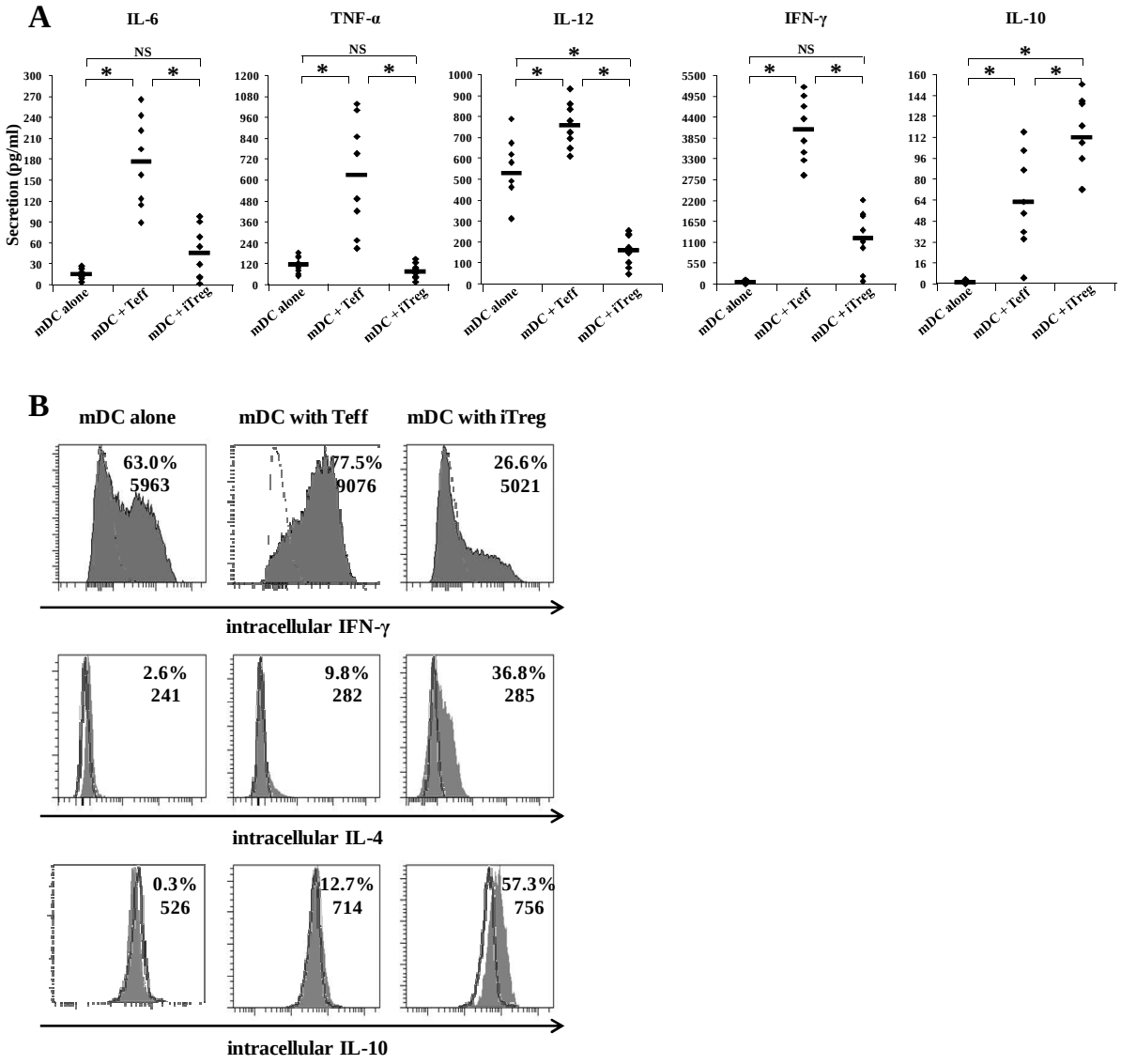


Figure 5: **Induced-CD4$^+$ regulatory T cells down-regulate pro-inflammatory cytokine secretions and induced IL-10 production in fully mature DC.**
LPS-matured DC were either untreated (mDC alone) or cocultured for 48h with allogeneic effector CD4$^+$ T cells (mDC + Teff) or with induced-regulatory CD4$^+$ T cells (mDC + iTreg) at a ratio DC:T of 1:3. **(A)** Supernatants from the cocultures were harvested and levels of indicated cytokines were measured by ELISA. Results are expressed in picograms per milliliter. Each point represents one experiment and black bars represent the mean of eight independent experiments. Mann-Whitney U test was used to calculate statistical differences between groups. * $p<0.05$. NS : Not significant. **(B)** For intracellular staining, cells were incubated with Golgi Stop solution for the last 5 hours of culture. After DC-SIGN surface staining, intracellular expressions of IFN-γ, IL-4 and IL-10 cytokines were assessed by flow cytometry for mature DC cultured alone or with either Teff or iTreg. The percentage of positive cells and MFI are indicated in the upper right corner of each histogram. A typical experiment out of six is shown. Filled histograms represent the expression of cell-surface markers indicated with the respective isotype control (open histograms).

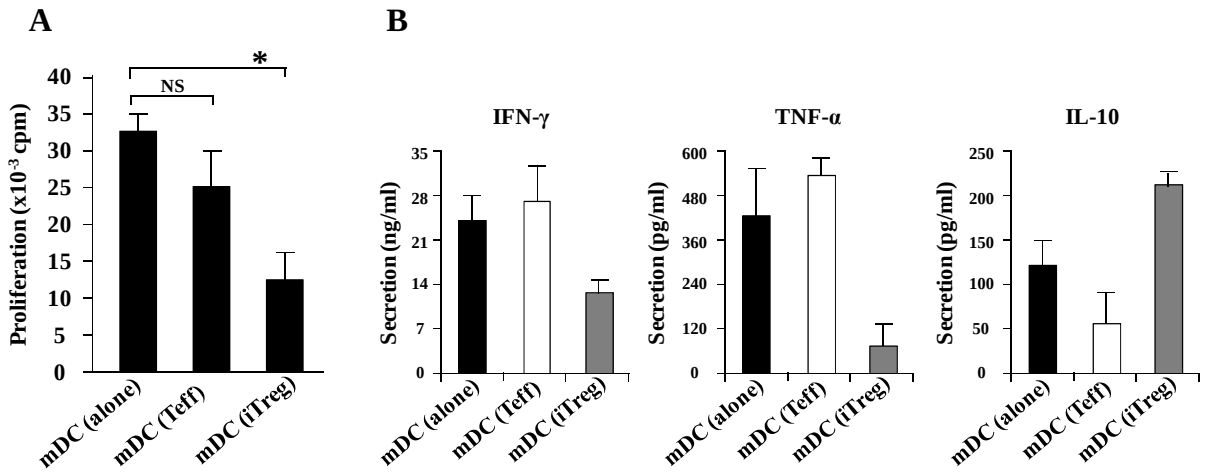


Figure 6: **Induced-CD4$^+$ regulatory T cells abrogate the T cell allostimulatory capacity of mature DC**

(A) LPS-matured DC (mDC) were cultured alone (left histogram) or cocultured with allogeneic Teff (middle histogram) or iTreg (right histogram) at a ratio DC:T of 1:3. After 48h, T cells were depleted from the cocultures by Dynal beads and DC were examined for their ability to stimulate the proliferation of CD4$^+$ T cells. Briefly, 3.10^4 purified DC were cultured with allogeneic 10^5 CD4$^+$ responder T cells at a ratio DC:T of 1:3 during 3 days. T cell proliferation was measured by incorporation of 1µCi [3H]-thymidine added for the last 18 hours of culture. Data are expressed as mean counts per minute (cpm) ± SD obtained from triplicate wells. Data are representative of one out of two donors. * $p<0.05$. NS : not significant. **(B)** The levels of IFN-γ, TNF-α and IL-10 were detected by ELISA in supernatants of MLR. Results are expressed in picograms or nanograms per milliliter as mean ± SD for two donors.

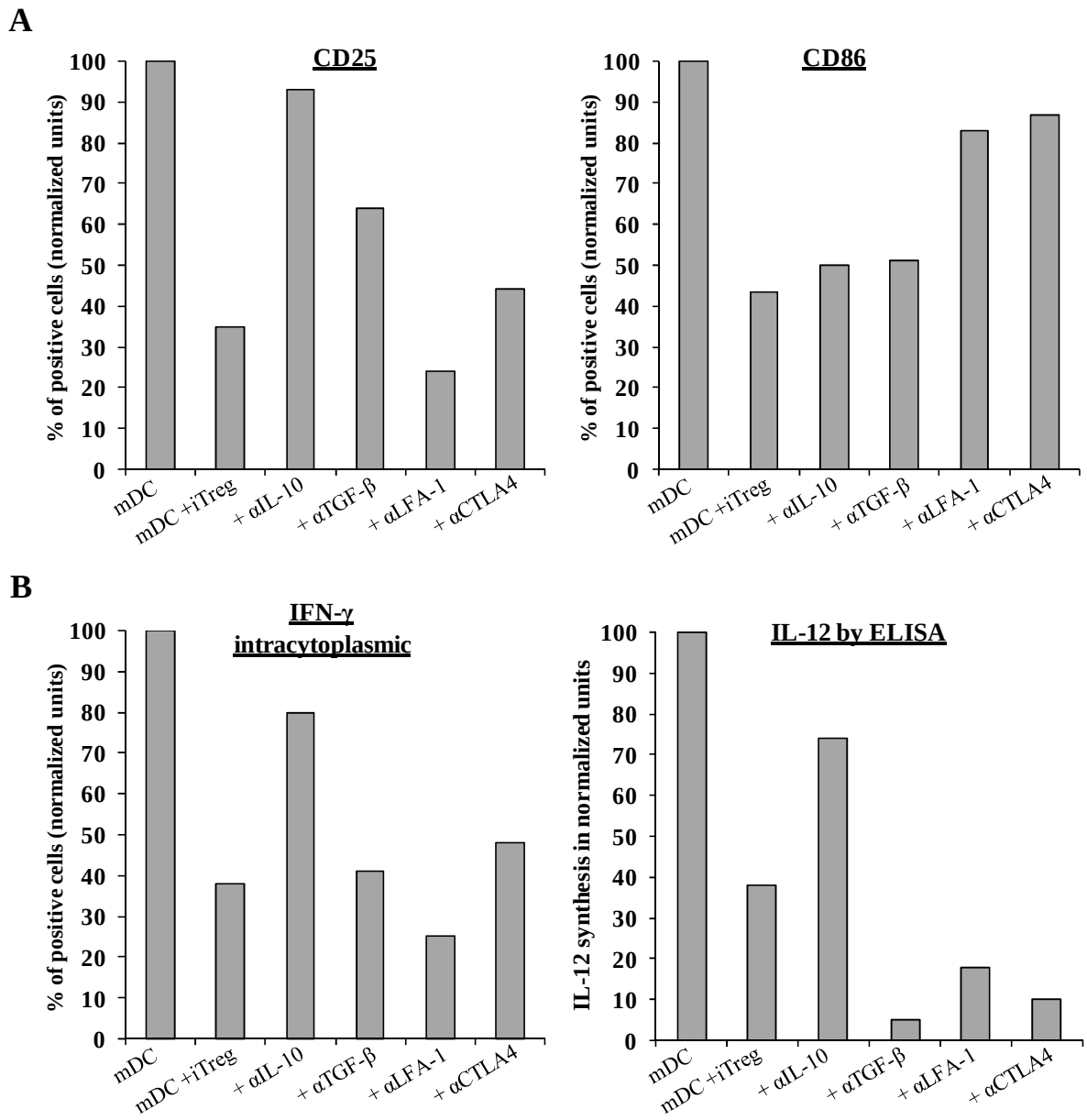


Figure 7: ***Down-modulation of CD25 and CD86 marker expressions is mainly CTLA-4 and LFA-1-dependent whereas production of IL-12 and IFN-γ is reversed by IL-10***

Day 7 mature DC were cultured alone (mDC) or with allogeneic iTreg at a DC:T ratio of 1:3 during 48h in the presence of isotype control mAb (mDC + iTreg), a mix of anti-IL-10 (20µg/ml) and anti-IL-10R (5µg/ml), anti TGF-β1 (20µg/ml), anti-CTLA-4 (10µg/ml) or anti-LFA-1 (10µg/ml) antibodies. **(A)** DC were purified from DC-T cell cocultures by T cell depletion and analyzed for the expression of CD25 and CD86 surface markers. **(B)** Supernatants from the cocultures were analyzed by ELISA for IL-12 and intracytoplasmic IFN-γ expression among DC-SIGN positive cells was assessed by FACS analysis. Results represent the percentage of positive cells or IL-12 synthesis in normalized units compared to mDC. One experiment out of three is represented.

4. Les lymphocytes T CD4+ régulateurs induits inhibent la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8+

Introduction

Les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle important dans le contrôle des réponses immunes puisqu'ils maintiennent la tolérance périphérique et préviennent les maladies auto-immunes (Sakaguchi et al., 1995; Shevach et al., 2001). Le maintien de la tolérance se fait par la suppression de la prolifération des cellules T effectrices (Anderson et al., 2007; Liyanage et al., 2002; Niedbala et al., 2007; Strauss et al., 2007b). Les Treg sont capables d'inhiber l'activité des cellules T à différents stades : prolifération, différenciation et fonction effectrice (Sojka et al., 2008). Les mécanismes utilisés par les Treg pour supprimer la fonction des cellules T à ces différents niveaux ne sont pas tous élucidés et restent un sujet de controverse.

De plus, la majorité des études décrivent la capacité des Treg à réguler les cellules T $CD4^+$. Cependant, il a été clairement démontré que les Treg murins pouvaient également réguler les réponses des lymphocytes T $CD8^+$ (Chai et al., 2002; Gao et al., 1999; Takahashi et al., 1998). Ainsi, Piccirillo et collaborateurs ont mis en évidence que des cellules T $CD8^+$ transgéniques pour leur TCR qui prolifèrent en réponse aux complexes CMH I / peptide tétramériques en absence d'APC sont inhibées en présence de Treg (Piccirillo and Shevach, 2001). De même, chez les souriceaux nouveau-nés, la déplétion en Treg avant une infection à l'Herpes Simplex Virus de type 2 conduit à une augmentation significative du nombre, de l'activation, de l'expression de granzyme B et de la réponse cytotoxique des cellules T $CD8^+$ spécifiques du virus (Fernandez et al., 2008). Les cellules T régulatrices peuvent également supprimer le rejet d'allogreffes cardiaques murines médié par les LT $CD8^+$ (van Maurik et al., 2002). A l'inverse, dans un modèle de transplantation tissulaire, les Trég inhibent le rejet de greffe sans inhiber la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs alloréactifs (Graca et al., 2002). De même, les Trég antigène-spécifiques et les lymphocytes T $CD8^+$ prolifèrent massivement dans les ganglions lymphatiques (Chen et al., 2005). Enfin, les cellules $CD4^+$ $CD25^+$ murines contrôlent les réponses des $CD8^+$ mémoires (Kursar et al., 2002; Murakami et al., 2002; Suvas et al., 2003). D'autres équipes ont également étudié la régulation de l'activation des cellules T $CD8^+$ par les Treg chez l'homme. Ainsi, les Treg naturels humains sont capables d'inhiber la prolifération des cellules T $CD8^+$ en réponse à une stimulation

polyclonale ou allogénique (Dieckmann et al., 2001) mais aussi d'inhiber leur fonction cytotoxique (Mempel et al., 2006; Trzonkowski et al., 2006). Cette régulation inclut également l'inhibition de la produciton d'IFN-γ, de perforine et de granzyme B au niveau transcriptionnel (Camara et al., 2003). Enfin, une étude récente suggère que le mécanisme d'induction de l'apoptose des cellules T $CD8^+$ par les Treg naturels humains serait médiée par Fas / FasL (Strauss et al., 2009).

Au laboratoire, nous avons précédemment montré que des cellules dendritiques humaines traitées par de l'acide mycophénolique étaient capables d'induire des lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs (iTreg) (partie 2 des travaux personnels). En effet, ces iTreg possèdent une activité suppressive antigène-spécifique vis-à-vis de lymphocytes T $CD4^+$ via un mécanisme contact-dépendant (Lagaraine et al., 2008). D'un point de vue phénotypique, on observe une augmentation de l'expression de CD25, GITR, CTLA-4, CD95 et de Foxp3 ainsi qu'une synthèse importante d'IL-10 et de TGF-β mais très peu d'IFN-γ. Après avoir détaillé l'action réverse de ces cellules T régulatrices sur les cellules dendritiques (partie 3 des travaux personnels), nous avons également examiné en parallèle, le comportement de lymphocytes T $CD8^+$ après une activation en présence de lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs induits par des DC traitées au MPA. L'influence des iTreg sur la prolifération, l'activation et la fonction effectrice des lymphocytes T $CD8^+$ a été étudiée.

Matériels et méthodes

1. Milieux et réactifs

La culture des cellules nécessite un milieu dit « complet » composé de RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco), 50 UI/ml de Pénicilline et 50µg/ml (ICN) de Streptomycine, et 2mM de L-glutamine (Bio Whittaker, Vervier Belgique). L'IL-4 et le TNF-α sont fournis par R&D systems (Abingdon, United Kingdom) et le GM-CSF par AbCys SA (Reuil Malmaison, France). Le LPS (Lipopolysaccharide) provient de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2. Isolement des monocytes humains

Les monocytes ont été isolés à partir d'un anneau de cytaphérèse provenant de donneurs volontaires sains informés ayant donné leurs consentements. Les prélèvements ont été effectués à l'Etablissement Français du Sang de Tours.

2.1. Isolement des PBMC humains

Le sang issu de l'anneau est dilué au demi dans du RPMI seul puis déposé délicatement sur un gradient de densité Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Oslo, Norvège). Après une centrifugation à 700g pendant 20 minutes, les cellules mononuclées du sang périphérique ou PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont recueillies et lavées deux fois en RPMI seul. Après les deux lavages, on réalise 2 déplaquettations des PBMC à l'aide de 2 centrifugations à 400g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 20ml de RPMI supplémenté avec 5% de SVF. La numération des cellules a été faite sur une cellule de Malassez après dilution en présence de bleu trypan.

2.2. Adhésion des monocytes

L'isolement des monocytes est réalisé par adhésion sur un support plastique. Les PBMC sont ensemencés à 200.10^6 cellules dans des flasques de 175 cm^2 (Falcon 3072), dans un volume de 20ml de RPMI 5% SVF 1% L-glutamine pendant 45 minutes à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2. Les cellules non-adhérentes ou PBL (Peripheral Blood Leucocytes) sont conservées pour isoler ultérieurement les lymphocytes T $CD4^+$. Les cellules adhérentes dont 90% correspondent aux monocytes sont directement utilisées pour obtenir les cellules dendritiques.

3. Différenciation des cellules dendritiques humaines

Les monocytes isolés précédemment sont mis en culture dans 25 ml de RPMI complet en présence de 1000 UI/ml de GM-CSF et de 25ng/ml d'IL-4 recombinante pendant 5 jours selon la méthode précédemment décrite par Sallusto (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Au 5ème jour, les monocytes qui se sont différenciés en cellules dendritiques immatures ont perdu leur propriété d'adhérence au plastique. Ces cellules non-adhérentes sont alors récupérées dans le surnageant de culture puis centrifugées. Pour induire leur maturation, les DC immatures sont stimulées avec du TNF-α à une concentration de 20ng/ml en présence ou non

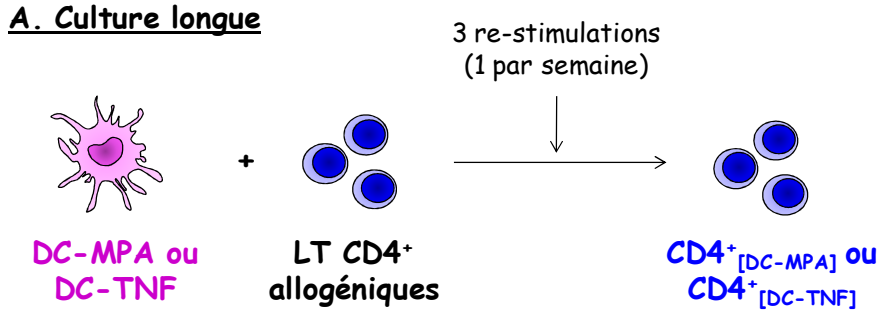
d'acide mycophénolique utilisé à une concentration de 100µM pendant 48 heures. Au 7ème jour, on obtient des DC matures désignées respectivement par DC-TNF et DC-MPA.

4. Isolement des lymphocytes T $CD4^+$

Les cellules non-adhérentes récoltées (PBL) ont été incubées avec des billes magnétiques couplées avec un anticorps anti-$CD4^+$ (Dynal, Compiègne, France) avec un rapport de 3 billes pour une cellule dans 1ml de PBS 0.1% SVF 2mM EDTA (Acide éthylène diamine tétra-acétique). L'ensemble a été incubé 20 minutes à 4°C sous agitation à l'aide d'une roue (Hygel-Atlanta, Rennes, France). Les lymphocytes T $CD4^+$ couplés aux billes magnétiques, ont été récupérés à l'aide d'un support aimanté, puis lavés 5 fois avec du PBS 0.1% SVF 2mM EDTA afin d'éliminer les cellules non fixées contenues dans le surnageant. Pour séparer les billes des lymphocytes, ces derniers ont été remis en suspension avec 100µl de RPMI seul, additionnés de 50µl de Détachabeads®. Après 45 minutes d'incubation sous agitation continue à température ambiante, les billes magnétiques ont été piégées par le support aimanté et le surnageant contenant les lymphocytes est récupéré et centrifugé à 600g pendant 7 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension dans du RPMI complet avant la numération en bleu trypan sur cellule de Malassez.

5. Co-culture DC / LT $CD4^+$ ("culture longue")

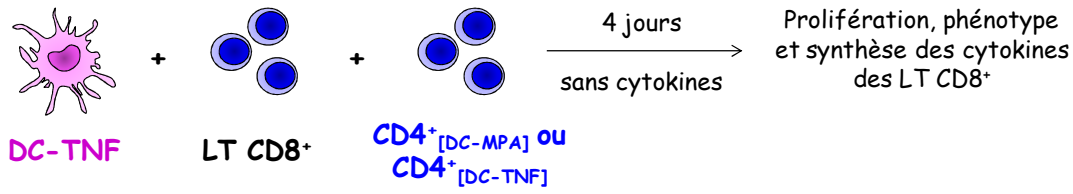
Après 48h de maturation, les cellules dendritiques (DC-TNF ou DC-MPA) sont mises en co-culture avec des lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques à un ratio de 1 DC pour 3 LT ($0{,}9.10^6$ DC + 3.10^6 $CD4^+$) pendant 7 jours. Les lymphocytes T $CD4^+$ sont ensuite re-stimulés une fois par semaine pendant 3 semaines avec les cellules dendritiques correspondantes précédemment congelées. De l'IL-2 (2UI/ml) et de l'IL-4 (500UI/ml) recombinantes humaines sont ajoutées au milieu de culture à partir de la première re-stimulation. Après quatre semaines de co-culture, les lymphocytes T ($CD4^+_{[DC\text{-}TNF]}$ et $CD4^+_{[DC\text{-}MPA]}$) sont récupérés, comptés après coloration au bleu trypan et leur action sur les lymphocytes T $CD8^+$ est analysée.



6. Test de la fonction suppressive des LT issus de culture longue

La capacité des lymphocytes T issus des « cultures longues » ($CD4^+_{[DC\text{-}MPA]}$ = iTreg et $CD4^+_{[DC\text{-}TNF]}$ = Teff) à inhiber la prolifération de lymphocytes T $CD8^+$ dans une MLR allogénique est testée de la façon suivante : les lymphocytes T $CD8^+$ répondeurs (10^5) issus du même donneur que les LT issus de culture longue sont stimulés par des cellules dendritiques matures (3 x 10^4 DC-TNF (DCm)) allogéniques dans une plaque 96-puits à fond en V. Les $CD4^+_{[DC\text{-}MPA]}$ et $CD4^+_{[DC\text{-}TNF]}$ sont ajoutés à la MLR à un ratio DC :T de 1 :3 et un ratio CD8 : CD4 de 1 :1. Après trois jours de co-culture à 37°C + 5% CO_2, de la thymidine tritiée (0.5µCi) est ajoutée pendant 18h pour mesurer la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$. Les plaques sont ensuite filtrées (96-Unifilter Perkin Elmer, France) et l'incorporation de thymidine tritiée est mesurée grâce à un compteur à scintillation (TopCount Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en cpm (coups par minute) ± écart-type des triplicatas. Les iTreg sont parfois placés au-dessus d'inserts de culture (Nunc 0.2µ).

B. Action des LT $CD4^+$ de culture longue sur les LT $CD8^+$



7. Analyse du phénotype des LT $CD8^+$ par cytométrie en flux

Les lymphocytes T sont lavés dans du PBS puis marqués avec des anticorps couplés à des fluorochromes pendant 30 minutes à 4°C. Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés : CD8-APC Cy7 (clone SK1, IgG1), CD25-APC (clone M-A251, IgG1) et CD107a-PE (clone H4A3, IgG1a) de chez BD Pharmingen, CD28-PE (clone CD28.2, IgG1) et CD69-PE (clone TP1.55.3, IgG2b) de chez Beckman Coulter. Pour les marquages intracellulaires, les cellules sont incubées avec une solution de Golgi Stop (Becton Dickinson) pendant les 5 dernières heures de la culture. Les cellules sont ensuite récupérées, marquées avec l'anticorps anti-CD8 puis perméabilisées avec les solutions « Fix and perm » de chez Caltag Laboratories. Les anticorps monoclonaux anti-IFN-γ-APC (clone B27, IgG1), perforine-PE (clone δG9, IgG2b), granzyme A-PE (clone CB9, IgG1) et granzyme B-FITC (clone GB11, IgG1) proviennent de BD Pharmingen. Après deux lavages, les lymphocytes T sont analysés

par cytométrie en flux avec le FACS Canto (BD Biosciences). Les analyses des résultats sont effectuées avec le logiciel Diva (BD Biosciences).

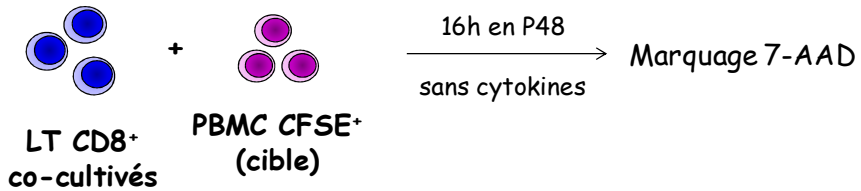
8. Mesure de la sécrétion des cytokines par ELISA

Les quantités d'IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, IFN-γ et TNF-α sécrétées par les lymphocytes T sont mesurées dans les surnageants de co-culture par ELISA à l'aide des kits « Ready-Set-Go » correspondants (eBioscience) selon les recommandations du fournisseur.

9. Fonction cytotoxique des LT CD8$^+$

La fonction cytotoxique des cellules T CD8$^+$ activées par des DC-TNF en présence ou non de CD4$^+_{[DC\text{-}MPA]}$ ou CD4$^+_{[DC\text{-}TNF]}$ contre des cellules cibles a été testée par le double marquage CFSE / 7-AAD, décrit précédemment par Lecoeur et al. Les cellules cibles (10^6 PBMC) sont marquées avec 2µl de CFSE à 5µM (Sigma) pendant 10 minutes à 37°C dans 1ml de PBS. Après ajout de SVF pour arrêter la réaction, les cellules sont lavées et immédiatement utilisées pour le test de la fonction cytotoxique. Les LT CD8$^+$ effecteurs sont incubés avec un nombre constant de cellules cibles marquées au CFSE (PBMC CFSE$^+$) à différents ratios E:C (4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 et 1:10) en P48 à fond plat pendant 16 heures dans une atmosphère humide 5% CO2 à 37°C en présence ou non de LT CD4$^+$ issus de culture longue. A la fin de l'incubation, les mélanges cellulaires sont lavés dans du PBS puis marqués avec 1µg de 7-AAD (Sigma, France). Pour chaque ratio, 30 000 cellules cibles ont été acquises. En parallèle, les cellules cibles sont incubées seules pour déterminer la lyse spontanée. Le pourcentage de lyse spécifique (PLS) a été déterminé par la formule : PLS = (100 x (% lyse de l'échantillon - % lyse basale)) / (100 - % lyse basale).

C. Fonction cytotoxique des LT CD8⁺ après coculture avec des iTreg



10. Analyse statistique

Les données ont été soumises au test non paramétrique de Wilcoxon avec comme seuil de significativité $p<0.05$.

Résultats

Dans cette étude, nous avons analysé l'effet des LT $CD4^+$ issus de culture longue sur la prolifération, le phénotype, la synthèse de cytokines et la fonction cytotoxique de LT $CD8^+$.

Les LT $CD4^+$ stimulés par des DC traitées au MPA inhibent la prolifération de LT $CD8^+$

Nous avons dans un premier temps étudié l'action des iTreg sur la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ suite à une stimulation allogénique. A la fin de la culture longue, des cellules dendritiques matures (DCm) du donneur A ont été utilisées pour activer des lymphocytes T $CD8^+$ naïfs répondeurs du donneur B en présence ou absence d'un nombre équivalent d'iTreg obtenus après stimulation par des DC-MPA du donneur A. La prolifération a été mesurée à J4 par incorporation de thymidine tritiée. D'après la figure 15A, les LT $CD4^+$ co-cultivés avec des DC-MPA sont anergiques à une restimulation et suppriment fortement la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ répondeurs activés par des DC matures allogéniques. A l'inverse, des lymphocytes T $CD4^+$ re-stimulées trois fois avec des DC matures allogéniques (Teff) sont aussi anetgiques à la fin de la culture longue mais contrairement aux iTreg, n'inhibent pas la prolifération des cellules T $CD8^+$ naïves (**Figure 15A**). Ces résultats montrent que les iTreg exercent également leur activité suppressive sur des lymphocytes T $CD8^+$. De plus, de façon intéressante, nous observons deux populations différentes de cellules anergiques avec des capacités suppressives très différentes.

Nous avons ensuite analysé les modes d'action des iTreg sur les cellules T $CD8^+$. Pour cela, nous avons testé si leur activité suppressive était dépendante d'un contact cellulaire. La prolifération des LT $CD8^+$ répondeurs stimulés par des DCm allogéniques est mesurée en présence d'inserts. Des iTreg sont ajoutés dans la partie supérieure des inserts en présence ou non de DCm. Lorsque seuls les iTreg sont placés au dessus de la membrane des inserts, la prolifération des LT $CD8^+$ répondeurs n'est plus inhibée (**Figure 15B**). En revanche, les iTreg exercent encore leur activité suppresive lorsque des DCm sont ajoutées dans le compartiment supérieur des inserts. Ces résultats montrent que les iTreg ont besoin d'être activés par des DCm pour exercer leur activité suppressive mais que cette activité est essentiellement liée à des facteurs solubles sans requérir un contact LT-LT.

Afin de déterminer si l'activité suppressive exercée par les iTreg est alloantigène spécifique, la prolifération de LT répondeurs $CD8^+$ issus d'un troisième donneur est mesurée en présence ou non d'iTreg. Les iTreg sont également capables d'inhiber la prolifération de

lymphocytes T $CD8^+$ répondeurs issus d'un troisième donneur donc leur activité régulatrice n'est pas alloantigène spécifique (**Figure 15C**). En revanche, lorsque la prolifération des LT $CD8^+$ répondeurs issus du même donneur que les iTreg est mesurée en présence de DCm provenant d'un troisième donneur, les iTreg n'exercent plus leur activité suppressive puisqu'ils n'inhibent plus la prolifération des LT $CD8^+$ répondeurs (**Figure 15D**). Ainsi, les iTreg ont besoin d'une activation par des cellules dendritiques présentant l'alloantigène envers lequel ils on été éduqués pour exercer leur activité suppressive mais une fois activés, ils exercent leur activité régulatrice de manière non spécifique d'alloantigène.

Les Trég induits par des DC-MPA modifient le phénotype des LT $CD8^+$

Pour confirmer l'action régulatrice des iTreg sur les lymphocytes T $CD8^+$, nous avons déterminé si ces iTreg modifiaient le phénotype d'activation ou de co-stimulation (CD25, CD69 et CD28) ainsi que le profil d'expression des récepteurs de chimiokines (CCR7, CCR4 et CXCR4) par cytométrie en flux (**Figure 16**).

Après co-culture avec des iTreg, les LT $CD8^+$ présentent des changements phénotypiques caractérisés par la diminution significative de l'expression des marqueurs CD25 (13.8% versus 37.3% en moyenne ; p=0.001 ; n=5) et CD69 (6.1% versus 25.5% en moyenne ; p=0.008 ; n=5) en comparaison avec des LT $CD8^+$ co-cultivés seuls ou en présence de Teff. Aucune différence significative n'a été observée dans le pourcentage des cellules positives exprimant le CD28 entre les différentes conditions de culture. De plus, l'expression des récepteurs de chimiokines des LT $CD8^+$ est différemment modulée par les iTreg versus Teff. Ainsi, les Teff induisent une up-régulation de CCR4 qui est un récepteur de chimiokine impliqué dans la migration des cellules T vers les organes lymphoïdes secondaires contrairement aux iTreg qui induisent une diminution de CCR4 et de CXCR4. Ces résultats suggèrent que les LT $CD8^+$ en présence d'iTreg possèdent un profil particulier carcatérisé par une faible activation et un profil de migration préférentiellement orienté vers la domiciliation dans les tissus périphériques. (**Figure 16**).

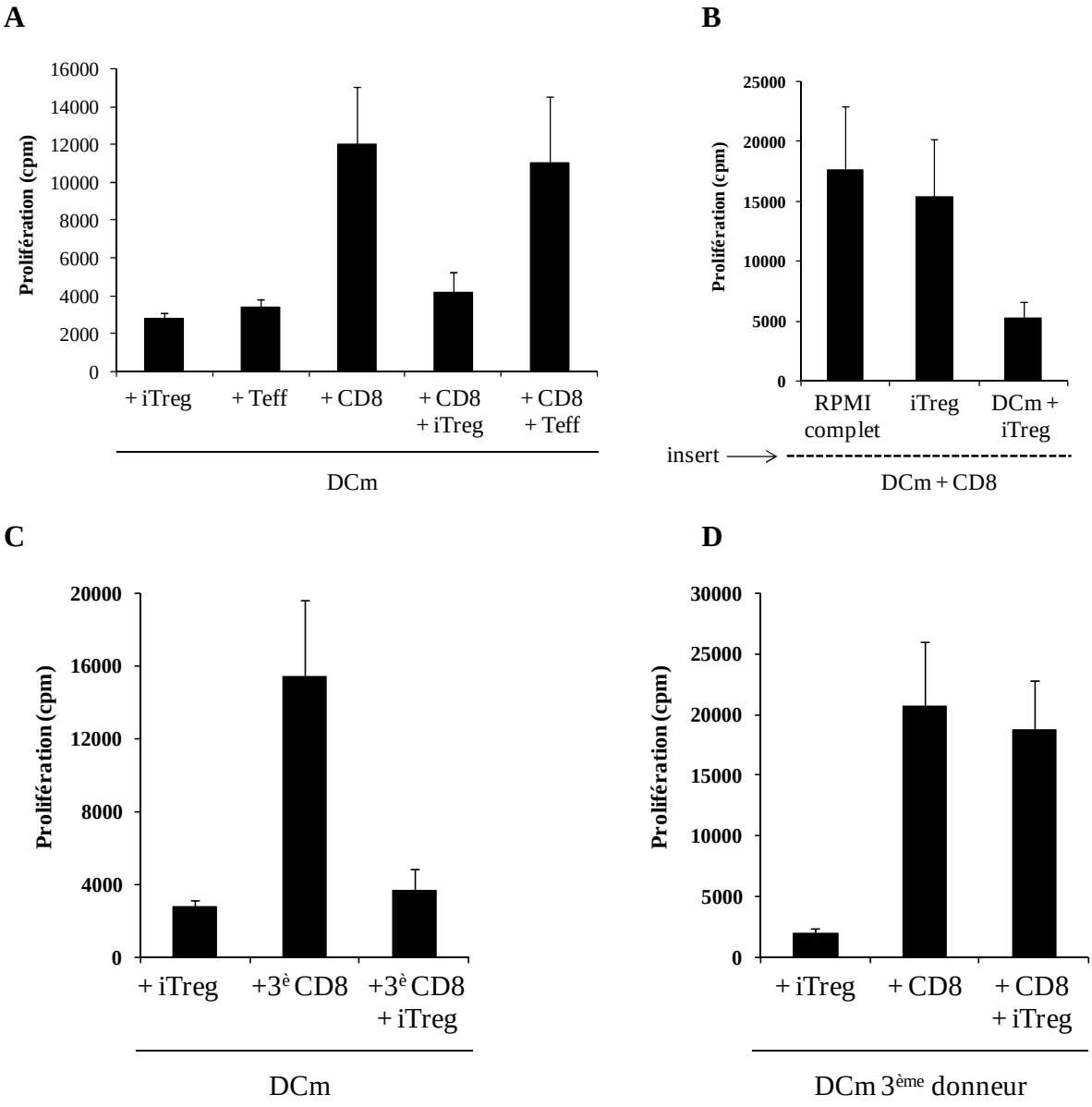


Figure 15: Les iTreg inhibent la prolifération des LT CD8$^+$ dans une MLR allogénique via un contact cellulaire.

A) Des lymphocytes T CD8$^+$ répondeurs sont stimulés par des DC matures (DCm) allogéniques pendant 4 jours en présence ou non d'iTreg ou de Teff à un ratio de 1 :1. **B)** Des LT CD8$^+$ répondeurs sont stimulés par des DC matures (DCm) allogéniques pendant 4 jours. Des iTreg sont ajoutés dans le compartiment supérieur des inserts en présence ou non de DCm. **C)** Des LT CD8$^+$ répondeurs issus d'un 3ème donneur (3è CD8) sont stimulés par des DCm allogéniques en présence ou non d'iTreg pendant 4 jours. **D)** Des LT CD8$^+$ répondeurs sont stimulés par des DCm d'un 3ème donneur en présence ou non d'iTreg pendant 4 jours. La prolifération est mesurée par ajout de thymidine tritiée. Les résultats sont exprimés en cpm ± écart type des triplicates. Ces résultats sont représentatifs de A: 8, B: 3, C: 5, D: 5 expériences.

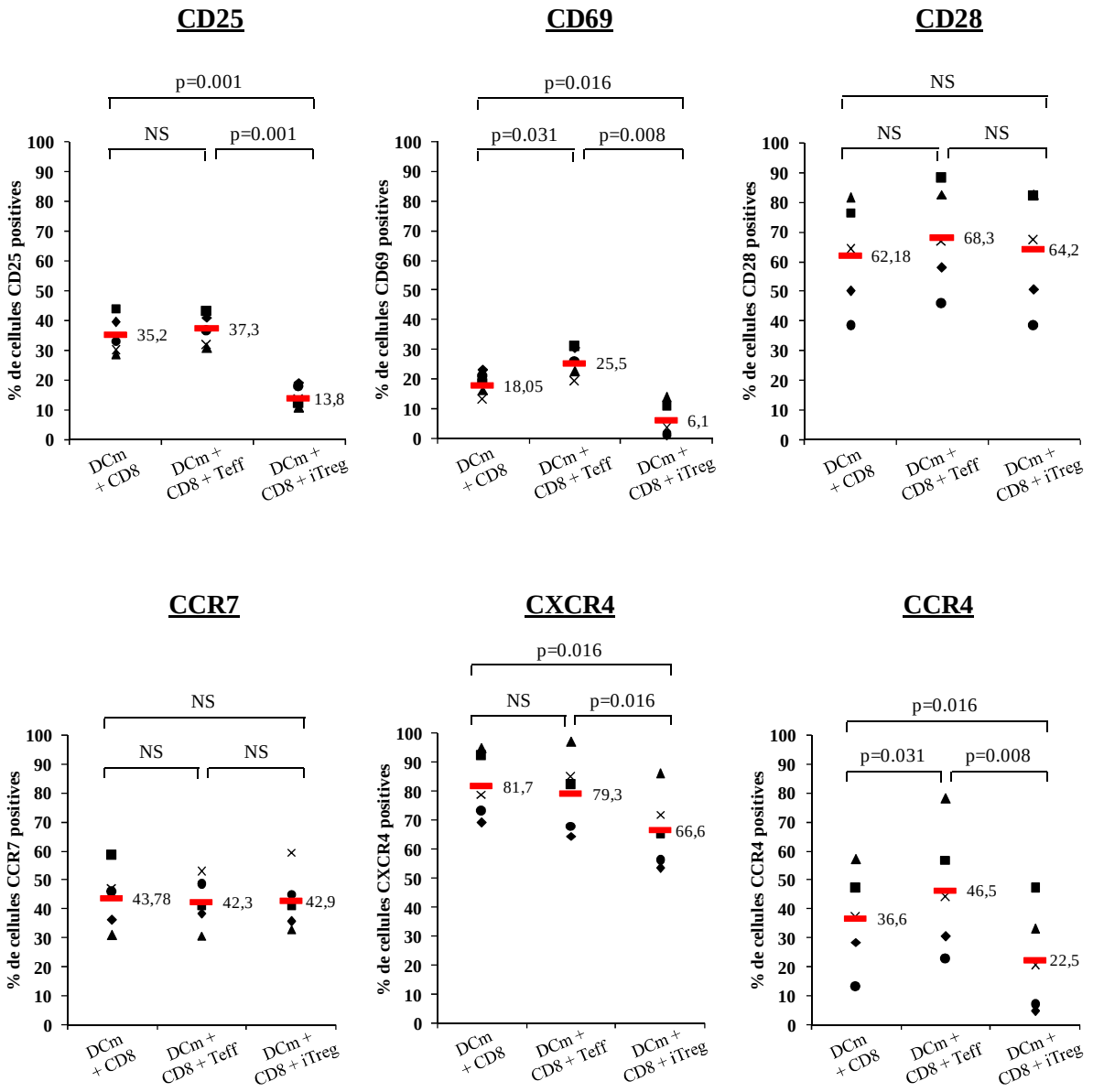


Figure 16: Analyse phénotypique des LT CD8$^+$ après co-culture avec des iTreg ou des Teff.

Des LT CD8$^+$ purifiés sont stimulés par des DCm allogéniques en présence ou non d'iTreg ou de Teff pendant 4 jours. L'expression des marqueurs CD25, CD69, CD28, CCR7, CXCR4 et CCR4 parmi les cellules CD8 positives a été analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives. Chaque symbole représente une expérience et la moyenne est matérialisée par un trait rouge. Le seuil de significativité a été fixé à $p<0.05$ par un test de Wilcoxon. n=5.

Les Trég induits par des DC-MPA modifient le profil de sécrétion cytokinique des LT CD8$^+$

Après avoir démontré que les iTreg et les Teff affectent différemment le phénotype des lymphocytes T CD8$^+$, nous avons ensuite étudié comment ces 2 populations T CD4$^+$ pouvaient modifier le profil de sécrétion des cytokines des lymphocytes T CD8$^+$. Ainsi, la sécrétion de l'IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, TNF-α et IFN-γ a été dosée par ELISA dans les surnageants de co-culture (**Figure 17**). D'après la figure 17, on constate que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 sont sécrétées dans des quantitiés plus importantes quand les LT CD8+ sont cultivés avec des iTreg plutôt qu'avec des Teff. En comparaison des cultures de CD8 avec des DCm en présence ou non de Teff, la production des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IFN-γ est significativement diminuée en présence d'iTreg (**Figure 17**). Cependant, on ne peut pas exclure que les niveaux de sécrétion obtenus proviennent principalement de la présence des iTreg et des Teff. C'est pourquoi, il faudrait également réaliser les doubles marquages CD8 / cytokines intracellulaires pour confirmer ou non nos résultats.

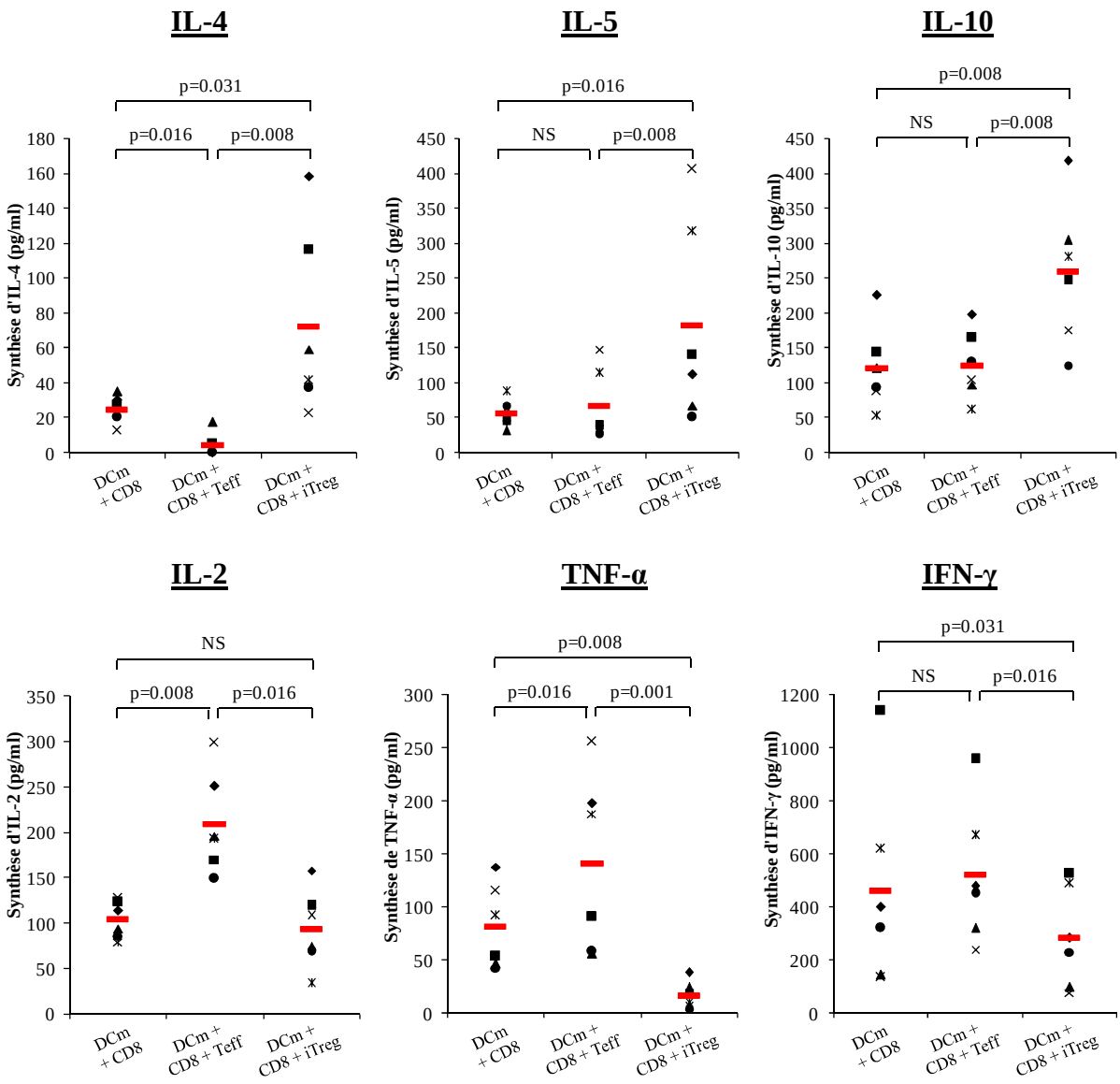


Figure 17: Les iTreg augmentent la synthèse de l'IL-4, IL-5 et IL-10 et diminuent la production des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IFN-γ.

Des LT $CD8^+$ purifiés sont stimulés par des DCm allogéniques en présence ou non d'iTreg ou de Teff pendant 4 jours. Les cytokines IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, TNF-α et IFN-γ ont été dosées dans les surnageants de co-culture par ELISA. La sécrétion des différentes cytokines est exprimée en pg/ml. Chaque symbole représente une expérience et la moyenne est matérialisée par un trait rouge. Le seuil de significativité a été fixé à $p<0.05$ par un test de Wilcoxon. n=6.

Les Trég induits par des DC-MPA inhibent la fonction cytotoxique des LT CD8+

Pour finir, nous avons testé si l'activité cytotoxique des LT CD8+ contre des cellules cibles allogéniques était différente après co-culture avec des iTreg ou des Teff. Pour ce faire, nous avons utilisé un test basé sur le double marquage CFSE / 7-AAD, précédemment décrit par Lecoeur *et al.*, (Lecoeur et al., 2001). A la fin de la co-culture de 4 jours, les LT CD8 co-cultivés ont été purifiés et incubés avec des PBMC (cellules cibles) préalablement marqués au CFSE pendant 16 heures puis les cellules ont été marquées au 7-AAD pour déterminer le pourcentage de cellules lysées. D'après la figure 18, le pourcentage de cellules cibles lysées (PBMC $CFSE^+$ / $7\text{-}AAD^+$) est significativement diminué lorsque les LT $CD8^+$ ont été cocultivés au préalable avec des iTreg (20% ± 4 versus 37.8% ± 6 ; p=0.008 ; n=5). A l'inverse, les LT $CD8^+$ préalablement co-cultivés avec des Teff ont une fonction cytotoxique accrue puisque le pourcentage de cellules lysées est augmenté (45% ±4 versus 37.8% ±6 ; p=0.031 ; n=5) en comparaison avec des LT $CD8^+$ uniquement stimulés par des DCm (**Figure 18**).

Nous avons également réalisé des expériences avec des PBMC cibles d'un 3ème donneur et nous avons trouvé que les LT $CD8^+$, quelque soit leur condition de culture, n'étaient pas capables de lyser les PBMC d'un autre donneur, confirmant ainsi que la fonction cytotoxique des CD8 est antigène-spécifique (data not shown).

Pour conclure, on peut dire que les iTreg sont capables d'inhiber la fonction cytotoxique des LT $CD8^+$ puisque leur capacité à induire la lyse des cellules cibles est diminuée.

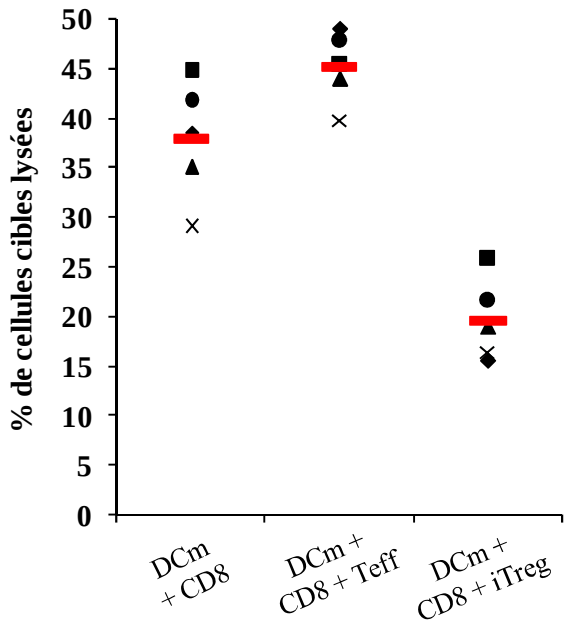


Figure 18: Les iTreg inhibent la fonction cytotoxique des cellules T $CD8^+$.

Des LT $CD8^+$ sont stimulés par des DCm allogéniques en présence ou non d'iTreg ou de Teff pendant 4 jours. A la fin de la co-culture, les LT $CD8^+$ sont purifiés et incubés avec des cellules cibles marquées au CFSE (PBMC) pendant 16 heures. Les cellules sont ensuite marquées au 7-AAD et passées au cytomètre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules lysées. Chaque symbole représente une expérience et le trait rouge correspond à la moyenne de 5 expériences.

Pour compléter la fonctionnalité des LT CD8$^+$, nous avons également analysé l'expression des marqueurs associés aux granules cytotoxiques tels que la perforine, les granzymes A et B (Peters et al., 1991; Trapani and Smyth, 2002) et le CD107 qui est exprimé à la surface des cellules cytotoxiques effectrices après dégranulation (Betts et al., 2003; Mittendorf et al., 2005). La figure 19 montre que le pourcentage de cellules positives exprimant CD8 / perforine est largement diminué lorsque les LT CD8$^+$ ont été co-cultivés avec des iTreg (11.7% versus 35.2%). De même, l'expression des granzymes A et B est diminuée pour les LT CD8$^+$ cocultivés avec des iTreg en comparaison avec des Teff. Enfin, le pourcentage de cellules CD107 positives est plus faible pour les LT après co-culture avec des iTreg (16.1% versus 42.8%). A l'inverse, la présence de Teff dans les co-cultures entraîne l'augmentation de l'expression des différents marqueurs testés pour les LT CD8$^+$ (**Figure 19**).

Ces résultats démontrent que les iTreg inhibent l'expression de l'ensemble des molécules associées à la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8$^+$.

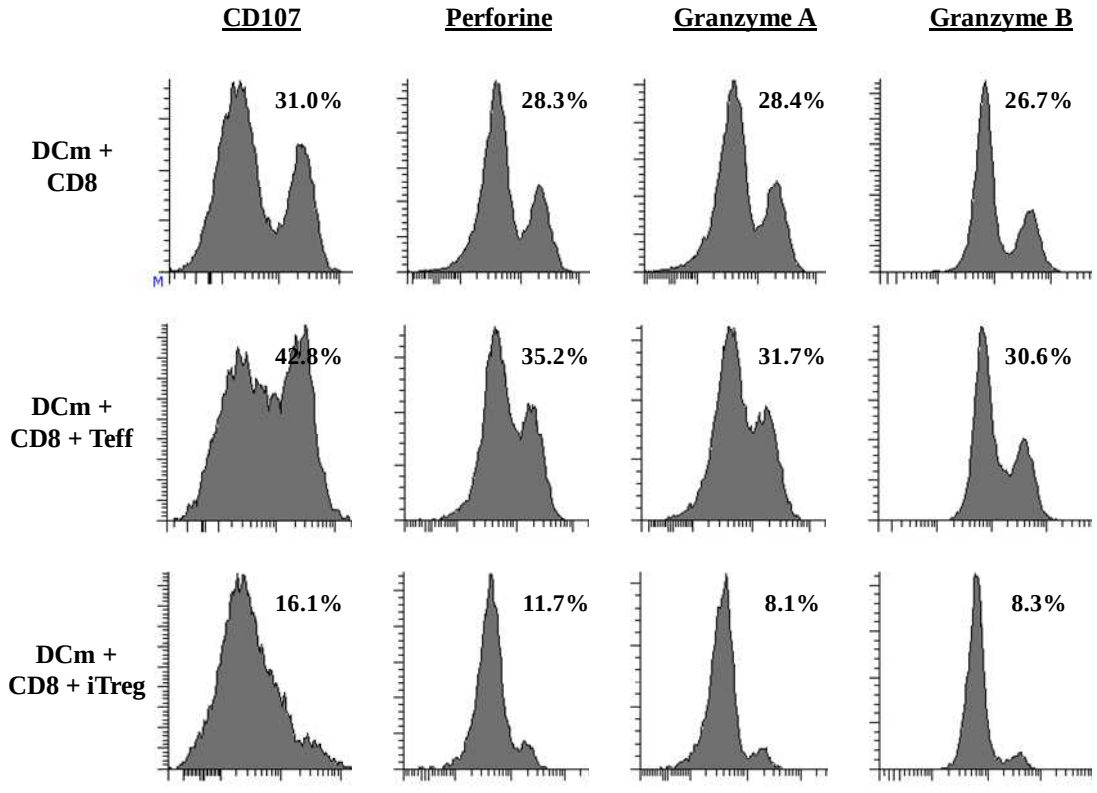


Figure 19: Les iTreg inhibent fortement l'expression des molécules associées aux granules cytotoxiques des cellules T CD8$^+$.

Des LT CD8$^+$ purifiés sont stimulés par des DCm allogéniques en présence ou non d'iTreg ou de Teff pendant 4 jours. L'expression des molécules CD107, perforine, granzymes A et B a été analysée par cytométrie en flux parmi les cellules CD8 positives. Représentation d'une expérience parmi 5.

Discussion - Conclusion

L'objectif principal de cette partie était d'explorer la régulation des lymphocytes T $CD8^+$ par les Treg induits par les DC-MPA. Nous avons mis en évidence que les iTreg inhibent la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ en réponse à une stimulation allogénique. Cette suppression est médiée par des interactions cellulaires qui ont lieu quelque soit la spécificité du TCR des cellules T $CD8^+$. Cette diminution de prolifération est accompagnée d'une diminution d'expression des molécules d'activation CD25 et CD69 par les cellules T $CD8^+$. De manière intéressante, les Treg induits par des DC-MPA sont capables de diminuer l'expression des protéines associées à la fonction cytotoxique telles que le CD107, la perforine et les granzymes A et B, de réduire la sécrétion d'IFN-γ par les cellules T $CD8^+$ et d'inhiber leur fonction cytotoxique. Les mécanismes impliqués plus précisément dans cette régulation restent néanmoins à élucider.

La tolérance périphérique induite par les Treg $CD4^+$ $CD25^+$ naturels est l'un des mécanismes majeur du maintien de la balance immunologique et de la protection de l'hôte contre des réactions auto-immunes (Asano et al., 1996; Sakaguchi et al., 1985; Shevach, 2002). Etant donné l'impact du dérèglement de la fonction des Treg dans de nombreuses maladies humaines, il est important de mieux comprendre la biologie des Treg afin d'envisager de nouvelles thérapies pour restaurer ou tout du moins équilibrer la balance immune. Par conséquent, la compréhension des mécanismes utilisés par les Treg pour interagir avec d'autres sous-populations lymphocytaires est indispensable. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la régulation des cellules T $CD8^+$ par des lymphocytes T régulateurs induits par des DC-MPA. Nous avons ainsi démontré que les iTreg inhibent le développement de la fonction effectrice des cellules T $CD8^+$. L'une des contributions majeures des LT $CD8^+$ en réponse à l'inflammation est leur sécrétion en IFN-γ (O'Shea et al., 2002). La production de cette cytokine est significativement diminuée en présence de iTreg. Ceci peut être mis en parallèle avec la diminution d'expression des molécules associées aux granules cytotoxiques telles que le CD107, la perforine et les granzymes A et B ainsi que par une nette inhibition de leur fonction cytotoxique. Quelques études ont déjà rapporté un effet similaire à la fois avec des Treg naturels murins (Mempel et al., 2006) mais aussi humains (Camara et al., 2003; Trzonkowski et al., 2006).

Les mécanismes responsables des fonctions suppressives des Treg varient d'un modèle à l'autre. En effet les Treg et plus précisément les Treg induits peuvent utiliser différents mécanismes selon les signaux perçus dans le microenvironnement dans lequel ils se trouvent. On retrouve ainsi les mécanismes qui nécessitent un contact physique direct entre les cellules comme les interactions ligand-récepteur du CD95 (Banz et al., 2002; Fritzsching et al., 2005; Janssens et al., 2003), de ICOS (Strauss et al., 2008) ou du CD46 (Kemper and Atkinson, 2007) mais aussi la suppression induite par contact via la production de perforine / granzymes (Cao et al., 2007; Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004a). Des facteurs solubles ont également été décrits comme les cytokines immunorégulatrices IL-10 et TGF-β (Bergmann et al., 2008; Strauss et al., 2007b) et le mécanisme d'adénosine obtenue par clivage de l'ATP par les ectonucléosides hydrolases associées aux Treg (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). Enfin, la privation en cytokines induite par les Treg a été proposée comme étant un mécanisme inhibant les réponses T effectrices (Pandiyan et al., 2007). Dans cette étude, nous montrons que les iTreg sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ après une stimulation allogénique. L'activité suppressive de ces iTreg ne nécessite pas de contact cellulaire direct avec les LT $CD8^+$ répondeurs mais semble plutôt liée à des facteurs solubles. Cependant, nous savons que l'ajout d'anticorps bloquants anti-IL-10 et anti-IL-10R ou anti-TGF-β n'inhibe pas la fonction régulatrice des iTreg suggérant que ces facteurs solubles ne jouent pas de rôle important dans leur activité suppressive. Toutefois, on peut envisager que dans notre modèle, l'IL-10 pourrait intervenir dans l'induction du phénotype régulateur de nos Treg. En effet, Kearley et collaborateurs ont déjà montré un rôle similaire de l'IL-10 dans l'induction de Treg $CD4^+$ $CD25^+$, bien que la production d'IL-10 par les Treg eux-mêmes ne soit pas requise pour la suppression (Kearley et al., 2005). L'identification des mécanismes impliqués dans la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs induits par les DC-MPA est actuellement en cours d'étude au laboratoire.

De manière intéressante, nos résultats suggèrent également que les Treg générés par des DC-MPA sont spécifiques de l'antigène puisque la présence des DC du premier donneur est nécessaire pour leur activité régulatrice. L'induction de Treg alloantigènes spécifiques a déjà été décrite chez la souris (Fujita et al., 2007; Gregori et al., 2001; Taner et al., 2005; Turnquist et al., 2007) mais peu d'études chez l'homme ont mis en évidence une spécificité d'antigène (Hamdi et al., 2007; Jiang et al., 2003). Récemment, Hamdi *et al* ont décrit une population de Treg antigène-spécifiques mais contrairement à notre modèle, ces Treg résultent d'une expansion de Treg $CD4^+$ $CD25^+$ naturels et sont IL-10 dépendant (Hamdi et al., 2007).

De nombreux mécanismes comme la délétion, la suppression ou l'induction d'anergie peuvent conduire à une hypo-réponse des cellules T. Nous démontrons dans cette étude que les iTreg induisent l'anergie des cellules T $CD8^+$. De nombreuses études corrèlent l'anergie et la suppression à la fois dans les LT $CD4^+$ (Chai et al., 1999; Lombardi et al., 1994) et dans les LT $CD8^+$ (Steinbrink et al., 2002). De manière intéressante, nous avons mis en évidence que les Teff (cellules T CD4 générées en culture longue par des DC matures) sont anergiques mais sont dépourvues d'activité suppressive. Ceci est en accord avec d'autres études montrant que les cellules T anergiques et régulatrices peuvent être différenciées selon l'expression de leurs gènes (Knoechel et al., 2006). D'après Knoechel et collaborateurs, les Treg ont un profil moléculaire distinctif contrairement aux cellules uniquement anergiques. Ainsi, les cellules anergiques expriment des transcrits associés à la fonction effectrice comme les cytokines IL-4 et IFN-γ.

Participation à d'autres travaux

1. L'acide mycophénolique affecte différemment la maturation des cellules dendritiques induite par le Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) et le Lipopolysaccharide (LPS)

Situation :

La découverte des immunosuppresseurs a révolutionné la transplantation d'organes (Schwartz and Dameshek, 1959) en augmentant la survie des greffons. Ces molécules agissent principalement en inhibant l'activation ou la prolifération des lymphocytes T. Cependant, ces dernières années, des études ont aussi souligné le rôle de certaines de ces molécules et notamment du MPA dans la modulation des fonctions effectrices des cellules dendritiques menant à l'inhibition : de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de l'expression de molécules de co-stimulation et de la capacité à activer les lymphocytes T naïfs allogéniques (Hackstein and Thomson, 2004; Lagaraine and Lebranchu, 2003). Toutefois, les mécanismes impliqués conduisant à ces propriétés restent mal compris.

Dans notre laboratoire, nous avons ainsi précédemment montré que les cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique (MPA) deviennent résistantes à la maturation induite par le TNF-α (Lagaraine et al., 2005) et sont caractérisées par une faible expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86), un maintien de l'endocytose liée au récepteur au mannose et une faible capacité allo-stimulatrice (Lagaraine et al., 2005). Des résultats similaires ont été retrouvés dans un modèle infectieux (Colic et al., 2003). Cependant, les mécanismes d'action du MPA à l'origine de ces propriétés sur les cellules dendritiques restent peu étudiés. Etant donné que le MPA inhibe la maturation des cellules dendritiques, nous nous sommes intéressés aux molécules prépondérantes impliquées dans la signalisation intracellulaire du processus de maturation des cellules dendritiques telles que les MAPK et le facteur de transcription NF-κB (Aiba et al., 2003; Ardeshna et al., 2000; Arrighi et al., 2001; Hoarau et al., 2008; Nakagawa et al., 2004; Nakahara et al., 2004; Rescigno et al., 1998) afin de mieux caractériser le mode d'action du MPA dans les cellules dendritiques.

Objectifs et résumé des résultats :

Il s'agit pour nous de comprendre le mode d'action du MPA sur la maturation des cellules dendritiques induite par différents agents de stimulation. En effet, nous nous sommes intéressés à l'effet du MPA sur la maturation phénotypique des DC engendrée par une

stimulation par le TNF-α ou par le LPS afin de mimer respectivement un environnement inflammatoire ou une infection bactérienne.

Dans un premier temps, nous avons pu montrer que le MPA inhibe l'augmentation d'expression des molécules de co-stimulation et de maturation induite par le TNF-α mais qu'en revanche il n'a pas d'effet sur l'expression de ces marqueurs après une stimulation par le LPS. A partir de ce résultat, nous nous sommes intéressés aux molécules de signalisation intracytoplasmique, p38MAPK, ERK et NF-κB, intervenant dans le processus de maturation phénotypique des cellules dendritiques et nous avons comparé leur niveau d'activation en présence de MPA en fonction du stimulus LPS ou TNF-α.

Nous avons ainsi démontré que le MPA inhibe la phosphorylation de p38MAPK induite par ces deux stimuli. De plus, nous montrons que l'utilisation d'un inhibiteur chimique spécifique de p38MAPK à une concentration sub-optimale (inhibant p38MAPK à un niveau équivalent à celui du MPA) induit un phénotype similaire à celui des cellules dendritiques traitées par le MPA. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'effet du MPA sur les marqueurs de co-stimulation et de maturation des cellules dendritiques humaines induite par le TNF-α est une conséquence de l'inhibition de p38MAPK, ce qui n'a encore jamais été rapporté.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes d'action du MPA à l'origine de l'inhibition de p38MAPK. Nous avons testé si l'effet du MPA sur p38MAPK était lié à son mécanisme d'action actuellement connu, c'est-à-dire, une inhibition de l'enzyme responsable de la synthèse *de novo* de guanosine (IMPDH). Ainsi, l'ajout de MPA est responsable d'une déplétion en guanosine dans la cellule et en supplémentant par la guanosine, l'effet du MPA peut être spécifiquement antagonisé. Nous montrons que l'addition de guanosine ne modifie pas la capacité du MPA à inhiber la phosphorylation de p38MAPK suggérant que l'action du MPA sur p38MAPK est indépendante de la carence en guanosine induite par l'inhibition de l'IMPDH.

Nous avons également étudié la voie NF-κB qui est connue pour être activée par les ligands de TLR et impliquée dans la maturation phénotypique des cellules dendritiques (Ardeshna et al., 2000; Rescigno et al., 1998). Nos résultats ont confirmé que le LPS utilise préférentiellement NF-κB pour induire l'expression des marqueurs de maturation. De plus, l'utilisation d'une dose sub-optimale d'inhibiteur de NF-κB en présence de MPA confirme que la voie p38MAPK n'est pas majeure dans la maturation par LPS.

Nous nous sommes aussi intéressés à ERK, une autre MAPK impliquée dans le processus de maturation (Agrawal et al., 2003; Aiba et al., 2003; Nakagawa et al., 2004; Puig-Kroger et al., 2000). Nous montrons que l'induction modérée et transitoire de la

phosphorylation de ERK par le TNF-α est inhibée par le MPA. Toutefois, le MPA inhibe plus tardivement la phosphorylation de ERK que celle de p38MAPK suggérant le rôle mineur de ERK dans l'inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation par le MPA.

Concernant la synthèse des cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-12 et IFN-γ, nous montrons que le MPA inhibe significativement la sécrétion de ces cytokines aussi bien après une stimulation par le TNF-α que par le LPS.

Enfin, la capacité allo-stimulatrice des DC, fonction clé dans l'induction d'une réponse immune effectrice, a été analysée. Nous montrons que les cellules dendritiques maturées par le TNF-α ou le LPS en présence de MPA inhibent aussi efficacement l'expansion clonale de lymphocytes T allogéniques. La faible capacité allo-stimulatrice des DC maturées par du LPS en présence de MPA (caractérisées par un niveau d'expression des marqueurs CD80 et CD86 comparable à celui des DC traitées par du LPS seul) nous suggère plusieurs remarques:

- Une forte expression des marqueurs de costimulation n'est pas suffisante pour conférer à la DC une forte capacité allostimulatrice.
- une dissociation est possible entre l'up-régulation des marqueurs et l'expression des cytokines. Les mécanismes responsables de ces deux phénomènes sont donc différents.
- L'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires primerait sur l'inhibition des marqueurs de co-stimulation dans la réduction des capacités allo-stimulatrices des DC.
- Le MPA pourrait aussi entraîner une expression différentielle des molécules de ligands de récepteur inhibiteur des lymphocytes tels que PD-1 comme ceci a été rapporté chez la souris où le MPA augmente l'expression de PD-L2 dans les DC après une maturation par le LPS (Geng et al., 2006).

Enfin, de façon plus générale, nos résultats suggèrent que l'environnement dans lequel se trouve la cellule dendritique va modifier l'action du MPA et entraîner des effets différents.

Article accepté dans « Molecular Immunology » octobre 2009

MYCOPHENOLIC ACID DIFFERENTLY AFFECTS DENDRITIC CELL MATURATION INDUCED BY TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AND LIPOPOLYSACCHARIDE THROUGH A DIFFERENT MODULATION OF MAPK SIGNALING

Delphine Faugaret[1], **Roxane Lemoine**[1], Christophe Baron[1,2], Yvon Lebranchu[1,2] and Florence Velge-Roussel[1,3*§]

[1]EA 4245 « Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes », Université François Rabelais, IFR-136 « Agents Transmissibles et Infectiologie », UFR de Médecine, 10 Bd Tonnellé, 37000 Tours, France

[2]Service de Néphrologie-Transplantation, CHRU Tours, 2 bis Bd Tonnellé, 37000 Tours, France

[3]UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 Av Monge, 37200 Tours, France

[§]These authors contributed equally to this study

*Corresponding author: Dr Florence Velge-Roussel, Université François Rabelais, EA 4245 « Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes », UFR de Médecine, IFR136, 10 Bd Tonnelle, 37000 Tours, France.

Telephone: +33 2 47 36 60 58; Fax: +33 2 47 36 61 47; e-mail: florence.velge-roussel@univ-tours.fr

Abstract

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive drug which induces resistance to several maturation signals in human dendritic cells (DC) by unknown mechanisms. As Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) are involved in the maturation process, we studied whether MPA affected p38MAPK and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) in human DC. We first showed that MPA reduced TNFα-induced phenotype maturation, whereas it had no effect after LPS activation, suggesting that MPA preferentially affects the signaling pathway used by TNFα. We found that TNFα preferentially used p38MAPK to induce phenotype maturation in DC, whereas LPS preferentially activated NF-κB. Importantly, we showed that MPA more strongly inhibited p38MAPK phosphorylation induced by TNFα than that induced by LPS. This difference in inhibition may therefore explain its different effect on the DC phenotype. Interestingly, MPA inhibited the inflammatory cytokine synthesis and allostimulatory capacity induced by both stimuli. Exogenous guanosine antagonized the effect of MPA on the phenotype of TNFα-matured DC as well as the IL-12p70 and IFNγ secretion induced by both stimuli, without affecting p38MAPK phosphorylation. The action of MPA on human DC phenotype maturation appears mainly to be due to its ability to inhibit p38MAPK. Furthermore, the difference between LPS and TNFα emphasizes that the DC microenvironment strongly influences DC sensitivity to MPA.

Keywords: mycophenolic acid, dendritic cells, MAPK signaling

Introduction

Immature dendritic cells (DC) reside in non-lymphoid organs, where they capture and process antigens. In the presence of "danger" signals, they migrate into the T cell areas of lymphoid organs and mature to acquire the ability to present antigens to naive T cells. Fully mature DC express high levels of surface co-stimulation and maturation markers such as CD80, CD86, CD83, as well as class II MHC, and can produce inflammatory cytokines such as IL-12 (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998; Rossi and Young, 2005). However, DC do not only induce immunogenic responses, they can also exhibit tolerogeneic properties (Steinman et al., 2003). The balance between these two states seems to be partially dependent on DC maturation (Hawiger et al., 2001; Kalinski et al., 2000; Lutz et al., 2000; Mahnke et al., 2002; Pulendran et al., 2001). Improving understanding of the mechanisms which result in resistance to maturation may thus be a relevant approach to preventing acute and chronic allograft rejection.

Many inflammatory and infectious signals such as lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor α (TNFα) can induce DC maturation (Ardeshna et al., 2000; Arrighi et al., 2001). The intracellular signals leading to DC maturation are complex and largely dependent on NF-κB (Rescigno et al., 1998). However several studies have demonstrated the role of mitogen-activated protein kinases (MAPK) such as extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-jun N-terminal kinases (JNK) and p38MAPK (Aiba et al., 2003; Ardeshna et al., 2000; Arrighi et al., 2001; Bunyard et al., 2003; Hoarau et al., 2008; Nakagawa et al., 2004; Nakahara et al., 2004; Sato et al., 1999) in this process. The ERK1/2 pathway skews DC to a pro-tolerogenic profile (Agrawal et al., 2003; Puig-Kroger et al., 2001) since its inhibition in DC increases the secretion of IL-12, their allostimulatory capacities and the expression of CD83, CD86 and HLA-DR molecules. In contrast, the JNK and p38MAPK pathways favor an immunogenic profile, since their inhibition reduces the expression of CD83, CD86, HLA-DR molecules, the secretion of IL-12 and the allostimulatory ability of activated DC (Ardeshna et al., 2000; Arrighi et al., 2001; Nakahara et al., 2004).

Mycophenolic acid (MPA), the active metabolite of Mycophenolate Mofetil, is an immunosuppressive drug currently used in transplantation to prevent rejection (Mele and Halloran, 2000). We and others have demonstrated that MPA induces resistance to several maturation signals in human DC, characterized by reduced expression of surface maturation molecules, low allostimulatory ability and weak IL-12 synthesis (Colic et al., 2003; Dubsky et

al., 2006; Lagaraine et al., 2005). Moreover, MPA-treated DC have been shown to have the ability to generate regulatory T cells *in vitro* (Lagaraine et al., 2008). In lymphocytes, MPA is a noncompetitive, reversible inhibitor of the enzyme inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) involved in the *de novo* synthesis of guanosine nucleotides (Sintchak et al., 1996). This property confers on MPA its immunosuppressive effect on lymphocytes (Fulton and Markham, 1996). In contrast, the mechanism of action of MPA on DC remains to be elucidated.

In the study reported here, we demonstrated for the first time in human DC that MPA mainly inhibits p38MAPK and incidentally has different effects according the maturation agent used (TNFα or LPS).

Materials and methods

Cytokines and reagents

Human cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 50IU/ml penicillin/streptomycin, 2mM L-glutamin and 10% heat-inactivated FCS, purchased from Invitrogen (Gibco, Cergy-Pontoise, France). TNFα and recombinant human IL-4 (rhIL-4) were purchased from R&D systems (Lille, France) and rhGM-CSF from AbCys.SA (Paris, France). LPS, MPA, PD98059 (MEK1/2 inhibitor), lactacystin (NF-κB inhibitor), phenylmethylsulfonyl-fluoride, sodium orthovanadate and aprotinin were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) while SB203580 (p38MAPK inhibitor) was obtained from Invivogen (Toulouse, France).

Generation of DC

Blood cells were obtained by cytapheresis from healthy volunteers following informed written consent. Human immature Mo-DC were differentiated with IL-4 and GM-CSF as previously described (Lagaraine et al., 2005).

On day 5, cells were harvested, washed and re-suspended in complete medium containing rhIL-4 and rhGM-CSF. Maturation was induced by adding LPS (50ng/ml) or TNFα (20ng/ml) for two days, with or without MPA (100µM), PD98059 (25µM), SB203580 (0.02, 0.2, 10 or 20µM) or lactacystin (10 or 20µg/ml). On day 7, DC were washed extensively with RPMI-1640 and used for further experiments. The purity of DC cultures was routinely above 93% after adhesion, as assessed by FACS analysis.

Allogeneic Mixed Lymphocyte Reaction

Human CD4 T cells were isolated from healthy blood donors and the allogeneic MLR assays were performed as previously described (Lagaraine et al., 2008).

When specified, IL-2 (100IU/ml) or anti-IL-10 (20µg/ml) or anti-TGF-β (20µg/ml) neutralizing antibodies purchased from R&D Systems (Abingdon, UK) or IL-12 (10ng/ml, Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France) were added to the wells.

Flow cytometry analysis

Briefly, 10^5 DC were incubated for 30min at 4°C with the following mouse anti-human antibodies: FITC-conjugated anti-CD83 (clone HB15e, IgG1), Pe-Cy5-conjugated anti-CD86 (clone 2331, IgG1), APC-conjugated anti-CD25 (clone M-A251, IgG1) from Becton Dickinson, (Grenoble, France) and PE-conjugated anti-CD80 (clone MAB104, IgG1) from Beckman Coulter (Villepinte, France). Data were analyzed for geometric mean fluorescence intensity (MFI) (MFI of antibody of interest / MFI of isotype control) and then normalized (index 1 corresponding to the MFI obtained with DC stimulated with TNFα or LPS).

For detection of intracellular phosphoproteins, 10^6 immature DC were resuspended in complete medium in 5 ml tubes and placed in a 37°C water bath. MPA (100µM) or increasing concentrations of SB203580 were added to one set of tubes and incubated for 30min. Cells were then stimulated with LPS (50ng/ml) or with TNFα (20ng/ml), and samples were fixed and permeabilized according to the F/TX/MeOH method, as previously described (Chow et al., 2005). Cells were incubated for 20min with Alexa-647-conjugated anti-phospho-p38MAPK (clone 36, pT180/Y182, IgG1; Becton Dickinson, Grenoble, France) or Alexa-488-conjugated anti-phospho-ERK1/2 (clone E10; pT202/Y204, IgG1; Beckman Coulter, Villepinte, France), then analyzed by FACS Canto II (Becton Dickinson, Grenoble, France). The presence of activated p38MAPK or ERK1/2 was reported as mean fluorescence intensity (MFI) ratio. We defined p38MAPK and ERK1/2 phosphorylation according to the difference between basal MAPK activation and the response after stimulation (stimulated-DC MFI ratio - unstimulated DC MFI ratio). The p38MAPK phosphorylation induced by LPS (50ng/ml) or TNFα (20ng/ml) at the phosphorylation peak corresponded to 100% p38MAPK phosphorylation.

Western Blotting analysis

DC were harvested after stimulation with LPS in the presence or absence of MPA then washed in cold PBS. Cell lysates were obtained as previously described (Hoarau et al., 2006). Protein assay was performed using the BCA kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions. Cell lysates (50µg) were electrophorysed and transferred as previously described (Hoarau et al., 2006). Immunoblotting was performed using the phospho-p38MAPK or p38MAPK antibody (1/1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), then revealed with horseradish peroxidase–conjugated secondary rabbit antibody (1/20000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and chemoluminescence detection (Perkin Elmer Life Science, France). ImageJ 1.3 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used to measure the intensity of the signal and calculate the ratio of p38MAPK phosphorylation to its control.

Cytokine analysis

For intracellular detection of IFNα, cells were stained with PE-conjugated anti-CD209 (clone AZND1, IgG1; Beckman Coulter, Villepinte, France) for 30min at 4°C then permeabilized with BD cytofix/cytoperm solution (Becton-Dickinson, Grenoble, France) and finally labeled with an APC-conjugated anti-IFNγ (clone B27, IgG1; Becton Dickinson, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions.

Cell culture supernatants were harvested and stored at -20°C until analysis. Human TNFα, IFNγ and IL-12p70 concentrations were measured by ELISA with Ready-Set-Go kits (eBioscience, Montrouge, France) and samples were assayed in duplicate according to the manufacturer's instructions. Optical densities were measured in an ELISA plate-reader at 450nm wavelength. Results were expressed as the mean of duplicates in pg/ml.

Statistical methods

Mann Whitney or Wilcoxon tests were used when appropriate for comparisons between experimental groups or experiments. Analyses were performed using XLSTAT 2008 Software. For both tests, a p value of $p<0.05$ was considered as significant.

Results

MPA inhibited DC maturation induced by TNFα but not that induced by LPS

To compare the effects of MPA on the human DC maturation phenotype, immature monocyte-derived DC (DC) were stimulated with TNFα or LPS in the presence or absence of MPA. Bivariate plots of CD83 vs. CD25 and CD80 vs. CD86 expression showed that MPA reduced the up-regulation of the co-stimulation and maturation markers induced by TNFα (Fig.1A), whereas it had no effect on the expression of these markers upon LPS stimulation (Fig.1B). MPA significantly inhibited the Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD80, CD25, CD83 and CD86 (to about 15%, 25%, 29% and 24%, respectively) following TNFα stimulation ($p=0.008$; left panel of Fig.1C) whereas no modification of MFI was observed after LPS stimulation (right panel of Fig.1C). These findings suggest that TNFα and LPS use different pathways to induce DC maturation and that MPA preferentially affects the signaling pathways activated by TNFα.

MPA is an inhibitor of IMPDH, an enzyme involved in the *de novo* synthesis of guanosine nucleotides. Exogenous guanosine was therefore added during the maturation of MPA-treated DC induced by TNFα for 2 days. Interestingly, guanosine reversed the effect of MPA on the expression of maturation markers by restoring full DC maturation (Fig.1D).

MPA inhibited p38MAPK phosphorylation induced by TNFα more strongly than that induced by LPS

As the up-regulation of co-stimulation and maturation molecules could be dependent on MAPK, we first confirmed that the phosphorylation of p38MAPK was involved in DC maturation. DC were matured with TNFα or LPS in the presence of two concentrations of a specific p38MAPK inhibitor (SB203580). As shown in Table 1, DC maturation in the presence of SB203580 resulted in reduction in the expression of maturation markers induced by both stimuli. Indeed, with 20µM of SB203580, the expression of CD80, CD25, CD83 and CD86 was decreased to 33%, 53%, 36% and 27%, respectively, following TNFα stimulation, compared to 24%, 25%, 73% and 25% in LPS-activated DC.

Western blot remains the most usual method to detect protein phosphorylation, but requires a large number of cells; we therefore compared the sensitivity of this technique with flow cytometry. We showed that using flow cytometry was four times more sensitive than using

western blot to detect p38MAPK phosphorylation in LPS-treated DC at the phosphorylation peak (additional figure).

We then assessed the p38MAPK phosphorylation time courses induced by either TNFα or LPS (data not shown) in order to study the effects of MPA at the peak of phosphorylation (i.e. 5 and 15min, respectively). As shown in Fig.2A, we found that the addition of MPA inhibited p38MAPK phosphorylation (light gray histograms) after both stimuli at these time points. Importantly, the effects of MPA were significantly more pronounced following TNFα than following LPS stimulation (Fig.2B, decrease of 46% vs. 25%, p=0.027). In order to check whether the effects of MPA on DC phenotype were the consequence of its ability to inhibit p38MAPK activation, we determined a sub-optimal concentration of SB203580 that inhibited p38MAPK phosphorylation to the same extent as MPA (i.e. 46% for TNFα and 25% for LPS). Immature Mo-DC were stimulated with LPS or TNFα with increasing concentrations of SB203580, and p38MAPK phosphorylation was then measured. As shown in Fig.2C, 0.2µM SB203580 inhibited p38MAPK phosphorylation by 45% following TNFα stimulation whereas at 0.02µM it reduced the p38MAPK phosphorylation induced by LPS by 23%. Furthermore, in the presence of sub-optimal concentrations of SB203580, we demonstrated that the effects on the DC phenotype were similar to those induced by MPA for each stimulus (Fig.2D).

As exogenous guanosine antagonized the effect of MPA on the TNFα-induced DC phenotype (Fig.1D), p38MAPK phosphorylation was therefore studied in MPA-treated DC in the presence of guanosine following TNFα or LPS stimulation. Interestingly, guanosine did not restore p38MAPK phosphorylation in MPA-treated DC (Fig.2E).

In addition to p38MAPK, NF-κB activation also has an important role in DC maturation (Ardeshna et al., 2000; Arimilli et al., 2007; Buckland and Lombardi, 2009; Rescigno et al., 1998). We found that increasing concentrations of lactacystin, one inhibitor of the NF-κB pathway, preferentially inhibited the expression of maturation markers following LPS stimulation compared to TNFα (Table 2). Indeed, at 20µg/ml lactacystin inhibited the expression of CD80, CD25, CD83 and CD86 by about 86% following LPS stimulation, whereas expression was reduced by 43% or less following TNFα stimulation.

MPA inhibited phosphorylation of ERK1/2 induced by TNFα but not that induced by LPS

In contrast to p38MAPK, ERK1/2 is a MAPK involved in inhibition of DC maturation (Agrawal et al., 2003; Boggiatto et al., 2009; Puig-Kroger et al., 2001), we therefore studied

the effects of MPA on ERK1/2 phosphorylation in human Mo-DC. Interestingly, we found that MPA inhibited ERK1/2 phosphorylation induced by TNFα but not that induced by LPS at the phosphorylation peak (Fig.3A). Moreover, in contrast to TNFα, which induced short and transient ERK1/2 phosphorylation in DC, the LPS-induced ERK1/2 phosphorylation was strong and sustained (Fig.3B). Thus, LPS and TNFα seem to affect the ERK1/2 pathway differently.

The combination of PD98059 (an MEK1/2 inhibitor) and MPA during TNFα-activated maturation reversed the effects of MPA and induced full DC maturation, suggesting that p38MAPK inhibition by MPA predominated over its effect on ERK1/2 following TNFα stimulation (Fig.3C).

MPA inhibited inflammatory cytokines by both LPS and TNFα

In addition to phenotype maturation, the cytokine secretion profile also has an important role in DC functions (Alegre et al., 2007). The DC maturation induced by TNFα or LPS leads to the secretion of inflammatory cytokines such as TNFα and IL-12p70, and also pro-tolerogeneic cytokines such as IL-10 and TGFβ. Furthermore, several studies have demonstrated that IFNγ synthesis by mature DC is also involved in DC autocrine activation by increasing TNFα synthesis (Fricke et al., 2006). We therefore decided to analyze the production of these cytokines by Mo-DC after MPA treatment following LPS or TNFα stimulation. The addition of MPA resulted in a significant reduction in IL-12p70 (TNFα=72pg/mL ± 155 vs TNFα+MPA=48pg/mL ± 80; p=0.036) and IFNγ secretion (TNFα=116pg/mL ± 196 vs TNFα+MPA=24pg/mL ± 24; p<0.0001) following TNFα stimulation (left panel of Fig.4A). It also significantly decreased the secretion of IL-12p70 (LPS=671pg/mL ± 753 vs LPS+MPA=366pg/mL ± 378; p<0.0001), IFNγ (LPS=92pg/mL ± 119 vs LPS+MPA=29pg/mL ± 34; p=0.0002) and TNFα (LPS=2687pg/mL ± 1894 vs LPS+MPA=1278pg/mL ± 1029; p=0.002) following LPS stimulation (right panel of Fig.4A). In addition, double staining for DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Inter- cellular adhesion molecule-3 Grabbing Non-integrin) and intracytoplasmic IFNγ confirmed that this cytokine was truly produced by DC and that MPA reduced the percentage of intracellular IFNγ-positive cells after both TNFα and LPS stimulation (TNFα=65% vs TNFα+MPA=37%; LPS=70% vs LPS+MPA=47%) (Fig.4B). As ERK1/2 signaling has been reported to be involved in IL-10 and TGF-β production (Chandra and Naik, 2008; Dillon et al., 2006; Figueiredo et al., 2009; Luo et al., 2005), we studied the effects of MPA on the production of

these anti-inflammatory cytokines by DC, and found that MPA did not affect the secretion of IL-10 and TGF-β induced by either LPS or TNFα stimulation (data not shown).

The ability of MPA to inhibit IMPDH may be a pathway to this molecule that affect DC functions. Exogenous guanosine was therefore added during the maturation of MPA-treated DC induced by either TNFα or LPS, and the secretion of IL-12p70 and IFNγ was then determined. Importantly, we found that the effect of MPA on pro-inflammatory cytokine secretion was antagonized by bypassing the inhibition of IMPDH (Fig.4C).

We then investigated whether the inhibition of IFNγ synthesis induced by MPA may be due to its ability to inhibit p38MAPK phosphorylation. We first demonstrated that IFNγ secretion was partially dependent on p38MAPK activation by adding increasing concentrations of SB203580 during maturation (Fig.4D). DC were then matured with either TNFα or LPS in the presence of sub-optimal concentrations of SB203580, matching the p38MAPK phosphorylation inhibition level induced by MPA (0.2µM or 0.02µM, respectively). After TNFα stimulation, inhibition of MPA-induced IFNγ secretion was significantly more pronounced than that induced by SB203580 at 0.2µM (TNFα+MPA=26pg/mL vs TNFα+SB0.2µM=105pg/mL; p=0.016). In contrast, the inhibition of MPA-induced IFNγ production following LPS stimulation was similar to that induced by SB203580 at 0.02µM (LPS+MPA=42pg/mL vs LPS+SB0.02µM=24pg/mL; NS).

MPA inhibited the allostimulatory function of DC matured with TNFα or LPS equally

As MPA affected the DC phenotype induced by TNFα and LPS differently, we then evaluated the allostimulatory T cell activity of these MPA-treated DC using an MLR. As expected, fully matured DC (either TNFα or LPS) were potent stimulators of allogeneic T cell proliferation (Fig.5A). In contrast, MPA-treated DC induced significantly lower T cell proliferation (inhibition of 82% and 77%, respectively) (Fig.5A). Knowing that MPA had a direct action on lymphocytes, we first checked that MPA-treated DC did not release MPA into the supernatant during co-culture with $CD4^+$ T cells (Lagaraine et al., 2005). AnnexinV/7-AAD staining was also performed to check the viability of hyporesponsive $CD4^+$ T cells. We found no significant differences between the numbers of apoptotic and necrotic cells in MPA-treated DC-stimulated $CD4^+$ T cells compared to mature DC-cultured $CD4^+$ T cells (data not shown). Interestingly, the addition of exogenous guanosine during the maturation of MPA-treated DC did not reverse the ability of MPA-treated DC to reduce allogeneic T cell proliferation (Fig.5B).

We therefore investigated whether different cytokine expression by DC might account for the poor ability of MPA-treated DC to prime $CD4^+$ T cells. The role of IL-10 and TGF-β has already been reported in many models of T cell hyporesponsiveness (Chen et al., 2003; Park et al., 2004a; Zheng et al., 2004). We therefore used an anti-IL-10 antibody to block the IL-10 pathway and an anti-TGF-β1 antibody to inhibit TGF-β in the MLR. We found that blocking the IL-10 or the TGF-β pathway did not restore the proliferation of $CD4^+$ T cells stimulated with MPA-treated DC (Fig.5C). We also demonstrated that adding exogenous IL-2 during the co-culture of MPA-DC with allogeneic $CD4^+$ T cells restored their proliferation whereas the addition of exogenous IL-12 was without effect (Fig.5D).

Discussion

Immunosuppressive drugs have revolutionized organ transplantation and improved the therapeutic management of autoimmune diseases. The development of immunosuppressive drugs and understanding of their action has traditionally been focused on lymphocytes, but recent evidence indicates that these agents interfere with immune responses at the earliest stage, targeting key functions of DC (Hackstein and Thomson, 2004). The use of MPA in renal transplantation offers huge numbers of advantages because of its low nephrotoxocity (Sollinger et al., 1992) . Despite the fact that several other researchers have investigated the effects of MPA on DC (Colic et al., 2003; Dubsky et al., 2006; Lagaraine et al., 2005; Mehling et al., 2000), the main mechanism explaining its effects on human DC remains to be demonstrated.

In this study, we found that MPA had a suppressive effect on p38MAPK that might explain the decrease in ability of TNFα matured-DC, and to a lesser extent that of LPS matured-DC, since the signaling pathway used by LPS was quite different and more complex. Some of the functions of DC such as cytokine synthesis and allo-proliferation were thus affected, whereas the expression of maturation markers was only decreased in TNFα-treated DC. The purpose of this study was therefore to increase the understanding of the mechanisms of action of MPA that inhibit key DC functions.

MPA is an immunosuppressive drug that is currently used in clinical transplantation. Its main route of action is the inhibition of IMPDH on T cells which results in reduced incidence of graft rejection (Allison and Eugui, 2000). However, DC are also involved in this phenomenon, mainly through the secretion of inflammatory cytokines and their ability to

activate naïve T cells. Several studies have shown the action of MPA on these cells, but its mechanism of action remains to be explained (Colic et al., 2003; Dubsky et al., 2006; Lagaraine et al., 2005; Mehling et al., 2000).

There are some connections between the transduction pathways induced by LPS and TNFα since they both result in the activation of p38MAPK, ERK and NF-κB, all important molecules involved in the secretion of inflammatory cytokines and allostimulatory ability in DC. However these pathways are also clearly distinct. Indeed, MAPK and NF-κB are activated by TRAF6 following LPS stimulation and by TRAF2 following TNFα. Moreover, LPS can stimulate these molecules by a Myd88-dependent pathway as well as an independent one (Akira and Takeda, 2004), whereas TNFα has only one known pathway through the TRADD/TRAF2/RIP1/ASK1 complex (Bradley, 2008).

NF-κB family members (p65/RelA, c-Rel, RelB, p100/p52, p105/p50, inhibitory IκB- α -β, -ε, - γ , and -ζ and BCL3) are pivotal for the expression of immunity genes, regulation of apoptosis, cancer biology, and development. There are many pathways that can lead to different NF-κB activation. The classical (canonical) pathway involves the activation of IKKα/β by TAK1, subsequent phosphorylation and degradation of IκBα, and release of p65/p50 from the cytoplasm into the nucleus. The classical pathway is responsible for the induction of numerous cytokines and chemokines (Kawai and Akira, 2007). In order to analyze the role of NF-κB induced by both stimuli in this process, we used lactacystin, a highly specific and irreversible proteasome inhibitor (Dick et al., 1996), which is well known to inhibit NF-κB translocation and IκB degradation in different models, especially in DC (Cui et al., 1997; Neves et al., 2009) . We found more marked inhibition of maturation molecule expression after LPS compared to TNFα, suggesting that the induction of a mature phenotype is mainly control by NF-κB through a TLR4 pathway rather than a TNF-R pathway.

p38MAPK is also an important kinase which controls a wide range of cellular functions (Aiba et al., 2003; Arrighi et al., 2001; Hoarau et al., 2006; Nakagawa et al., 2004) by activating other proteins of the MKK family even in unconventional ways (Zaru et al., 2007) . In our case, we used SB203580 that inhibited only p38MAPK α and β (Cuenda et al., 1995; Kumar et al., 1997; Lee et al., 1994) whereas our antibody recognized the conserved dual phosphorylated site of p38MAPK α, β, γ, δ. It would have been interesting to evaluate the p38MAPK γ phosphorylation in these maturation pathways. We showed that this pathway was predominant for the TNFα–induced phenotype maturation whereas it seemed to be minor following LPS stimulation. Interestingly, we found that MPA induced similar phenotype modifications to those of suboptimal concentrations of SB203580, inhibiting p38MAPK to

the same extent as MPA for each stimulus. Similarly, a study by Arrighi et al (Arrighi et al., 2001) reported that a low concentration of SB203580 had no impact on phenotype maturation induced by LPS. This suggests that the effects of MPA on surface marker expression are mediated by its inhibition of p38MAPK.

ERK is another MAPK involved in the DC maturation process (Agrawal et al., 2003; Puig-Kroger et al., 2001). We then showed that LPS and TNFα affected such phosphorylation differently, both in its intensity and duration. We subsequently found that MPA reduced the ERK1/2 phosphorylation induced by TNFα but not that induced by LPS. At first sight, this result appears paradoxical since the use of an ERK1/2-specific inhibitor up-regulates DC maturation (Agrawal et al., 2003; Puig-Kroger et al., 2001), although we have previously shown that MPA inhibits TNFα-induced phenotype maturation. These results therefore suggest that inhibition of ERK1/2 phosphorylation by MPA is of minor importance. Furthermore, MPA did not affect ERK1/2 phosphorylation under conditions of weak p38MAPK inhibition by MPA (as upon LPS stimulation). Taken together, these findings suggest that the effects of MPA observed on TNFα-induced ERK1/2 phosphorylation are more probably a consequence of p38MAPK inhibition. Based on our present study and on other reports (Ha et al., 2006; Park et al., 2004b) , ERK1/2 might not be a primary target of MPA.

Among the properties of DC, cytokine synthesis seems to be one of the most important for the initiation of the immune response. Both TNFα and LPS maturation of DC lead to pro-inflammatory cytokine synthesis (Lagaraine et al., 2005; Rescigno et al., 1998). In our model, it seems that IL-12p70 was only half reduced by MPA, whatever the agent used. We observed only 46% decrease in p38MAPK phosphorylation for TNFα stimulation and 25% for LPS. This could mean that the effects of MPA are not strong enough to stop the entire p38MAPK signal since the SB203580 inhibitor used in the same range as MPA provided the same result whereas a higher concentration of SB203580 reduced this secretion to an unstimulated DC level (Nakahara et al., 2004). On the other hand, the cytokine remaining may also be due to other pathways such as NF-κB (Zhou et al., 2006). However, the most relevant impact of MPA was on IFNγ synthesis in both cases (50% and 60% decrease for TNFα and LPS, respectively) since this cytokine, which is known to have a crucial role in the control of pathogens and in the development of effective adaptive host immune responses (Schroder et al., 2004), has recently been described in DC (Fricke et al., 2006; Fukao et al., 2000). The decrease in IFNγ synthesis by MPA may be due to its effect on p38MAPK since Fukao et al

reported that its production is dependent on p38MAPK phosphorylation (Fukao et al., 2000), confirmed in T cells from dominant p38MAPK negative mice (Rincon et al., 1998) .

In addition to inflammatory cytokine secretion, T cell stimulatory ability is also a crucial function of DC in the induction of immune responses. An initial study showed that MPA was not released during co-culture (Lagaraine et al., 2005), and we did not obtain any T cell expansion (Colic et al., 2003; Dubsky et al., 2006; Lagaraine et al., 2005) in either maturation condition. Interestingly, although MPA-treated DC stimulated with LPS had a fully mature phenotype, they did not support the proliferation of allogeneic CD4+ T cells, suggesting that down-regulation of co-stimulatory molecules (CD80, CD86) was not essential in conferring weak priming ability on DC. We may assume that either DC are not able to understand signals from T lymphocytes or DC are not able to give the correct signal to T lymphocytes through cytokine synthesis or a molecule on the surface. Given that MPA reduced the synthesis of pro-inflammatory cytokines, this would suggest that this property might be predominant in reducing the allo-stimulatory ability of DC. Similar results have been reported with FK506-treated DC (Tiefenthaler et al., 2004). Interestingly, the secretion of IL-10 and TGF-β and the decrease in IL-12 did not seem to be involved in this phenomenon since the presence of blocking antibodies or their addition, respectively, did not reverse the low T cell expansion. In contrast, the addition of IL-2 to the medium allowed T cells to proliferate. Moreover, some of our results (Mnasria et al., 2008) have shown that DC could be a source of IL-2, and Granucci et al showed that IL2-/- mice DC have a low ability to induce allogeneic CD4 T-cell proliferation (Granucci et al., 2001). MPA may therefore interfere with IL-2 production in DC which may be necessary for synthesis of another cytokine involved in T cell proliferation.

The mechanism of action of MPA in T cells is the inhibition of IMPDH resulting in depletion of guanosine nucleotides. We therefore investigated this pathway in DC. Interestingly, the addition of guanosine antagonized the effect of MPA on inflammatory cytokine secretion related to both stimulation and maturation marker expression after TNFα activation. In contrast, no effect of exogenous guanosine was observed on p38MAPK phosphorylation or on allogeneic T cell proliferation as previously described after both types of stimulation (Lagaraine et al., 2005). Only one study reported that MPA decreased IMPDH activity in DC (Dubsky et al., 2006) and that this reduction was involved in the low allostimulatory ability of MPA-treated DC, in contrast to our findings. However, in their model exogenous guanosine and MPA were added early, i.e. from the differentiation stage. This extended presence of guanosine may increase sensitivity to DC maturation. Moreover, in rat mesangial cells, the

addition of guanosine only partially reversed the inhibition of p38MAPK phosphorylation induced by MPA after PDGF stimulation (Ha et al., 2006), suggesting that the inhibitory role of MPA on IMPDH is not the only mechanism of action of MPA in DC.

MPA is currently used for prophylaxis of acute rejection in organ transplants, especially renal transplants, in combination with calcineurin inhibitors and corticosteroids. Its use in clinical practice has increased in the past few years since the confirmation of its efficacy and the possibility of reducing or suspending calcineurin inhibitors, thus contributing to reduction of adverse effects. However, several studies have appeared to show that MPA could increase the risk of cytomegalovirus infection (Song et al., 2006) as well as acute pyelonephritis in transplanted patients (Kamath et al., 2006). The ability of MPA to inhibit LPS-treated DC may therefore be involved in the increase in infectious disease in MPA-treated patients. On the other hand, several studies have reported that TLR activation could avert the induction of skin or heart allograft tolerance (Chen et al., 2006; Thornley et al., 2007), suggesting that MPA may also be involved in protection against the break tolerance in transplanted patients through its ability to inhibit the function of LPS-treated DC. In conclusion, our findings suggest that the impact of MPA on DC maturation is influenced by the DC microenvironment.

Acknowledgements

We thank Prof. David Hedley, director of the Laboratory of Medicine, Pathobiology and Medical Biophysics at the University of Toronto for accepting DF in his laboratory to study detection of phosphoproteins by flow cytometry, and Sue Chow for her valuable advice and Dr Sophie Tesseraud, INRA-Nouzilly, for assistance with western blot.

The authors would like to thank the Etablissement Français du Sang du centre Atlantique of Tours for providing blood samples and Doreen Raine for editing the English language. This work is part of two PhD theses (DF and RL). The study reported in this paper was supported by Roche Inc., the European Society of Organ Transplantation (ESOT) and François Rabelais University of Tours.

References

Agrawal S., Agrawal A., Doughty B., Gerwitz A., Blenis J., Van Dyke T. and Pulendran B. (2003) Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* **171**, 4984-9.

Aiba S., Manome H., Nakagawa S., Mollah Z. U., Mizuashi M., Ohtani T., Yoshino Y. and Tagami H. (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* **120**, 390-9.

Akira S. and Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511.

Alegre M. L., Florquin S. and Goldman M. (2007) Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. *Curr Opin Immunol* **19**, 563-8.

Allison A. C. and Eugui E. M. (2000) Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* **47**, 85-118.

Ardeshna K. M., Pizzey A. R., Devereux S. and Khwaja A. (2000) The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **96**, 1039-46.

Arimilli S., Johnson J. B., Alexander-Miller M. A. and Parks G. D. (2007) TLR-4 and -6 agonists reverse apoptosis and promote maturation of simian virus 5-infected human dendritic cells through NFkB-dependent pathways. *Virology* **365**, 144-56.

Arrighi J. F., Rebsamen M., Rousset F., Kindler V. and Hauser C. (2001) A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* **166**, 3837-45.

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y. J., Pulendran B. and Palucka K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.

Banchereau J. and Steinman R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-52.

Boggiatto P. M., Jie F., Ghosh M., Gibson-Corley K. N., Ramer-Tait A. E., Jones D. E. and Petersen C. A. (2009) Altered dendritic cell phenotype in response to Leishmania amazonensis amastigote infection is mediated by MAP kinase, ERK. *Am J Pathol* **174**, 1818-26.

Bradley J. R. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* **214**, 149-60.

Buckland M. and Lombardi G. (2009) Aspirin and the induction of tolerance by dendritic cells. *Handb Exp Pharmacol*, 197-213.

Bunyard P., Handley M., Pollara G., Rutault K., Wood I., Chaudry M., Alderman C., Foreman J., Katz D. R. and Chain B. M. (2003) Ribotoxic stress activates p38 and JNK kinases and modulates the antigen-presenting activity of dendritic cells. *Mol Immunol* **39**, 815-27.

Chandra D. and Naik S. (2008) Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol* **154**, 224-34.

Chen L., Wang T., Zhou P., Ma L., Yin D., Shen J., Molinero L., Nozaki T., Phillips T., Uematsu S., Akira S., Wang C. R., Fairchild R. L., Alegre M. L. and Chong A. (2006) TLR engagement prevents transplantation tolerance. *Am J Transplant* **6**, 2282-91.

Chen Z. M., O'Shaughnessy M. J., Gramaglia I., Panoskaltsis-Mortari A., Murphy W. J., Narula S., Roncarolo M. G. and Blazar B. R. (2003) IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function. *Blood* **101**, 5076-83.

Chow S., Hedley D., Grom P., Magari R., Jacobberger J. W. and Shankey T. V. (2005) Whole blood fixation and permeabilization protocol with red blood cell lysis for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations. *Cytometry A* **67**, 4-17.

Colic M., Stojic-Vukanic Z., Pavlovic B., Jandric D. and Stefanoska I. (2003) Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **134**, 63-9.

Cuenda A., Rouse J., Doza Y. N., Meier R., Cohen P., Gallagher T. F., Young P. R. and Lee J. C. (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* **364**, 229-33.

Cui H., Matsui K., Omura S., Schauer S. L., Matulka R. A., Sonenshein G. E. and Ju S. T. (1997) Proteasome regulation of activation-induced T cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7515-20.

Dick L. R., Cruikshank A. A., Grenier L., Melandri F. D., Nunes S. L. and Stein R. L. (1996) Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* **271**, 7273-6.

Dillon S., Agrawal S., Banerjee K., Letterio J., Denning T. L., Oswald-Richter K., Kasprowicz D. J., Kellar K., Pare J., van Dyke T., Ziegler S., Unutmaz D. and Pulendran B. (2006) Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* **116**, 916-28.

Dubsky P. C., Friedl J., Stift A., Bachleitner-Hofmann T., Jakesz R., Gnant M. F. and Weigel G. (2006) Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibition by mycophenolic acid impairs maturation and function of dendritic cells. *Clin Chim Acta* **364**, 139-47.

Figueiredo A. S., Hofer T., Klotz C., Sers C., Hartmann S., Lucius R. and Hammerstein P. (2009) Modelling and simulating interleukin-10 production and regulation by macrophages after stimulation with an immunomodulator of parasitic nematodes. *Febs J*.

Fricke I., Mitchell D., Mittelstadt J., Lehan N., Heine H., Goldmann T., Bohle A. and Brandau S. (2006) Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* **176**, 5173-82.

Fukao T., Matsuda S. and Koyasu S. (2000) Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol* **164**, 64-71.

Fulton B. and Markham A. (1996) Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* **51**, 278-98.

Granucci F., Vizzardelli C., Pavelka N., Feau S., Persico M., Virzi E., Rescigno M., Moro G. and Ricciardi-Castagnoli P. (2001) Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* **2**, 882-8.

Ha H., Kim M. S., Park J., Huh J. Y., Huh K. H., Ahn H. J. and Kim Y. S. (2006) Mycophenolic acid inhibits mesangial cell activation through p38 MAPK inhibition. *Life Sci* **79**, 1561-7.

Hackstein H. and Thomson A. W. (2004) Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* **4**, 24-34.

Hawiger D., Inaba K., Dorsett Y., Guo M., Mahnke K., Rivera M., Ravetch J. V., Steinman R. M. and Nussenzweig M. C. (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* **194**, 769-79.

Hoarau C., Lagaraine C., Martin L., Velge-Roussel F. and Lebranchu Y. (2006) Supernatant of Bifidobacterium breve induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 696-702.

Hoarau C., Martin L., Faugaret D., Baron C., Dauba A., Aubert-Jacquin C., Velge-Roussel F. and Lebranchu Y. (2008) Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS ONE* **3**, e2753.

Kalinski P., Smits H. H., Schuitemaker J. H., Vieira P. L., van Eijk M., de Jong E. C., Wierenga E. A. and Kapsenberg M. L. (2000) IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J Immunol* **165**, 1877-81.

Kamath N. S., John G. T., Neelakantan N., Kirubakaran M. G. and Jacob C. K. (2006) Acute graft pyelonephritis following renal transplantation. *Transpl Infect Dis* **8**, 140-7.

Kawai T. and Akira S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**, 460-9.

Kumar S., McDonnell P. C., Gum R. J., Hand A. T., Lee J. C. and Young P. R. (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 533-8.

Lagaraine C., Hoarau C., Chabot V., Velge-Roussel F. and Lebranchu Y. (2005) Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. *Int Immunol* **17**, 351-63.

Lagaraine C., Lemoine R., Baron C., Nivet H., Velge-Roussel F. and Lebranchu Y. (2008) Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J Leukoc Biol* **84**, 1057-64.

Lee J. C., Laydon J. T., McDonnell P. C., Gallagher T. F., Kumar S., Green D., McNulty D., Blumenthal M. J., Heys J. R., Landvatter S. W. and et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739-46.

Luo X., Liu L., Tang N., Lu K. Q., McCormick T. S., Kang K. and Cooper K. D. (2005) Inhibition of monocyte-derived dendritic cell differentiation and interleukin-12 production by complement iC3b via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Exp Dermatol* **14**, 303-10.

Lutz M. B., Suri R. M., Niimi M., Ogilvie A. L., Kukutsch 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**, 1813-22.

Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A. H. and Jonuleit H. (2002) Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80**, 477-83.

Mehling A., Grabbe S., Voskort M., Schwarz T., Luger T. A. and Beissert S. (2000) Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol* **165**, 2374-81.

Mele T. S. and Halloran P. F. (2000) The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology* **47**, 215-45.

Mnasria K., Lagaraine C., Velge-Roussel F., Oueslati R., Lebranchu Y. and Baron C. (2008) Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* **84**, 460-7.

Nakagawa S., Ohtani T., Mizuashi M., Mollah Z. U., Ito Y., Tagami H. and Aiba S. (2004) p38 Mitogen-Activated protein kinase mediates dual role of ultraviolet B radiation in induction of maturation and apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol* **123**, 361-70.

Nakahara T., Uchi H., Urabe K., Chen Q., Furue M. and Moroi Y. (2004) Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* **16**, 1701-9.

Neves B. M., Cruz M. T., Francisco V., Garcia-Rodriguez C., Silvestre R., Cordeiro-da-Silva A., Dinis A. M., Batista M. T., Duarte C. B. and Lopes M. C. (2009) Differential roles of PI3-Kinase, MAPKs and NF-kappaB on the manipulation of dendritic cell T(h)1/T(h)2 cytokine/chemokine polarizing profile. *Mol Immunol* **46**, 2481-92.

Park H. B., Paik D. J., Jang E., Hong S. and Youn J. (2004a) Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells. *Int Immunol* **16**, 1203-13.

Park J., Ha H., Seo J., Kim M. S., Kim H. J., Huh K. H., Park K. and Kim Y. S. (2004b) Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Transplant* **4**, 1982-90.

Puig-Kroger A., Relloso M., Fernandez-Capetillo O., Zubiaga A., Silva A., Bernabeu C. and Corbi A. L. (2001) Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* **98**, 2175-82.

Pulendran B., Kumar P., Cutler C. W., Mohamadzadeh M., Van Dyke T. and Banchereau J. (2001) Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* **167**, 5067-76.

Rescigno M., Martino M., Sutherland C. L., Gold M. R. and Ricciardi-Castagnoli P. (1998) Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* **188**, 2175-80.

Rincon M., Enslen H., Raingeaud J., Recht M., Zapton T., Su M. S., Penix L. A., Davis R. J. and Flavell R. A. (1998) Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J* **17**, 2817-29.

Rossi M. and Young J. W. (2005) Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* **175**, 1373-81.

Sato K., Nagayama H., Tadokoro K., Juji T. and Takahashi T. A. (1999) Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **162**, 3865-72.

Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T. and Hume D. A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163-89.

Sintchak M. D., Fleming M. A., Futer O., Raybuck S. A., Chambers S. P., Caron P. R., Murcko M. A. and Wilson K. P. (1996) Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell* **85**, 921-30.

Sollinger H. W., Belzer F. O., Deierhoi M. H., Diethelm A. G., Gonwa T. A., Kauffman R. S., Klintmalm G. B., McDiarmid S. V., Roberts J., Rosenthal J. T. and et al. (1992) RS-61443 (mycophenolate mofetil). A multicenter study for refractory kidney transplant rejection. *Ann Surg* **216**, 513-8; discussion 518-9.

Song A. T., Abdala E., Bonazzi P. R., Bacchella T. and Machado M. C. (2006) Does mycophenolate mofetil increase the risk of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients?--A mini-review. *Braz J Infect Dis* **10**, 132-8.

Steinman R. M., Hawiger D. and Nussenzweig M. C. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711.

Thornley T. B., Phillips N. E., Beaudette-Zlatanova B. C., Markees T. G., Bahl K., Brehm M. A., Shultz L. D., Kurt-Jones E. A., Mordes J. P., Welsh R. M., Rossini A. A. and Greiner D. L. (2007) Type 1 IFN mediates cross-talk between innate and adaptive immunity that abrogates transplantation tolerance. *J Immunol* **179**, 6620-9.

Tiefenthaler M., Hofer S., Ebner S., Ivarsson L., Neyer S., Herold M., Mayer G., Fritsch P. and Heufler C. (2004) In vitro treatment of dendritic cells with tacrolimus: impaired T-cell activation and IP-10 expression. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 553-60.

Zaru R., Ronkina N., Gaestel M., Arthur J. S. and Watts C. (2007) The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nat Immunol* **8**, 1227-35.

Zheng S. G., Wang J. H., Gray J. D., Soucier H. and Horwitz D. A. (2004) Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* **172**, 5213-21.

Zhou L. F., Zhang M. S., Yin K. S., Ji Y., Xie W. P., Cui X. F. and Ji X. H. (2006) Effects of adenoviral gene transfer of mutated IkappaBalpha, a novel inhibitor of NF-kappaB, on human monocyte-derived dendritic cells. *Acta Pharmacol Sin* **27**, 609-16.

Tables

Cell surface markers	% of positive cells TNFα-DC	+ SB 20 µM	% inhibition	% of positive cells LPS-DC	+ SB 20 µM	% inhibition
CD80	81,9 ± 13 (93,4-64)	55 ± 25 (79,3-23)	**33***	94 ± 2 (96-91)	71,5 ± 22 (91-49)	**24***
CD25	68,4 ± 23 (98-42)	32,4 ± 21 (43,8-0,7)	**52,7***	95 ± 1 (96-93)	71,5 ± 12 (81-54)	**25***
CD83	81,1 ± 20 (90-53)	51,8 ± 27 (90-29)	**36***	79,25 ± 22 (97-48,4)	21,25 ± 17 (36-7)	**73,2***
CD86	85 ± 15 (98-64)	62,4 ± 25 (87-37)	**26,6***	95,6 ± 1 (96-94)	71,4 ± 10 (84-62)	**25,3***

Table 1: SB203580 inhibits the expression of maturation markers in mature DC

On day 5, immature Mo-DCs were stimulated by TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml) with 20 µM of SB203580 for 2 days. Percentages of positive cells were determined by flow cytometry and used to calculate the percentage of inhibition as (100 – (percentage of positive SB203580-treated DC/ percentage of positive TNFα- or LPS- activated DC)). The results are expressed as mean ± SD of 4 independent experiments. * $p<0.05$, (-) = range % of positive cells.

Cell surface markers	% of positive cells TNFα-DC	+ Lac 20 µM	% inhibition	% of positive cells LPS-DC	+ Lac 20 µM	% inhibition
CD80	88.1 ± 14 (99-71)	56 ± 14 (74-44)	**36***	94 ± 2 (96-91)	14.5 ± 12 (91-49)	**85***
CD25	81 ± 8 (90-73)	46.4 ± 15 (67-31)	**44***	93 ± 1 (96-91)	19.4 ± 14 (81-54)	**80***
CD83	75.3 ± 21 (94-47)	40 ± 23 (67-10)	**47***	87 ± 7 (94-77)	10.5 ± 14 (36-7)	**88***
CD86	80 ± 5 (86-73)	48 ± 19 (75-31)	**40***	93.5 ± 1 (96-90)	18 ± 13 (84-62)	**80***

Table 2: Lactacystin inhibits the expression of maturation markers in mature DC

On day 5, immature Mo-DCs were stimulated by TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml) with 20µg/ml of lactacystin (Lac) for 2 days. Percentages of positive cells were determined by flow cytometry and used to calculate the percentage of inhibition as (100 – (percentage of positive lactacystin-treated DC/ percentage of positive TNFα- or LPS- activated DC)). The results are expressed as mean ± SD of 4 independent experiments. * $p<0.05$, (-) = range % of positive cells.

Figures

Figure 1

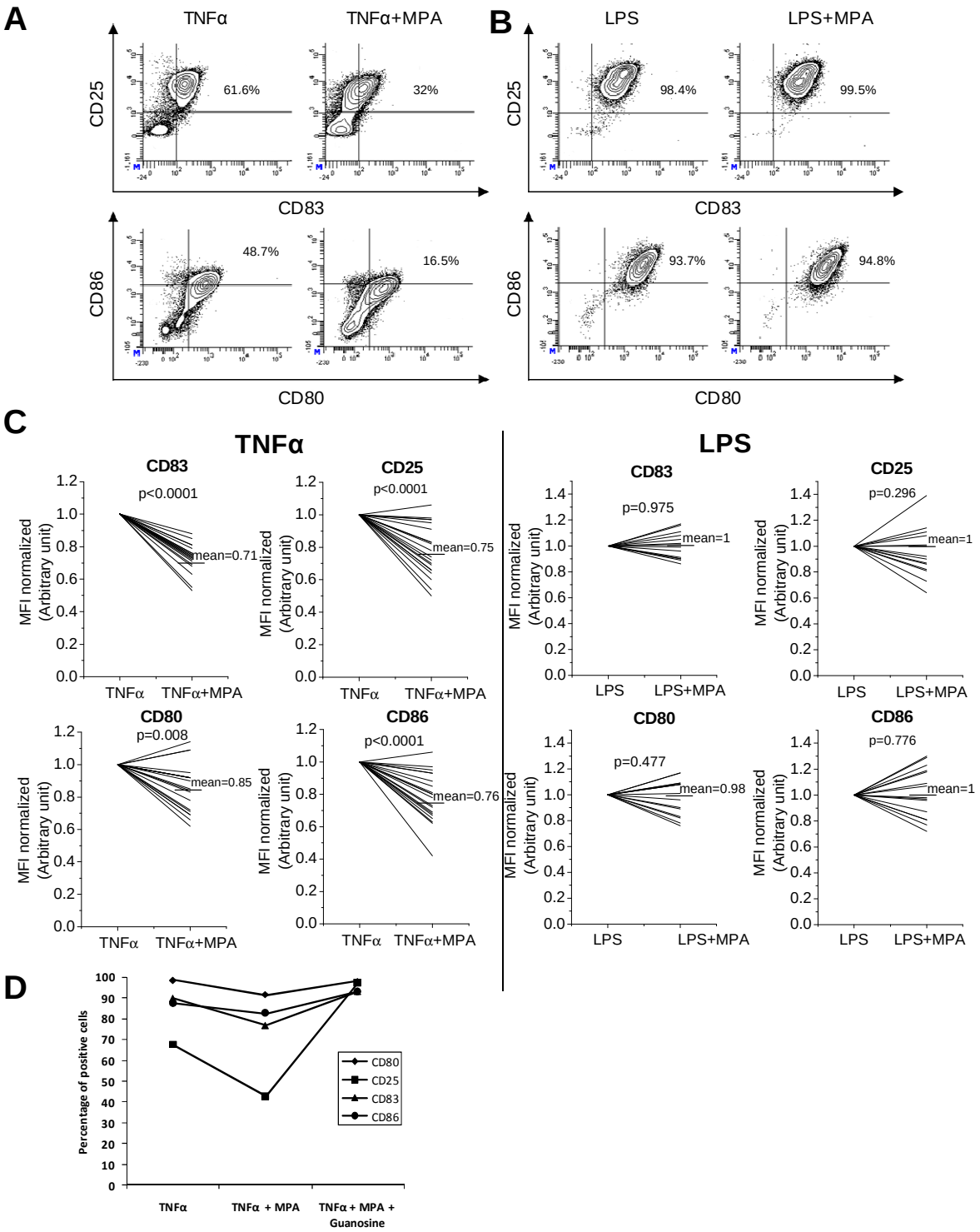


Figure 1: MPA inhibited full mature DC phenotype induced by TNFα but not that induced by LPS

On day 5, Mo-DC were stimulated with TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml) with and without MPA (100µM) for 2 days. Upper panels show bivariate dot plots of CD83 vs. CD25 and CD80 vs. CD86 and response to MPA treatment after stimulation with TNFα (panel A) or LPS (panel B). (Results of A and B are representative of fifteen independent experiments). C) MFI for each co-stimulation and maturation marker was measured by flow cytometry then normalized. Index 1 corresponds to the MFI obtained with DC stimulated with TNFα or LPS as indicated in the figure. The bars represent the means. Wilcoxon test was used to calculate statistical differences between groups. The p value is indicated on each histogram and significance corresponds to $p<0.05$. D) On day 5, Mo-DC were stimulated with TNFα (20ng/ml) with and without MPA (100µM) in the presence or absence of exogenous guanosine (25µM) for 2 days. Results are expressed as the percentage of positive cells of CD83, CD80, CD86 or CD25 markers. One experiment representative of five is presented.

Figure 2

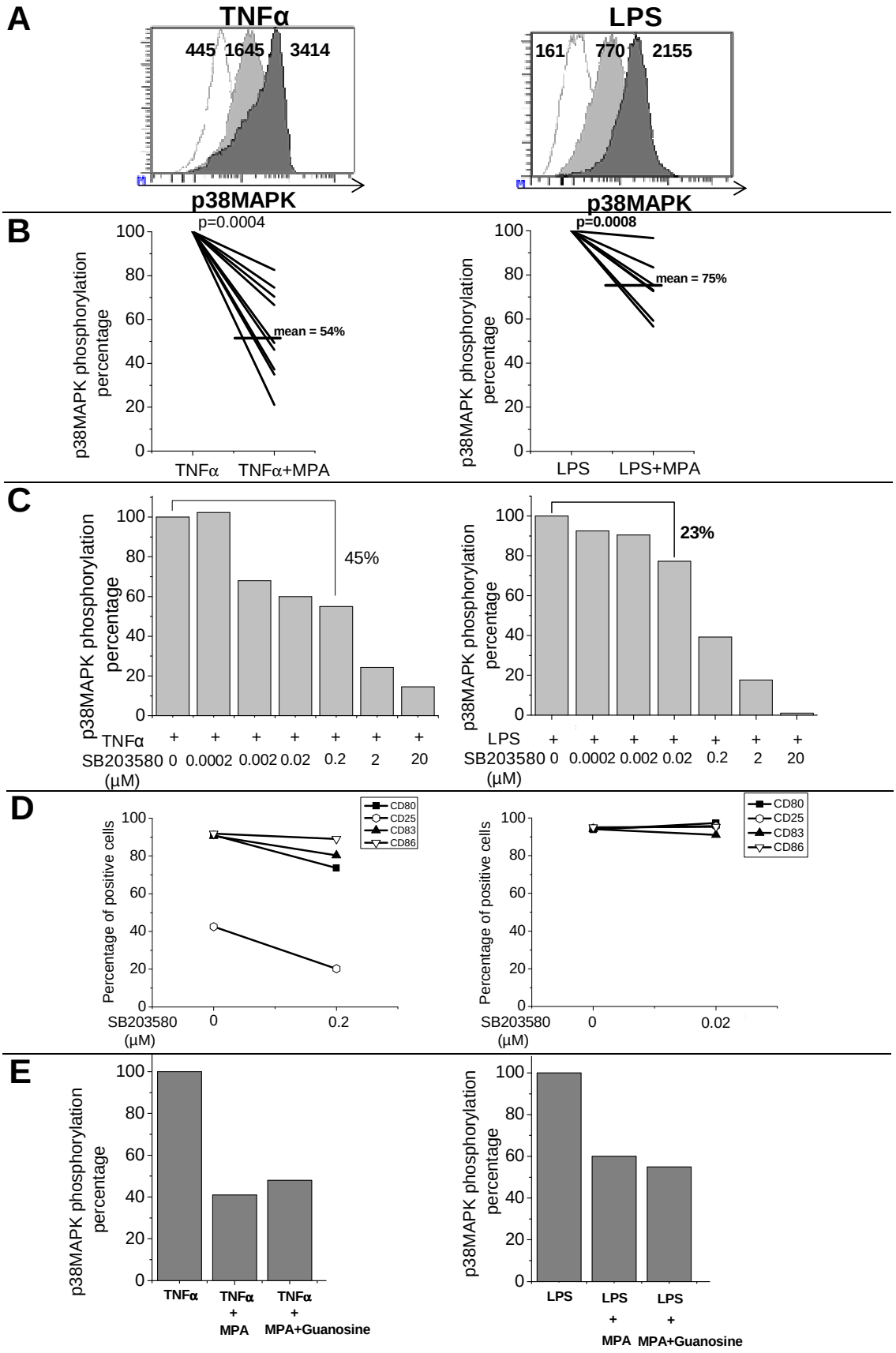

A
TNFα
445 1645 3414
p38MAPK
LPS
161 770 2155
p38MAPK
B
p=0.0004
mean = 54%
p38MAPK phosphorylation percentage
TNFα TNFα+MPA
p=0.0008
mean = 75%
LPS LPS+MPA
C
45%
23%
TNFα + + + + + + +
LPS + + + + + + +
SB203580 (μM) 0 0.0002 0.002 0.02 0.2 2 20
D
CD80
CD25
CD83
CD86
Percentage of positive cells
SB203580 (μM) 0 0.2
SB203580 (μM) 0 0.02
E
TNFα
TNFα + MPA
TNFα + MPA+Guanosine
LPS
LPS + MPA
LPS + MPA+Guanosine

Figure 2: The inhibition of p38MAPK phosphorylation by MPA explained its effect on full DC phenotype

A) Immature Mo-DC were incubated with and without MPA for 30min then stimulated with TNFα or LPS at the peak of phosphorylation (5min and 15min, respectively), and p38MAPK phosphorylation was detected by flow cytometry. The white histogram corresponds to the isotype, the gray histogram and the black histogram represent the p38MAPK phosphorylation in MPA-treated DC and in mature DC. MFIs of one experiment representative of six are presented. B) p38MAPK phosphorylation was expressed as (phospho-p38MAPK MFI-stimulated DC / isotype MFI-stimulated DC) - (phospho-p38MAPK MFI non-stimulated DC / isotype MFI non-stimulated DC). Index 100 corresponds to the p38MAPK phosphorylation obtained by DC stimulated with TNFα or LPS. The bars represent the means. Statistical analysis was performed using a Wilcoxon test. The p value is indicated on each histogram and significance corresponds to $p<0.05$. C) Immature Mo-DC were incubated with increasing concentrations of SB203580 for 30min then stimulated with TNFα or LPS at the peak of phosphorylation. Results are expressed as in panel B. Gray histograms show percentages of p38MAPK phosphorylation induced by TNFα or LPS. D) Immature Mo-DC were matured with TNFα or LPS for 2 days with and without sub-optimal concentrations of SB203580, corresponding to inhibition of MPA p38MAPK phosphorylation (0.2µM or 0.02µM, respectively). Graphs represent the percentage of positive cells for maturation markers detected by flow cytometry. (B, D) One experiment representative of three is presented. E) Immature Mo-DC were incubated with and without guanosine (100µM) for 60min then with and without MPA for 30min and finally stimulated with TNFα or LPS at the peak of phosphorylation. Results are expressed as in panel B. Gray histograms show percentages of p38MAPK phosphorylation induced by TNFα or LPS. One experiment representative of two is presented.

Figure 3

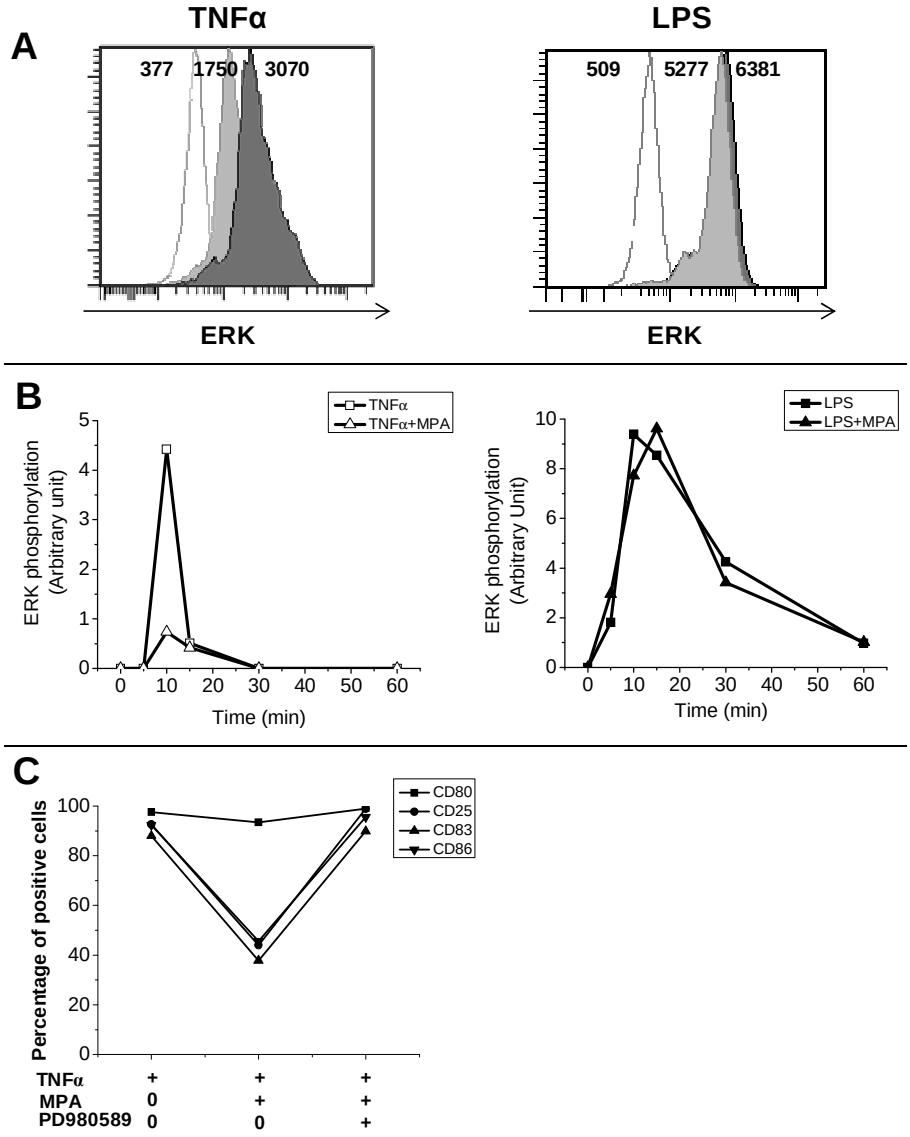


Figure 3: MPA inhibited ERK1/2 phosphorylation induced by TNFα but not that induced by LPS

A) On day 5, immature Mo-DC were stimulated with TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml) with and without MPA (100µM) at the peak of phosphorylation (10 and 15min, respectively). The detection of ERK1/2 phosphorylation was performed by flow cytometry. The white histogram corresponds to the isotype and the gray histogram and the black histogram represent the ERK phosphorylation in MPA-treated DC and in mature DC, respectively, for each stimulus. MFIs of one experiment representative of three are presented. B) On day 5, immature Mo-DC were stimulated with TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml) with and without MPA (100µM) for 5, 10, 15, 30 or 60min. Graphs represent ERK1/2 phosphorylation detected by flow cytometry. ERK1/2 phosphorylation corresponds to (phospho-ERK1/2 MFI-stimulated DC / unstained MFI-stimulated DC) - (phospho-ERK1/2 MFI non-stimulated DC / unstained MFI non-stimulated DC). C) Immature Mo-DC were stimulated with TNFα in the presence or absence of MPA and with and without PD98059 (25µM) for 2 days. Results are expressed as the percentage of positive cells of CD83, CD80, CD86 or CD25 markers. One experiment representative of three is presented.

Figure 4

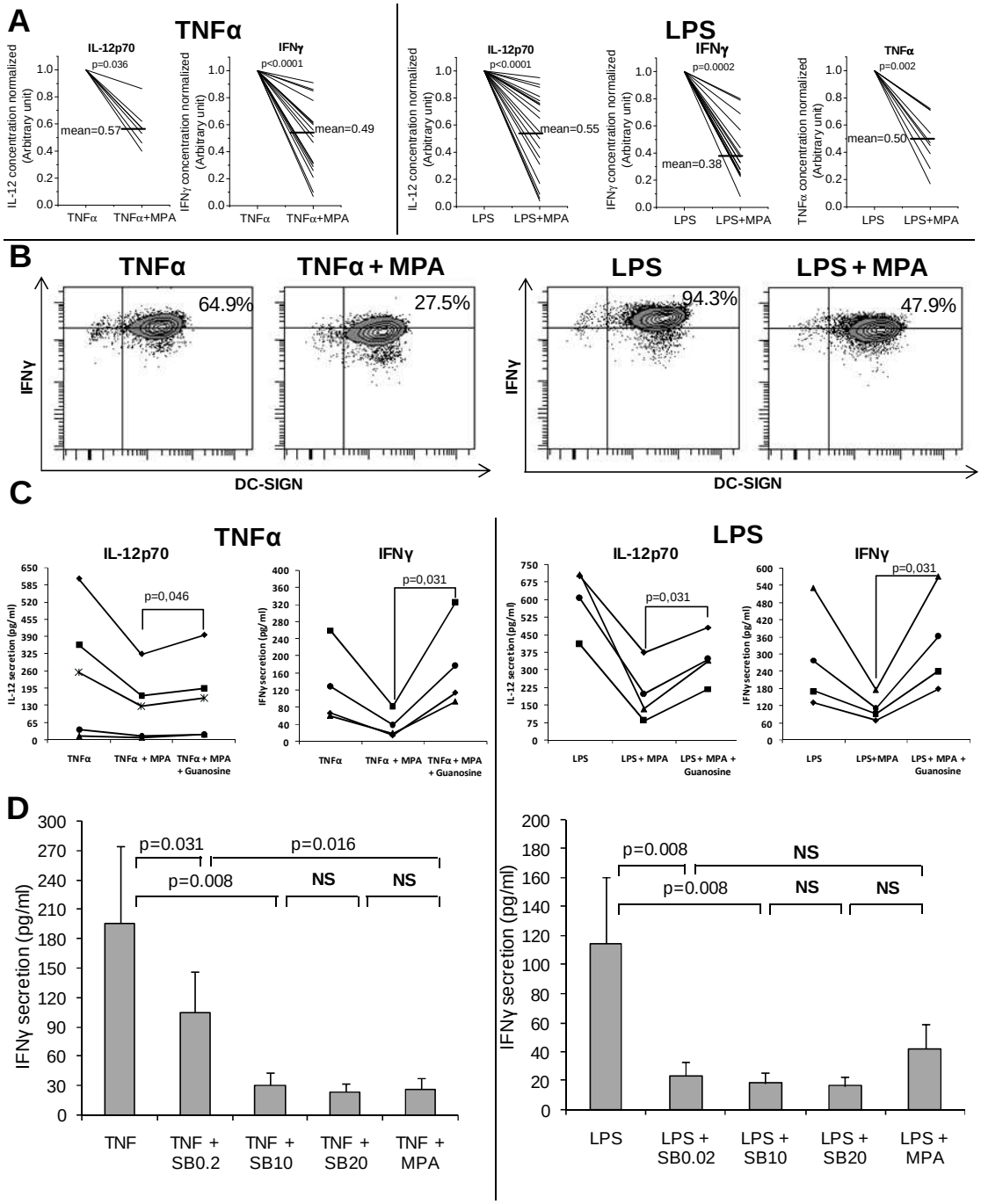

A
TNFα
LPS
IL-12p70
IFNγ
TNFα
IL-12 concentration normalized (Arbitrary unit)
IFNγ concentration normalized (Arbitrary unit)
TNFα concentration normalized (Arbitrary unit)
p=0.036
p<0.0001
p<0.0001
p=0.0002
p=0.002
mean=0.57
mean=0.49
mean=0.55
mean=0.38
mean=0.50
TNFα
TNFα+MPA
LPS
LPS+MPA
B
TNFα
TNFα + MPA
LPS
LPS + MPA
64.9%
27.5%
94.3%
47.9%
IFNγ
DC-SIGN
C
TNFα
LPS
IL-12p70
IFNγ
IL-12 secretion (pg/ml)
IFNγ secretion (pg/ml)
p=0,046
p=0,031
p=0,031
p=0,031
TNFα
TNFα + MPA
TNFα + MPA + Guanosine
LPS
LPS + MPA
LPS + MPA + Guanosine
LPS+MPA
D
IFNγ secretion (pg/ml)
p=0.031
p=0.016
p=0.008
NS
NS
p=0.008
NS
NS
TNF
TNF + SB0.2
TNF + SB10
TNF + SB20
TNF + MPA
LPS
LPS + SB0.02
LPS + SB10
LPS + SB20
LPS + MPA

Figure 4: MPA inhibited the secretion of pro-inflammatory cytokines induced by either TNFα or LPS

A) Mo- DC were matured for the last 48 hours of culture with TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml) in the presence or absence of MPA (100µM). IL-12p70, TNFα and IFNγ concentrations were measured by ELISA in the culture supernatants and normalized. Index 1 corresponds to the values obtained with DC stimulated with TNFα or LPS as indicated in the figure. B) DC were generated as described above, then double staining for CD209 (DC-SIGN) and intracytoplasmic IFNγ was assessed. Panel shows bivariate dot plots of CD209 vs. intracytoplasmic IFNγ and response to MPA treatment after TNFα (left panel) or LPS (right panel) stimulation. Results are representative of five independent experiments. C) Immature Mo-DC were incubated with and without guanosine (25µM) for 60min then with and without MPA (100µM) and finally stimulated for 2 days with TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml). IL-12p70 and IFNγ concentrations were measured as described in panel A. D) Mo-DC were stimulated for 2 days with TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml) in the presence or absence of MPA or SB203580 (0.2µM or 0.02µM, respectively, concentration of SB203580 inhibiting p38MAPK phosphorylation at the same level as MPA, or 10µM or 20µM). Gray histograms represent the means of IFNγ secretion of five independent experiments ±SD for each condition. For A and D, statistical analysis was performed using a Wilcoxon test. The p value is indicated on each histogram of the figure and significance corresponds to $p<0.05$, NS=non-significant.

Figure 5

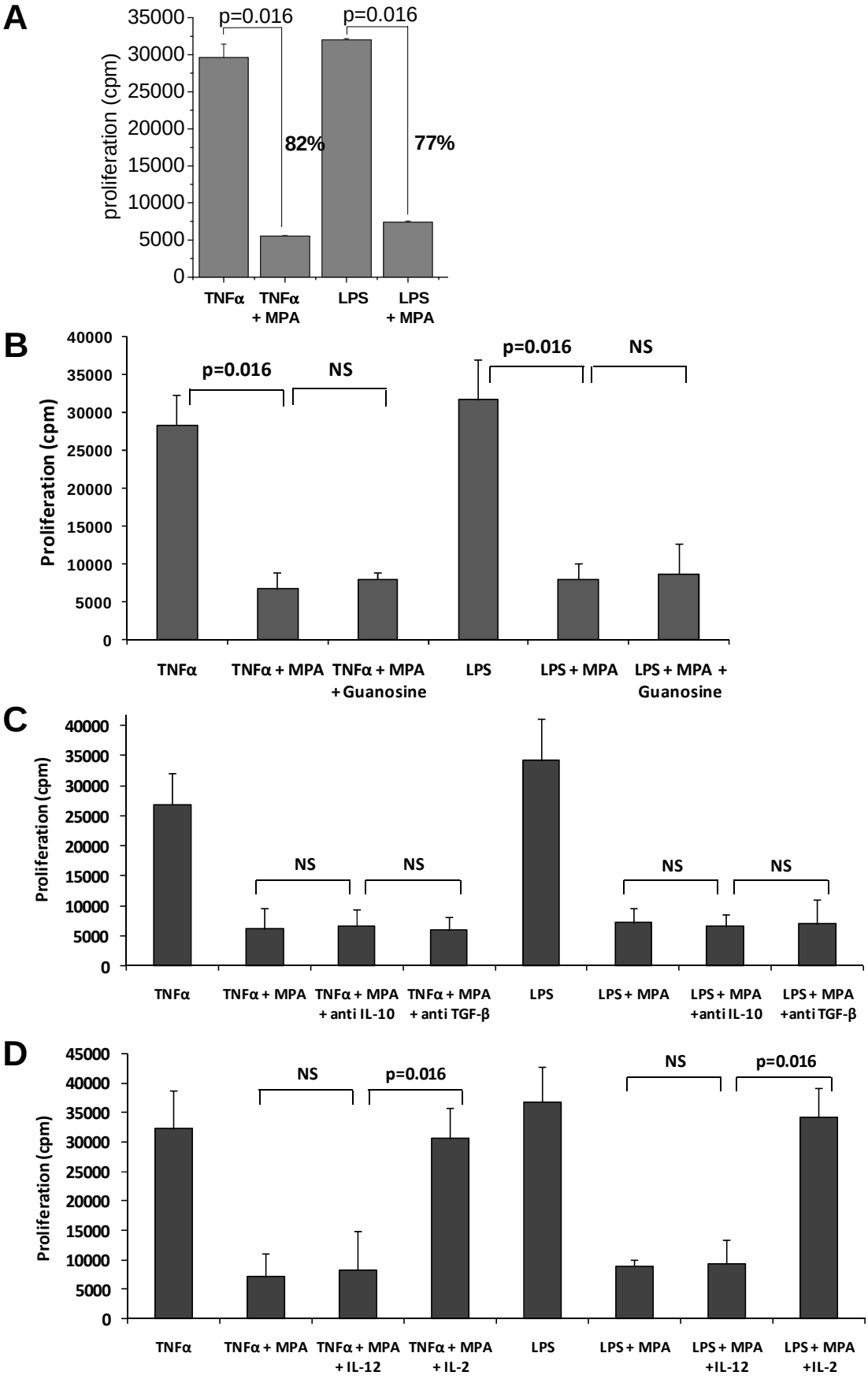
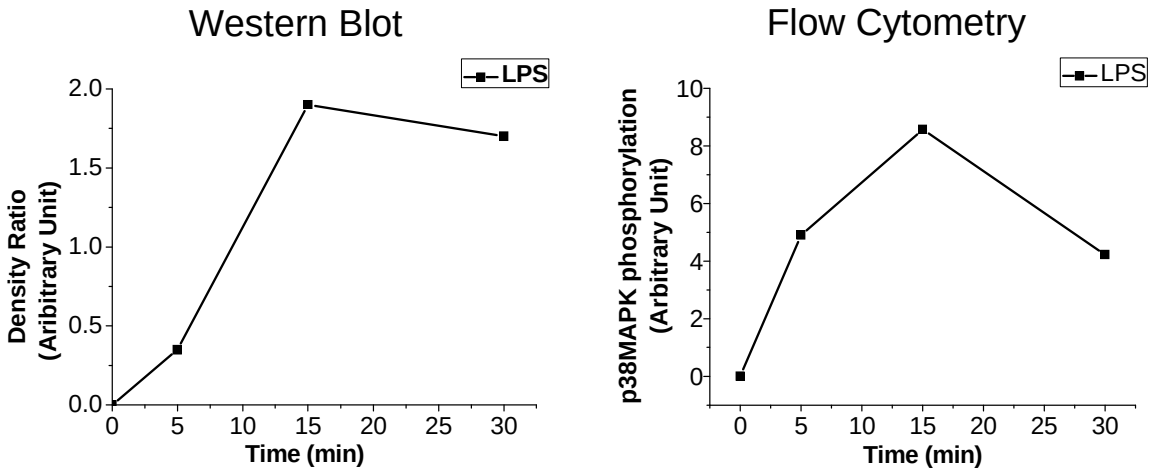

A
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
proliferation (cpm)
p=0.016
p=0.016
82%
77%
TNFα
TNFα + MPA
LPS
LPS + MPA
B
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Proliferation (cpm)
p=0.016
NS
p=0.016
NS
TNFα
TNFα + MPA
TNFα + MPA + Guanosine
LPS
LPS + MPA
LPS + MPA + Guanosine
C
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Proliferation (cpm)
NS
NS
NS
NS
TNFα
TNFα + MPA
TNFα + MPA + anti IL-10
TNFα + MPA + anti TGF-β
LPS
LPS + MPA
LPS + MPA +anti IL-10
LPS + MPA +anti TGF-β
D
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Proliferation (cpm)
NS
p=0.016
NS
p=0.016
TNFα
TNFα + MPA
TNFα + MPA + IL-12
TNFα + MPA + IL-2
LPS
LPS + MPA
LPS + MPA +IL-12
LPS + MPA +IL-2

Figure 5: MPA reduced the ability of mature DC to activate allogeneic T cells

A) After two days of maturation with either TNFα (20ng/ml) or LPS (50ng/ml) in the presence or absence of MPA (100µM), Mo-DC were harvested then co-cultured with allogeneic CD4+ T cells at a DC: T ratio of 1:3 for five days. T cell proliferation was assessed by incorporation of [3H]-thymidine during the last 18 hours of the assay. Gray histograms represent the means of 6 experiments. Mann Whitney tests were used to compare proliferation activity of MPA-treated DC and non-MPA-treated DC. B) Similar cultures were performed in the presence or absence of guanosine (25µM). One experiment out of three is presented. C) Similar cultures were performed in the presence or absence of neutralizing anti-IL10 (20µg/ml) or anti-TGFβ (20µg/ml) antibodies. Data are representative of one out of six experiments. D) Purified $CD4^+$ T lymphocytes were co-cultured with allogeneic MPA-treated DC in the presence or absence of exogenous IL-2 (100 IU/ml) or recombinant human IL-12 (10ng/ml). T cell proliferation was measured as described above. Similar results were obtained in three independent experiments. Data are expressed as mean counts per minute (cpm) ± SD obtained from triplicate wells. The p value is indicated on each histogram of the figure. *$p<0.05$.

Additional files

We compared the sensitivity of two methods to detect p38MAPK phosphorylation. This file shows that the sensitivity in our model to detect p38MAPK phosphorylation was greater using flow cytometry compared to western blot, justifying the use of flow cytometry to detect MAPK phosphorylation in the subsequent experiments.



Additional file 1: p38 phosphorylation coparaison by WB and Facs

On day 5, immature Mo-DC were stimulated with LPS (50ng/mL) for 5, 15, 30min, then p38MAPK phosphorylation was determined. For flow cytometry: p38MAPK phosphorylation was expressed as (phospho-p38MAPK MFI-stimulated DC / isotype MFI-stimulated DC) - (phospho-p38MAPK MFI non-stimulated DC / isotype MFI non-stimulated DC). For Western blot analysis: following 10% SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membranes which where then immunoblotted with anti-p38MAPK or anti-phospho-p38MAPK antibody. Results are expressed as density ratio (phospho-p38MAPK density of stimulated DC/ p38MAPK density of stimulated DC) - (phospho-p38MAPK density of non-stimulated DC/ p38MAPK density of non-stimulated DC). One experiment out of 2 is indicated.

2. Les cellules dendritiques traitées par un surnageant de probiotique BbC50sn induisent des lymphocytes T CD4$^+$ régulateurs

Situation :

Par ailleurs, au sein de notre laboratoire, une autre thématique de recherche a pour objectif de mieux caractériser l'action des bactéries probiotiques sur les fonctions des cellules dendritiques. En effet, nous nous sommes intéressés plus précisément à l'action potentielle du surnageant de fermentation de lait de la souche *Bifidobacterium breve C50* (BbC50). L'effet probiotique de cette souche a déjà été démontré chez la souris (Mullie et al., 2002). La consommation de ce surnageant ne contenant pas de bactéries pendant 7 jours entraîne une modification de la flore intestinale chez l'Homme : présence moindre de *Bacteroides* et *Clostridium* ainsi qu'une augmentation du nombre de bifidobactéries dans les selles (Romond et al., 1998). De plus, la consommation d'un lait infantile fermenté par *Bifidobacterium breve* C50 et *Streptococcus thermophilus* 065 par des enfants sains âgés de 4 à 6 mois pendant cinq mois entraîne une diminution de la sévérité des diarrhées aigues chez ces enfants (Thibault et al., 2004). Une étude menée chez la souris a également montré un renforcement de la barrière intestinale ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IFN-γ par les cellules T CD4$^+$ et CD8$^+$ dans les ganglions mésentériques après administration orale d'un surnageant de fermentation d'un milieu laitier simplifié de *Bifidobacterium breve* C50 et *Streptococcus thermophilus* 065 (Menard et al., 2005). De plus, la consommation de lait de vache fermenté par *Bifidobacterium breve* C50 et *Streptococcus thermophilus* 065 par des souris stimule les réponses immunitaires sans altérer la tolérance orale (Menard et al., 2006).

Les métabolites issus de la fermentation de lait de vache par les bactéries *Bifidobacterium breve* C50 et *Streptococcus thermophilus* 065 semblent donc agir sur le système immunitaire *in vivo*. Les cellules dendritiques sont présentes au niveau des muqueuses, notamment dans l'intestin, et peuvent moduler l'orientation de la réponse T CD4$^+$. Il est donc possible que ces métabolites agissent sur les cellules dendritiques. Nous avons testé l'effet du surnageant de fermentation d'un milieu laitier simplifié par la bactérie probiotique BbC50 (BbC50sn) *in vitro* sur les cellules dendritiques humaines dérivées de

monocytes. Nous avons montré que BbC50sn entraîne la maturation de ces cellules et améliore leur survie. De plus, les cellules dendritiques traitées par BbC50sn produisent plus d'IL-10 et moins d'IL-12p70 que des cellules dendritiques traitées avec du LPS. Il semblerait que l'action de BbC50sn soit au moins en partie médiée par le TLR-2 (Hoarau et al., 2006). De plus, l'étude des voies de signalisation a permis de décrire pour la première fois qu'un produit de fermentation bactérienne de la famille des bifidobactéries active différemment les MAPK, GSK3 et PI3K afin de moduler la maturation, l'activation et la survie des cellules dendritiques vers un profil « tolérogène » (Hoarau et al., 2008).

Objectifs et résumé des résultats :

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la réalisation de cette étude ayant pour objectif principal de déterminer si les cellules dendritiques humaines traitées avec le surnageant de BbC50 peuvent induire des lymphocytes T régulateurs *in vitro*.

Nous savons que les cellules dendritiques traitées par le BbC50sn (DC-BbC50sn) sont phénotypiquement matures, synthétisent peu d'IL-12 mais beaucoup d'IL-10. Pour induire des lymphocytes T régulateurs, nous avons testé le modèle de culture longue qui avait été utilisé pour induire des lymphocytes T régulateurs par des DC-MPA. Nous avons ainsi étudié le profil des lymphocytes T $CD4^+$ déplétés en $CD25^+$ après 4 semaines de coculture avec des DC-BbC50sn (LT-BbC50sn). Pour ce faire, différents aspects ont été explorés : les caractéristiques phénotypiques, la synthèse des cytokines IL-10 et TGF-β, l'expression du facteur de transcripion Foxp3, l'activité suppressive ainsi que les éventuels mécanismes mis en jeu dans leur fonctionnalité.

Nous avons ainsi mis en évidence que les lymphocytes T $CD4^+$ $CD25^-$ stimulés par des DC-BbC50sn sont anergiques à la fin de la culture longue. Cette anergie peut être levée en présence d'IL-2. De plus, les LT-BbC50sn ont un phénotype compatible avec celui des LT régulateurs, c'est-à-dire qu'ils expriment CD25, GITR, CTLA-4 intracellulaire, CD39 et que le CD127 est négatif. Enfin, environ 30% des LT-BbC50sn sont Foxp3 positifs. En ce qui concerne leur profil de sécrétion de cytokines, les LT-BbC50sn sécrètent à la fois de l'IL-10 et du TGF-β. Ces LT-BbC50sn ainsi cultivés exercent une activité suppressive en inhibant la prolifération de lymphocytes T $CD4^+$ $CD25^-$ répondeurs dans une MLR allogénique et en inhibant leur synthèse d'IFN-γ. Cependant, cette activité suppressive n'est pas alloantigène spécifique et ne se fait ni par l'intermédiaire d'un contact LT-LT ni par les facteurs solubles IL-10 et TGF-β. En conclusion, on peut dire que le traitement des DC par du BbC50sn permet d'induire des lymphocytes T régulateurs qui semblent agir de manière CD39 dépendante.

HUMAN DENDRITIC CELLS TREATED WITH *BIFIDOBACTERIUM BREVE* SUPERNATANT INDUCE REGULATORY T CELLS

L. Martin[1], **R. Lemoine**[1], C. Hoarau[1], E. Perrin[2], C. Aubert Jacquin[2], Y. Lebranchu[1,3] and F. Velge-Roussel[1,4]

[1]EA 4245 « Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes », Université François Rabelais, IFR-136 « Agents Transmissibles et Infectiologie », UFR de Médecine, 10 Bd Tonnellé, 37000 Tours, France

[2]Blédina, rue Remy Goetgheluck, 59114 Steenvoorde, France

[3]Service de Néphrologie et d'Immunologie clinique, CHRU de Tours, 2 bis boulevard Tonnellé 37031 Tours, France

[4]UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France

Address correspondence and reprint requests to Florence Velge-Roussel, Université François Rabelais, EA 4245 « Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes », UFR de Médecine, IFR136, 10 Bd Tonnelle, 37000 Tours, France.
Telephone: +33 2 47 36 60 58; Fax: +33 2 47 36 61 47; e-mail: florence.velge-roussel@univ-tours.fr

Article en préparation pour « Journal of Allergy and Clinical Immunology »

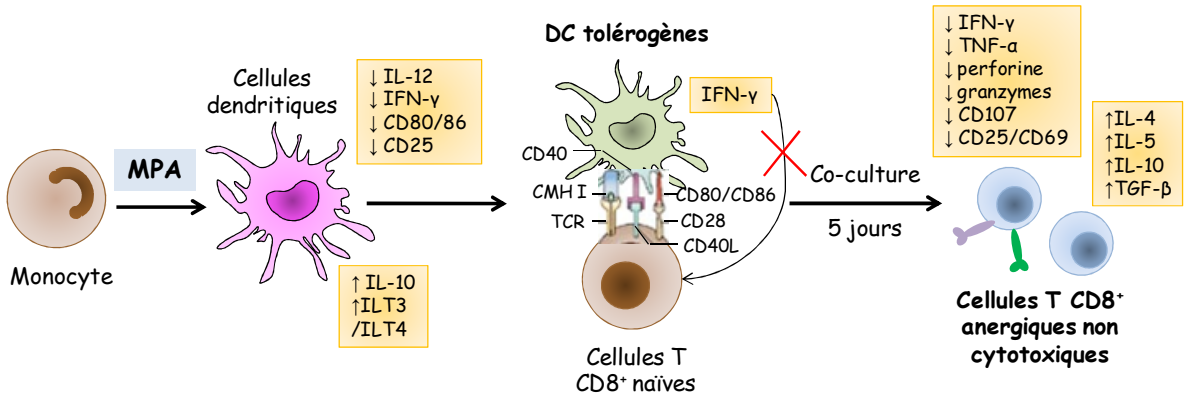
ABSTRACT

Probiotic bacteria have been shown to trigger health benefits in various situations (inflammation, allergy, diarrhea). Several studies demonstrated that probiotic bacteria could directly act on the immune system, but the mechanisms of action of these bacteria are not well defined yet. We previously showed that a bacteria-free fermentation product of *Bifidobacterium breve* C50 (BbC50sn) induced high IL-10 secretion by human dendritic cells. IL-10 is a regulatory cytokine so we wondered whether these dendritic cells could induce regulatory T cells. Purified CD4+CD25- human T cells were co-cultured with allogeneic BbC50sn-treated dendritic cells for 4 weeks. Then the T cell population (BbC50sn-T) was analysed: phenotypic characterization by flow cytometry, cytokine secretion in culture supernatant by ELISA and capacity to inhibit an allogeneic mixed leukocyte reaction (MLR) by 3H-Thymidine incorporation.In the present study, we showed that after 4 weeks of co-culture with BbC50sn-DC, T lymphocytes had phenotypic characteristics of regulatory T cells and exerted a suppressive activity *in vitro*: they inhibited T lymphocytes proliferation and IFN-γ production in an allogeneic MLR. Transwell experiments demonstrated that this suppressive activity was not T cell-contact dependent but was mediated by a soluble factor. BbC50sn T cells secreted significant amounts of IL-10 and TGF-β but didn't seem to exert their suppressive activity through these cytokines. As far as we know, it is the first demonstration of regulatory T cells induction by a bacteria-free fermentation product

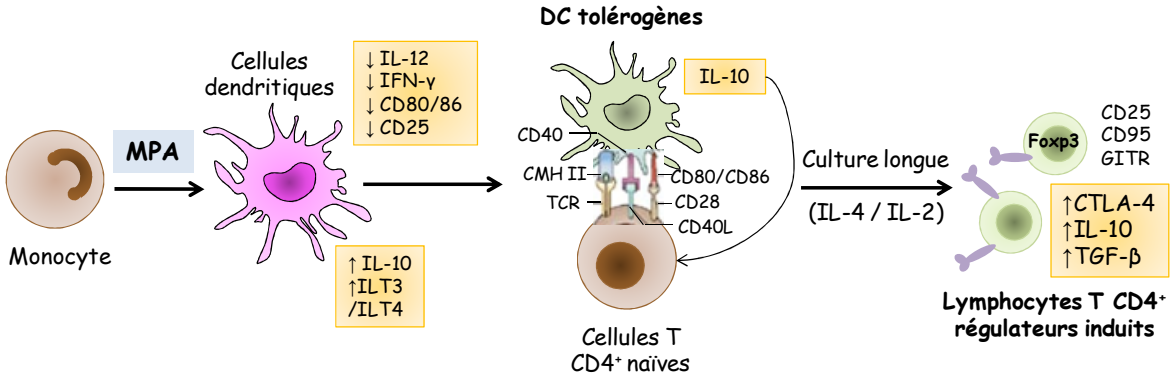
Conclusion

L'objectif de cette étude était de caractériser les propriétés régulatrices des cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique, un immunosuppresseur couramment utilisé en transplantation. La plupart de nos objectifs initiaux ont été atteints.

Dans un premier temps, nous mettons en évidence que les DC traitées par le MPA se révèlent incapables d'activer efficacement des lymphocytes T $CD8^+$ allogéniques via la voie directe en absence de la fonction auxiliaire des cellules T $CD4^+$. De manière intéressante, cette faible activation entraîne une diminution de la fonction effectrice cytotoxique des lymphocytes T $CD8^+$ ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-10 et de TGF-β. Enfin, la diminution de synthèse d'IFN-γ dans les DC après traitement au MPA semble jouer un rôle dans l'induction de l'anergie des LT $CD8^+$.



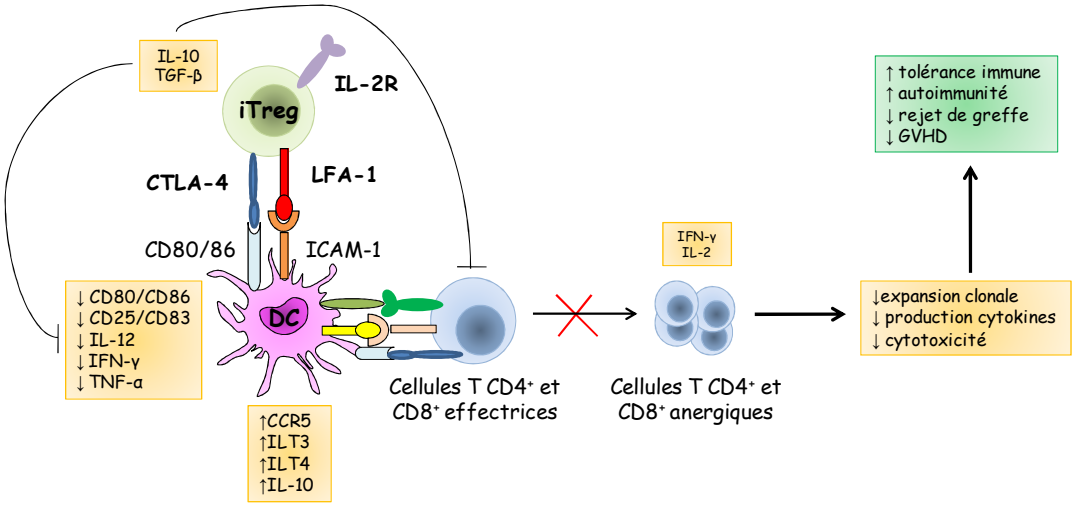
Dans un deuxième temps, nous démontrons que ces mêmes DC-MPA peuvent générer des populations T $CD4^+$ ayant des fonctions régulatrices. Ces lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs induits sont caractérisés par l'augmentation de l'expression des marqueurs CD25, GITR, CTLA-4, CD95 et du facteur de transcription Foxp3 ainsi que par une sécrétion importante d'IL-10 et de TGF-β comparées aux cultures avec des DC-TNF.



Enfin, nous montrons que ces iTreg sont capables de reprogrammer des DC matures en DC possédant des propriétés tolérogènes. Ces DC ainsi modifiées possèdent un phénotype particulier caractérisé par une augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs ILT3 et

ILT4 ainsi qu'une augmentation de l'expression du CCR5 et une nette diminution d'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et des marqueurs de maturation CD25 et CD83. Le profil de sécrétion des cytokines est également modifié avec une sécrétion importante d'IL-10 et une diminution de production de nombreuses cytokines telles que l'IL-6, le TNF-α, l'IFN-γ ou encore l'IL-12. Ces modifications font intervenir en partie les facteurs solubles IL-10 et TGF-β ainsi que les molécules de surface CTLA-4 et LFA-1.

Pour finir, nous savons que les iTreg sont capables *in vitro* d'inhiber aussi bien la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ que celle des $CD8^+$ activés par des DC matures. Là encore, l'effet régulateur est antigène-spécifique.



Pour conclure, on peut dire que les cellules dendritiques traitées par l'acide mycophénolique ont un profil de cellules tolérogènes et sont capables d'induire le développement de lymphocytes T $CD8^+$ non cytotoxiques et de lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs qui vont à leur tour agir sur d'autres populations de cellules immunitaires comme les DC et les LT. Ces propriétés font des DC-MPA un candidat privilégié pour une utilisation en thérapie cellulaire. L'injection, au moment de ou avant la greffe, de DC-MPA du donneur, pourrait permettre l'induction d'une tolérance du greffon. Néanmoins, nous sommes encore loin de pouvoir tester un tel protocole *in vivo* chez l'homme. Il faudrait tout d'abord identifier tous les mécanismes mis en jeu par les DC-MPA et les iTreg pour induire une tolérance immune et diminuer le rejet de greffe. D'autre part, il serait intéressant de pouvoir tester ces cellules dans un modèle animal. Un modèle pré-clinique de greffe chez le porc est actuellement mis au point au laboratoire.

Annexe

Annexe 1: Bibliographie personnelle

PUBLICATIONS

1. R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu and C. Baron
Mycophenolic acid disables human dendritic cells to induce allogeneic cytotoxic $CD8^+$ T cells through inhibition of Interferon Gamma synthesis in dendritic cells.
Article soumis dans Blood

2. R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu and C. Baron
Regulatory $CD4^+$ T cells induced by Mycophenolic acid-treated dendritic cells reprogram mature into semi-mature DC with tolerogenic properties.
Article soumis dans Journal of Immunology

3. L. Martin, R. Lemoine, C. Hoarau, E. Perrin, A. Aubert-Jacquin, Y. Lebranchu and F. Velge-Roussel
Human dendritic cells treated with a bacteria-free supernatant of Bifidobacterium breve induce regulatory T cells.
Article en préparation pour Journal of Allergy and Clinical Immunology

4. D. Faugaret, R. Lemoine, C. Baron, F. Velge-Roussel and Y. Lebranchu
Mycophenolic acid differently affects dendritic cell maturation induced by Tumor Necrosis Factor α and Lipopolysaccharide through a different modulation of MAPK signaling.
Molecular Immunology 2009 October

5. R. Lemoine, H. Nivet, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu and C. Baron
Mycophenolic acid-induced regulatory $CD4^+$ T cells confer tolerogenic properties to human dendritic cells: contribution of multiple mechanisms including IL-10, TGF-β, LFA-1 and CTLA-4. **European Journal of Immunology 2009 September ; volume 39 (Supplement 1)**

6. R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu and C. Baron
Mycophenolic acid disabled human dendritic cells to induce allogeneic cytotoxic $CD8^+$ T cells. **Transplant International 2009 August ; volume 22 (Supplement 2)**

7. R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu and C. Baron
Mycophenolic acid-induced regulatory $CD4^+$ T cells confer tolerogenic properties to human dendritic cells. **Transplant International 2009 August ; volume 22 (Supplement 2)**

8. D. Faugaret, R. Lemoine, C. Baron , F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu
Mycophenolic acid inhibits p38 mitogen-activated protein kinase induced by pro-inflammatory agents in human dendritic cells.
Immunology 2008 December ; 125 (Supplement 1)

9. R. Lemoine, C. Lagaraine, C. Baron, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu
Induction of human $CD4^+$ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells.
J Leukoc Biol. 2008 Oct ; 84(4): 1057-64.

COMMUNICATIONS ORALES

14th Congress of European Society of Organ Transplantation (30 Août au 2 Septembre 2009) Paris, France

- *Mycophenolic acid-induced regulatory CD4$^+$ T cells confer tolerogenic properties to human dendritic cells.* R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu and C. Baron
- *Mycophenolic acid disables human dendritic cells to induce allogeneic cytotoxic CD8$^+$ T cells through inhibition of Interferon Gamma synthesis in dendritic cells.*
R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu and C. Baron

13ème Congrès annuel de Cytométrie (22 au 24 Octobre 2008) Nancy, France

Inhibition de la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8$^+$ par des cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique : analyse par cytométrie en flux.
R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu, C. Baron.

8ème Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation (8 au 11 Octobre 2008) Québec, Canada

Modulation de la réponse in vitro des lymphocytes T CD8$^+$ par des cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique.
R. Lemoine, H. Nivet, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu and C. Baron

Forum de l'école doctorale « Santé, Sciences, Technologies » (12 Juin 2008) Tours, France

Modulation de la réponse immunitaire in vitro des lymphocytes T CD8$^+$ par des cellules dendritiques humaines en présence de différents agents maturants.
R. Lemoine, H. Nivet, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu and C. Baron

Journée de la Recherche UFR Médecine (13 Décembre 2007) Tours, France

Les cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique modifient la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8$^+$.
R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu and C. Baron

COMMUNICATIONS POSTERS

2nd European Congress of Immunology (13 au 16 Septembre 2009) Berlin, Allemagne

- *Mycophenolic acid-induced regulatory CD4$^+$ T cells confer tolerogenic properties to human dendritic cells: contribution of multiple mechanisms including IL-10, TGF-β, LFA-1 and CTLA-4.* R. Lemoine, H. Nivet, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu and C. Baron
- *Mycophenolic acid disables human dendritic cells to induce allogeneic cytotoxic CD8$^+$ T cells through inhibition of Interferon Gamma synthesis in dendritic cells.*
R. Lemoine, F. Velge-Roussel, H. Nivet, Y. Lebranchu and C. Baron

American Transplant Congress (30 Mai au 3 Juin 2009) Boston, Etats-Unis

Inhibition of cytotoxic CD8$^+$ T cell response by Mycophenolic Acid-treated human dendritic cells in the absence of helper CD4$^+$ T cells.
R. Lemoine, H. Nivet, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu and C. Baron

Annual Meeting of the French Society for Immunology (25 au 27 Novembre 2008) Paris, France

- *Modulation of cytotoxic CD8$^+$ T cells response by Mycophenolic Acid-treated human dendritic cells.* R. Lemoine, H. Nivet, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu and C. Baron
- *Mycophenolic acid-induced regulatory CD4$^+$ T cells confer tolerogenic properties to human dendritic cells.* R. Lemoine, H. Nivet, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu and C. Baron

Annual Congress of the British Society for Immunology (17 au 21 Novembre 2008) Glasgow

Mycophenolic acid inhibits p38 mitogen-activated protein kinase induced by pro-inflammatory agents in human dendritic cells.
D. Faugaret, R. Lemoine, C. Baron , F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu.

8ème Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation (8 au 11 Octobre 2008) Québec, Canada

Modulation de la fonction des cellules dendritiques humaines par des lymphocytes T CD4$^+$ régulateurs induits in vitro.
R. Lemoine, H. Nivet, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu and C. Baron

7ème Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation (5 au 8 Décembre 2007) Lyon, France

Induction of human antigen-specific CD4$^+$ regulatory T cells by Mycophenolic Acid-treated dendritic cells.
C. Lagaraine, R. Lemoine, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu.

XX^{ème} Colloque Biotechnocentre (25 et 26 Octobre 2007) Seillac, France

Ontogenèse des cellules Natural Killers dans l'intestin de l'animal nouveau-né et recrutement au cours de l'infection par Cryptosporidium parvum ; participation des cellules NK à la production précoce d'Interféron gamma.
F. Drouet, R. Lemoine, J. El Hmouzi, Y. Le Vern, S. Lacroix-Lamandé, F. Laurent

Journées d'animation scientifique du Département de Santé Animale (25-27 Juin 2007), France

Cellules impliquées dans la production précoce d'Interféron-gamma au cours de l'infection de l'animal nouveau-né par Cryptosporidium parvum : participation des cellules NK ?
F. Drouet, R. Lemoine, J. El-Hmouzi, Y. Le Vern, S. Lacroix-Lamandé, F. Laurent

Bibliographie

Bibliographie

Abraham, R. T., and Wiederrecht, G. J. (1996). Immunopharmacology of rapamycin. Annu Rev Immunol *14*, 483-510.

Ackerman, A. L., and Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. Nat Immunol *5*, 678-684.

Adams, A. B., Williams, M. A., Jones, T. R., Shirasugi, N., Durham, M. M., Kaech, S. M., Wherry, E. J., Onami, T., Lanier, J. G., Kokko, K. E., *et al.* (2003). Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. J Clin Invest *111*, 1887-1895.

Adams, S., O'Neill, D. W., and Bhardwaj, N. (2005). Recent advances in dendritic cell biology. J Clin Immunol *25*, 177-188.

Adu, D., Cross, J., and Jayne, D. R. (2001). Treatment of systemic lupus erythematosus with mycophenolate mofetil. Lupus *10*, 203-208.

Afzali, B., Lechler, R. I., and Hernandez-Fuentes, M. P. (2007). Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. Tissue Antigens *69*, 545-556.

Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., and Pulendran, B. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. J Immunol *171*, 4984-4989.

Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., and Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. Eur J Immunol *32*, 1958-1968.

Ahmadzadeh, M., and Rosenberg, S. A. (2006). IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. Blood *107*, 2409-2414.

Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., and Tagami, H. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and 2,4-dinitrochlorobenzene. J Invest Dermatol *120*, 390-399.

Akbar, A. N., Amlot, P. L., Timms, A., Lombardi, G., Lechler, R., and Janossy, G. (1990). The development of primed/memory CD8+ lymphocytes in vitro and in rejecting kidneys after transplantation. Clin Exp Immunol *81*, 225-231.

Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol Lett *85*, 85-95.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol *4*, 499-511.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. Cell *124*, 783-801.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature *413*, 732-738.

Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G. B., and Sher, A. (2000). CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. Nat Immunol *1*, 83-87.

Allison, A. C., and Eugui, E. M. (2000). Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. Immunopharmacology *47*, 85-118.

Alters, S. E., Gadea, J. R., Holm, B., Lebkowski, J., and Philip, R. (1999). IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. J Immunother *22*, 229-236.

Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J., and Sacks, D. (2007). CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. J Exp Med *204*, 285-297.

Anderton, S. M., and Wraith, D. C. (2002). Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. Nat Rev Immunol *2*, 487-498.

Andreasen, S. O., Christensen, J. E., Marker, O., and Thomsen, A. R. (2000). Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. J Immunol *164*, 3689-3697.

Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 17264-17269.

Annacker, O., Asseman, C., Read, S., and Powrie, F. (2003). Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. J Autoimmun *20*, 277-279.

Ardeshna, K. M., Pizzey, A. R., Devereux, S., and Khwaja, A. (2000). The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. Blood *96*, 1039-1046.

Arrighi, J. F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V., and Hauser, C. (2001). A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. J Immunol *166*, 3837-3845.

Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. J Exp Med *184*, 387-396.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. J Exp Med *190*, 995-1004.

Baban, B., Chandler, P. R., Sharma, M. D., Pihkala, J., Koni, P. A., Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2009). IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. J Immunol *183*, 2475-2483.

Bacchetta, R., Bigler, M., Touraine, J. L., Parkman, R., Tovo, P. A., Abrams, J., de Waal Malefyt, R., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1994). High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. J Exp Med *179*, 493-502.

Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol *167*, 1245-1253.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol *18*, 767-811.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature *392*, 245-252.

Banz, A., Pontoux, C., and Papiernik, M. (2002). Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. J Immunol *169*, 750-757.

Barbieri, M. A., Kohn, A. D., Roth, R. A., and Stahl, P. D. (1998). Protein kinase B/akt and rab5 mediate Ras activation of endocytosis. J Biol Chem *273*, 19367-19370.

Barker, C. F., and Billingham, R. E. (1977). Immunologically privileged sites. Adv Immunol *25*, 1-54.

Battaglia, M., and Roncarolo, M. G. (2006). Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells. Inflamm Allergy Drug Targets *5*, 157-165.

Battaglia, M., Stabilini, A., and Roncarolo, M. G. (2005). Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. Blood *105*, 4743-4748.

Bayry, J., Triebel, F., Kaveri, S. V., and Tough, D. F. (2007). Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol *178*, 4184-4193.

Beiting, D. P., Gagliardo, L. F., Hesse, M., Bliss, S. K., Meskill, D., and Appleton, J. A. (2007). Coordinated control of immunity to muscle stage Trichinella spiralis by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta. J Immunol *178*, 1039-1047.

Bending, D., De La Pena, H., Veldhoen, M., Phillips, J. M., Uyttenhove, C., Stockinger, B., and Cooke, A. (2009). Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. J Clin Invest.

Benichou, G. (1999). Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. Front Biosci *4*, D476-480.

Benichou, G., Fedoseyeva, E., Lehmann, P. V., Olson, C. A., Geysen, H. M., McMillan, M., and Sercarz, E. E. (1994). Limited T cell response to donor MHC peptides during allograft rejection. Implications for selective immune therapy in transplantation. J Immunol *153*, 938-945.

Benichou, G., Malloy, K. M., Tam, R. C., Heeger, P. S., and Fedoseyeva, E. V. (1998). The presentation of self and allogeneic MHC peptides to T lymphocytes. Hum Immunol *59*, 540-548.

Benichou, G., Takizawa, P. A., Olson, C. A., McMillan, M., and Sercarz, E. E. (1992). Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. J Exp Med *175*, 305-308.

Benichou, G., Valujskikh, A., and Heeger, P. S. (1999). Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. J Immunol *162*, 352-358.

Bergmann, C., Strauss, L., Wang, Y., Szczepanski, M. J., Lang, S., Johnson, J. T., and Whiteside, T. L. (2008). T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. Clin Cancer Res *14*, 3706-3715.

Bestard, O., Nickel, P., Cruzado, J. M., Schoenemann, C., Boenisch, O., Sefrin, A., Grinyo, J. M., Volk, H. D., and Reinke, P. (2008). Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. J Am Soc Nephrol *19*, 1419-1429.

Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M., and Koup, R. A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. J Immunol Methods *281*, 65-78.

Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S. C., and Nathenson, S. G. (2006). B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. Immunol Lett *104*, 70-75.

Bierer, B. E., Peterson, A., Barbosa, J., Seed, B., and Burakoff, S. J. (1988). Expression of the T-cell surface molecule CD2 and an epitope-loss CD2 mutant to define the role of lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3) in T-cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A *85*, 1194-1198.

Biragyn, A., Ruffini, P. A., Leifer, C. A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., Shirakawa, A. K., Farber, J. M., Segal, D. M., Oppenheim, J. J., and Kwak, L. W. (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. Science *298*, 1025-1029.

Blackman, M. A., Gerhard-Burgert, H., Woodland, D. L., Palmer, E., Kappler, J. W., and Marrack, P. (1990). A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1a. Nature *345*, 540-542.

Boisleve, F., Kerdine-Romer, S., and Pallardy, M. (2005). Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. Toxicology *206*, 233-244.

Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., *et al.* (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. J Exp Med *204*, 1303-1310.

Borkowski, T. A., Letterio, J. J., Farr, A. G., and Udey, M. C. (1996). A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. J Exp Med *184*, 2417-2422.

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., *et al.* (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. Blood *110*, 1225-1232.

Borst, J., Hendriks, J., and Xiao, Y. (2005). CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. Curr Opin Immunol *17*, 275-281.

Bour-Jordan, H., and Blueston, J. A. (2002). CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. J Clin Immunol *22*, 1-7.

Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol *214*, 149-160.
Braun, D., Longman, R. S., and Albert, M. L. (2005). A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. Blood *106*, 2375-2381.

Brawand, P., Fitzpatrick, D. R., Greenfield, B. W., Brasel, K., Maliszewski, C. R., and De Smedt, T. (2002). Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. J Immunol *169*, 6711-6719.

Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F., and et al. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature *373*, 441-444.

Bu, P., Keshavarzian, A., Stone, D. D., Liu, J., Le, P. T., Fisher, S., and Qiao, L. (2001). Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. J Immunol *166*, 6399-6403.

Buckland, M., Jago, C. B., Fazekasova, H., Scott, K., Tan, P. H., George, A. J., Lechler, R., and Lombardi, G. (2006). Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells. Am J Transplant *6*, 2046-2059.

Bullock, T. N., and Yagita, H. (2005). Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. J Immunol *174*, 710-717.

Bumgardner, G. L., Gao, D., Li, J., Baskin, J. H., Heininger, M., and Orosz, C. G. (2000). Rejection responses to allogeneic hepatocytes by reconstituted SCID mice, CD4, KO, and CD8 KO mice. Transplantation *70*, 1771-1780.

Camara, N. O., Sebille, F., and Lechler, R. I. (2003). Human CD4+CD25+ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8+ T cell activation. Eur J Immunol *33*, 3473-3483.

Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R., and Ley, T. J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. Immunity *27*, 635-646.

Cardin, R. D., Brooks, J. W., Sarawar, S. R., and Doherty, P. C. (1996). Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. J Exp Med *184*, 863-871.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med *180*, 1263-1272.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1996a). 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*, 695-706.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1996b). Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood *87*, 2376-2385.

Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. Eur J Immunol *30*, 1538-1543.

Chai, J. G., Bartok, I., Chandler, P., Vendetti, S., Antoniou, A., Dyson, J., and Lechler, R. (1999). Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo. Eur J Immunol *29*, 686-692.

Chai, J. G., Tsang, J. Y., Lechler, R., Simpson, E., Dyson, J., and Scott, D. (2002). CD4+CD25+ T cells as immunoregulatory T cells in vitro. Eur J Immunol *32*, 2365-2375.

Chang, C. C., Ciubotariu, R., Manavalan, J. S., Yuan, J., Colovai, A. I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., and Suciu-Foca, N. (2002). Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. Nat Immunol *3*, 237-243.

Chapoval, A. I., Ni, J., Lau, J. S., Wilcox, R. A., Flies, D. B., Liu, D., Dong, H., Sica, G. L., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (2001). B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. Nat Immunol *2*, 269-274.

Chauveau, C., Remy, S., Royer, P. J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F. X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., *et al.* (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. Blood *106*, 1694-1702.

Chen, M. L., Pittet, M. J., Gorelik, L., Flavell, R. A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 419-424.

Chen, W. (2006). Dendritic cells and (CD4+)CD25+ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance. Front Biosci *11*, 1360-1370.

Chen, W., and Wahl, S. M. (2003). TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. Cytokine Growth Factor Rev *14*, 85-89.

Chen, Y., Inobe, J., and Weiner, H. L. (1995). Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. J Immunol *155*, 910-916.

Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science *265*, 1237-1240.

Chiang, P. H., Wang, L., Bonham, C. A., Liang, X., Fung, J. J., Lu, L., and Qian, S. (2004). Mechanistic insights into impaired dendritic cell function by rapamycin: inhibition of Jak2/Stat4 signaling pathway. J Immunol *172*, 1355-1363.

Chiang, P. H., Wang, L., Liang, Y., Liang, X., Qian, S., Fung, J. J., Bonham, C. A., and Lu, L. (2002). Inhibition of IL-12 signaling Stat4/IFN-gamma pathway by rapamycin is associated with impaired dendritic [correction of dendritc] cell function. Transplant Proc *34*, 1394-1395.

Chothia, C., Boswell, D. R., and Lesk, A. M. (1988). The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. Embo J *7*, 3745-3755.

Chow, A., Toomre, D., Garrett, W., and Mellman, I. (2002). Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. Nature *418*, 988-994.

Chuang, Y. H., Suen, J. L., and Chiang, B. L. (2006). Fas-ligand-expressing adenovirus-transfected dendritic cells decrease allergen-specific T cells and airway inflammation in a murine model of asthma. J Mol Med *84*, 595-603.

Ciubotariu, R., Vasilescu, R., Ho, E., Cinti, P., Cancedda, C., Poli, L., Late, M., Liu, Z., Berloco, P., Cortesini, R., and Suciu-Foca Cortesini, N. (2001). Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts. Hum Immunol *62*, 15-20.

Colic, M., Stojic-Vukanic, Z., Pavlovic, B., Jandric, D., and Stefanoska, I. (2003). Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. Clin Exp Immunol *134*, 63-69.

Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature *450*, 566-569.

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y. J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol *5*, 1219-1226.

Condon, C., Watkins, S. C., Celluzzi, C. M., Thompson, K., and Falo, L. D., Jr. (1996). DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. Nat Med *2*, 1122-1128.

Cook, D. N., Prosser, D. M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N. A., Abbondanzo, S. J., Niu, X. D., Chen, S. C., Manfra, D. J., Wiekowski, M. T., *et al.* (2000). CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. Immunity *12*, 495-503.

Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. J Exp Med *204*, 1757-1764.

Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarlasci, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., *et al.* (2003). Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. Blood *102*, 4107-4114.

Coyle, A. J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J. A., *et al.* (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. Immunity *13*, 95-105.

Cresswell, P. (1994). Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules. Curr Biol *4*, 541-543.
Csencsits, K. L., and Bishop, D. K. (2003). Contrasting alloreactive CD4+ and CD8+ T cells: there's more to it than MHC restriction. Am J Transplant *3*, 107-115.

Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2002). CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. Curr Opin Immunol *14*, 771-778.

D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. J Exp Med *198*, 293-303.

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I. C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. Nat Immunol *9*, 1347-1355.

de Heer, H. J., Hammad, H., Kool, M., and Lambrecht, B. N. (2005). Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. Semin Immunol *17*, 295-303.

de Jong, E. C., Smits, H. H., and Kapsenberg, M. L. (2005). Dendritic cell-mediated T cell polarization. Springer Semin Immunopathol *26*, 289-307.

Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., *et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med *204*, 1257-1265.

DeBenedette, M. A., Shahinian, A., Mak, T. W., and Watts, T. H. (1997). Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. J Immunol *158*, 551-559.

Delgado, M. (2009). Generating Tolerogenic Dendritic Cells with Neuropeptides. Hum Immunol.

Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J Exp Med *193*, 1303-1310.

Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J Exp Med *188*, 373-386.

Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S., and Pulendran, B. (2004). A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. J Immunol *172*, 4733-4743.

Dong, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nat Rev Immunol *8*, 337-348.

Dong, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2002). MAP kinases in the immune response. Annu Rev Immunol *20*, 55-72.

Dubsky, P. C., Friedl, J., Stift, A., Bachleitner-Hofmann, T., Jakesz, R., Gnant, M. F., and Weigel, G. (2006). Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibition by mycophenolic acid impairs maturation and function of dendritic cells. Clin Chim Acta *364*, 139-147.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. Nat Immunol *10*, 857-863.

Dumitriu, I. E., Baruah, P., Bianchi, M. E., Manfredi, A. A., and Rovere-Querini, P. (2005). Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol *35*, 2184-2190.
Dumitriu, I. E., Bianchi, M. E., Bacci, M., Manfredi, A. A., and Rovere-Querini, P. (2007). The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. J Leukoc Biol *81*, 84-91.

Dumont, F. J., Melino, M. R., Staruch, M. J., Koprak, S. L., Fischer, P. A., and Sigal, N. H. (1990). The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. J Immunol *144*, 1418-1424.

Duperrier, K., Farre, A., Bienvenu, J., Bleyzac, N., Bernaud, J., Gebuhrer, L., Rigal, D., and Eljaafari, A. (2002). Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L. J Leukoc Biol *72*, 953-961.

Ebner, S., Ehammer, Z., Holzmann, S., Schwingshackl, P., Forstner, M., Stoitzner, P., Huemer, G. M., Fritsch, P., and Romani, N. (2004). Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. Int Immunol *16*, 877-887.

Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T., and Tiegs, G. (2007). IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. Hepatology *45*, 475-485.

Fadilah, S. A., Vuckovic, S., Khalil, D., and Hart, D. N. (2007). Cord blood CD34+ cells cultured with FLT3L, stem cell factor, interleukin-6, and IL-3 produce CD11c+CD1a-/c- myeloid dendritic cells. Stem Cells Dev *16*, 849-855.

Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S. D., Coffman, R. L., Flavell, R. A., and Powrie, F. (2005). T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. J Exp Med *201*, 737-746.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nat Immunol *4*, 1206-1212.

Fedoric, B., and Krishnan, R. (2008). Rapamycin downregulates the inhibitory receptors ILT2, ILT3, ILT4 on human dendritic cells and yet induces T cell hyporesponsiveness independent of FoxP3 induction. Immunol Lett *120*, 49-56.

Fernandez, M. A., Puttur, F. K., Wang, Y. M., Howden, W., Alexander, S. I., and Jones, C. A. (2008). T regulatory cells contribute to the attenuated primary CD8+ and CD4+ T cell responses to herpes simplex virus type 2 in neonatal mice. J Immunol *180*, 1556-1564.

Filaci, G., and Suciu-Foca, N. (2002). CD8+ T suppressor cells are back to the game: are they players in autoimmunity? Autoimmun Rev *1*, 279-283.

Flano, E., Woodland, D. L., and Blackman, M. A. (1999). Requirement for CD4+ T cells in V beta 4+CD8+ T cell activation associated with latent murine gammaherpesvirus infection. J Immunol *163*, 3403-3408.

Fowler, D. H., Breglio, J., Nagel, G., Eckhaus, M. A., and Gress, R. E. (1996). Allospecific CD8+ Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease. J Immunol *157*, 4811-4821.

Fritz, J. H., Girardin, S. E., Fitting, C., Werts, C., Mengin-Lecreulx, D., Caroff, M., Cavaillon, J. M., Philpott, D. J., and Adib-Conquy, M. (2005). Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. Eur J Immunol *35*, 2459-2470.

Fritzsching, B., Oberle, N., Eberhardt, N., Quick, S., Haas, J., Wildemann, B., Krammer, P. H., and Suri-Payer, E. (2005). In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. J Immunol *175*, 32-36.
Fujita, S., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Kubo, M., and Yamashita, N. (2007). Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. Blood *110*, 3793-3803.

Fukaura, H., Kent, S. C., Pietrusewicz, M. J., Khoury, S. J., Weiner, H. L., and Hafler, D. A. (1996a). Antigen-specific TGF-beta1 secretion with bovine myelin oral tolerization in multiple sclerosis. Ann N Y Acad Sci *778*, 251-257.

Fukaura, H., Kent, S. C., Pietrusewicz, M. J., Khoury, S. J., Weiner, H. L., and Hafler, D. A. (1996b). 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*, 70-77.

Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. Nat Med *5*, 1249-1255.

Gao, Q., Rouse, T. M., Kazmerzak, K., and Field, E. H. (1999). CD4+CD25+ cells regulate CD8 cell anergy in neonatal tolerant mice. Transplantation *68*, 1891-1897.

Garin, M. I., Chu, C. C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., and Lechler, R. I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. Blood *109*, 2058-2065.

Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. Nat Immunol *1*, 353-357.

Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. Cell *100*, 575-585.

Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J. P., Dy, M., Brousse, N., and Hermine, O. (1998). Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. J Exp Med *187*, 961-966.

Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A. (1999). TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. J Immunol *162*, 4567-4575.

Gelman, A. E., Okazaki, M., Lai, J., Kornfeld, C. G., Kreisel, F. H., Richardson, S. B., Sugimoto, S., Tietjens, J. R., Patterson, G. A., Krupnick, A. S., and Kreisel, D. (2008). CD4+ T lymphocytes are not necessary for the acute rejection of vascularized mouse lung transplants. J Immunol *180*, 4754-4762.

Geng, L., Jiang, G., Xie, H., Fang, Y., Dong, S., Chen, Y., Shen, M., and Zheng, S. (2006). Mycophenolic acid upregulates B7-DC expression on dendritic cells, which is associated with impaired allostimulatory capacity of dendritic cells. Transplant Proc *38*, 1622-1624.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. J Exp Med *195*, 327-333.

Gershon, R. K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. Immunology *18*, 723-737.

Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X. L., Trinchieri, G., O'Garra, A., and Liu, Y. J. (2002). The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med *195*, 953-958.

Gilliet, M., and Liu, Y. J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med *195*, 695-704.

Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., and Noelle, R. J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. J Immunol *174*, 1783-1786.

Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Fernandez-Martin, A., Ganea, D., and Delgado, M. (2006). Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. Blood *107*, 3632-3638.

Goodwin, R. G., Alderson, M. R., Smith, C. A., Armitage, R. J., VandenBos, T., Jerzy, R., Tough, T. W., Schoenborn, M. A., Davis-Smith, T., Hennen, K., and et al. (1993). Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. Cell *73*, 447-456.

Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. Cell *111*, 927-930.

Gould, D. S., and Auchincloss, H., Jr. (1999). Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. Immunol Today *20*, 77-82.

Graca, L., Thompson, S., Lin, C. Y., Adams, E., Cobbold, S. P., and Waldmann, H. (2002). Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. J Immunol *168*, 5558-5565.

Graf, B., Bushnell, T., and Miller, J. (2007). LFA-1-mediated T cell costimulation through increased localization of TCR/class II complexes to the central supramolecular activation cluster and exclusion of CD45 from the immunological synapse. J Immunol *179*, 1616-1624.

Gramaglia, I., Jember, A., Pippig, S. D., Weinberg, A. D., Killeen, N., and Croft, M. (2000). The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. J Immunol *165*, 3043-3050.

Green, E. A., Gorelik, L., McGregor, C. M., Tran, E. H., and Flavell, R. A. (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*, 10878-10883.

Greenwald, R. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2005). The B7 family revisited. Annu Rev Immunol *23*, 515-548.

Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smiroldo, S., Davalli, A. M., and Adorini, L. (2001). Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. J Immunol *167*, 1945-1953.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat Immunol *3*, 1097-1101.

Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P., and Ley, T. J. (2004a). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. Immunity *21*, 589-601.

Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P., and Ley, T. J. (2004b). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. Blood *104*, 2840-2848.

Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. J Exp Med *184*, 19-29.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature *389*, 737-742.

Guermonprez, P., and Amigorena, S. (2005). Pathways for antigen cross presentation. Springer Semin Immunopathol *26*, 257-271.

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. Nature *425*, 397-402.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol *20*, 621-667.

Guo, Z., Meng, L., Kim, O., Wang, J., Hart, J., He, G., Alegre, M. L., Thistlethwaite, J. R., Jr., Pearson, T. C., Larsen, C. P., and Newell, K. A. (2001). CD8 T cell-mediated rejection of intestinal allografts is resistant to inhibition of the CD40/CD154 costimulatory pathway. Transplantation *71*, 1351-1354.

Habib-Agahi, M., Jaberipour, M., and Searle, P. F. (2009). 4-1BBL costimulation retrieves CD28 expression in activated T cells. Cell Immunol *256*, 39-46.

Habicht, A., Dada, S., Jurewicz, M., Fife, B. T., Yagita, H., Azuma, M., Sayegh, M. H., and Guleria, I. (2007). A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. J Immunol *179*, 5211-5219.

Habiro, K., Shimmura, H., Kobayashi, S., Kotani, M., Ishida, Y., Tanabe, K., Toma, H., and Abe, R. (2005). Effect of inflammation on costimulation blockade-resistant allograft rejection. Am J Transplant *5*, 702-711.

Hackstein, H., Morelli, A. E., Larregina, A. T., Ganster, R. W., Papworth, G. D., Logar, A. J., Watkins, S. C., Falo, L. D., and Thomson, A. W. (2001). Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. J Immunol *166*, 7053-7062.

Hackstein, H., Taner, T., Zahorchak, A. F., Morelli, A. E., Logar, A. J., Gessner, A., and Thomson, A. W. (2003). Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. Blood *101*, 4457-4463.

Hackstein, H., and Thomson, A. W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. Nat Rev Immunol *4*, 24-34.

Hamdi, H., Godot, V., Maillot, M. C., Prejean, M. V., Cohen, N., Krzysiek, R., Lemoine, F. M., Zou, W., and Emilie, D. (2007). Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. Blood *110*, 211-219.

Harris, T. J., Grosso, J. F., Yen, H. R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E. L., Getnet, D., Goldberg, M. V., Maris, C. H., *et al.* (2007). Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. J Immunol *179*, 4313-4317.

Harrison, J. M., Bertram, E. M., Boyle, D. B., Coupar, B. E., Ranasinghe, C., and Ramshaw, I. A. (2006). 4-1BBL coexpression enhances HIV-specific CD8 T cell memory in a poxvirus prime-boost vaccine. Vaccine *24*, 6867-6874.

Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood *90*, 3245-3287.

Hart, D. N., and McKenzie, J. L. (1988). Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. J Exp Med *168*, 157-170.

Haskova, Z., Usiu, N., Pepose, J. S., Ferguson, T. A., and Stuart, P. M. (2000). CD4+ T cells are critical for corneal, but not skin, allograft rejection. Transplantation *69*, 483-487.

Hawrylowicz, C. M., and O'Garra, A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol *5*, 271-283.

Hazeki, K., Nigorikawa, K., and Hazeki, O. (2007). Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. Biol Pharm Bull *30*, 1617-1623.

Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., and Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. Immunol Rev *199*, 9-26.

Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., *et al.* (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. Eur J Immunol *33*, 2987-2997.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature *408*, 740-745.

Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., *et al.* (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. Int Immunol *13*, 695-704.

Hilchey, S. P., De, A., Rimsza, L. M., Bankert, R. B., and Bernstein, S. H. (2007). Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells. J Immunol *178*, 4051-4061.

Hill, J. A., Ichim, T. E., Kusznieruk, K. P., Li, M., Huang, X., Yan, X., Zhong, R., Cairns, E., Bell, D. A., and Min, W. P. (2003). Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA. J Immunol *171*, 691-696.

Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2006). Supernatant of Bifidobacterium breve induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. J Allergy Clin Immunol *117*, 696-702.

Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquin, C., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2008). Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. PLoS ONE *3*, e2753.

Holzelova, E., Vonarbourg, C., Stolzenberg, M. C., Arkwright, P. D., Selz, F., Prieur, A. M., Blanche, S., Bartunkova, J., Vilmer, E., Fischer, A., *et al.* (2004). Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. N Engl J Med *351*, 1409-1418.

Horibe, E. K., Sacks, J., Unadkat, J., Raimondi, G., Wang, Z., Ikeguchi, R., Marsteller, D., Ferreira, L. M., Thomson, A. W., Lee, W. P., and Feili-Hariri, M. (2008). Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed dendritic cells promote indefinite survival of vascularized skin allografts in association with T regulatory cell expansion. Transpl Immunol *18*, 307-318.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol *168*, 4531-4537.

Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. J Exp Med *191*, 435-444.

Huang, Y. M., Hussien, Y., Yarilin, D., Xiao, B. G., Liu, Y. J., and Link, H. (2001). Interferon-beta induces the development of type 2 dendritic cells. Cytokine *13*, 264-271.

Hunger, R. E., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Sugaya, M., Burdick, A. E., Rea, T. H., Brennan, P. J., Belisle, J. T., Blauvelt, A., Porcelli, S. A., and Modlin, R. L. (2004). Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. J Clin Invest *113*, 701-708.

Ichikawa, H. T., Williams, L. P., and Segal, B. M. (2002). Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease. J Immunol *169*, 2781-2787.

Inaba, K., and Steinman, R. M. (1987). Dendritic and B-cell function during antibody responses in normal and immunodeficient (xid) mouse spleen cultures. Cell Immunol *105*, 432-442.

Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. J Biol Chem *274*, 14560-14567.

Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., *et al.* (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. J Biol Chem *278*, 5509-5512.

Ip, W. K., and Lau, Y. L. (2004). Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases. J Immunol *173*, 189-196.

Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. J Immunol *172*, 4253-4259.

Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., *et al.* (1999). A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. J Immunol *163*, 1409-1419.

Ito, T., Wang, Y. H., and Liu, Y. J. (2005). Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. Springer Semin Immunopathol *26*, 221-229.

Ito, T., Yang, M., Wang, Y. H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O. A., Qin, X. F., Liu, Y. J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. J Exp Med *204*, 105-115.

Ivanov, II, McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell *126*, 1121-1133.

Ivars, F. (1992). T cell subset-specific expression of antigen receptor beta chains in alpha chain-transgenic mice. Eur J Immunol *22*, 635-639.

Iwasaki, A. (2007). Mucosal dendritic cells. Annu Rev Immunol *25*, 381-418.

Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. Annu Rev Immunol *20*, 197-216.

Jankovic, D., Kullberg, M. C., Feng, C. G., Goldszmid, R. S., Collazo, C. M., Wilson, M., Wynn, T. A., Kamanaka, M., Flavell, R. A., and Sher, A. (2007). Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. J Exp Med *204*, 273-283.

Janssens, W., Carlier, V., Wu, B., VanderElst, L., Jacquemin, M. G., and Saint-Remy, J. M. (2003). CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. J Immunol *171*, 4604-4612.

Jayakumar, A., Donovan, M. J., Tripathi, V., Ramalho-Ortigao, M., and McDowell, M. A. (2008). Leishmania major infection activates NF-kappaB and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells. Infect Immun *76*, 2138-2148.

Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J. A., Connolly, J., Banchereau, J., and Mellman, I. (2007). Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. Immunity *27*, 610-624.

Jiang, S., Camara, N., Lombardi, G., and Lechler, R. I. (2003). Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. Blood *102*, 2180-2186.

Jiang, S., Herrera, O., and Lechler, R. I. (2004). New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. Curr Opin Immunol *16*, 550-557.

Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y. H., Dakhama, A., and Gelfand, E. W. (2007). Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. J Immunol *178*, 1433-1442.

Johansson, C., and Kelsall, B. L. (2005). Phenotype and function of intestinal dendritic cells. Semin Immunol *17*, 284-294.

Johnson, K. G., Bromley, S. K., Dustin, M. L., and Thomas, M. L. (2000). A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 10138-10143.

Jones, N. D., Carvalho-Gaspar, M., Luo, S., Brook, M. O., Martin, L., and Wood, K. J. (2006). Effector and memory CD8+ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4+ T cell help. J Immunol *176*, 2316-2323.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. Eur J Immunol *27*, 3135-3142.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med *192*, 1213-1222.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J Exp Med *193*, 1285-1294.

Jorgensen, J. L., Reay, P. A., Ehrich, E. W., and Davis, M. M. (1992). Molecular components of T-cell recognition. Annu Rev Immunol *10*, 835-873.

Josien, R., Douillard, P., Guillot, C., Muschen, M., Anegon, I., Chetritt, J., Menoret, S., Vignes, C., Soulillou, J. P., and Cuturi, M. C. (1998). A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. J Clin Invest *102*, 1920-1926.

Kabelitz, D., Pohl, T., and Pechhold, K. (1993). Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. Immunol Today *14*, 338-339.

Kadowaki, N. (2007). Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. Allergol Int *56*, 193-199.

Kaisho, T., and Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol *117*, 979-987; quiz 988.

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.

Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L., and Manz, M. G. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. J Exp Med *198*, 305-313.

Karulin, A. Y., Hesse, M. D., Tary-Lehmann, M., and Lehmann, P. V. (2000). Single-cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity. J Immunol *164*, 1862-1872.

Kast, W. M., Van Twuyver, E., Mooijaart, R. J., Verveld, M., Kamphuis, A. G., Melief, C. J., and De Waal, L. P. (1988). Mechanism of skin allograft enhancement across an H-2 class I mutant difference. Evidence for involvement of veto cells. Eur J Immunol *18*, 2105-2108.

Katz, S. I., Tamaki, K., and Sachs, D. H. (1979). Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. Nature *282*, 324-326.

Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. Trends Mol Med *13*, 460-469.

Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., and Lloyd, C. M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. J Exp Med *202*, 1539-1547.

Kemper, C., and Atkinson, J. P. (2007). T-cell regulation: with complements from innate immunity. Nat Rev Immunol *7*, 9-18.

Kemper, C., Chan, A. C., Green, J. M., Brett, K. A., Murphy, K. M., and Atkinson, J. P. (2003). Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. Nature *421*, 388-392.

King, I. L., and Mohrs, M. (2009). IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. J Exp Med *206*, 1001-1007.

Knoechel, B., Lohr, J., Zhu, S., Wong, L., Hu, D., Ausubel, L., and Abbas, A. K. (2006). Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. J Immunol *176*, 6473-6483.

Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R. A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science *307*, 731-734.

Kobie, J. J., Shah, P. R., Yang, L., Rebhahn, J. A., Fowell, D. J., and Mosmann, T. R. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. J Immunol *177*, 6780-6786.

Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., and Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. Nat Immunol *10*, 595-602.

Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M. E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H., and Hori, S. (2009). Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 1903-1908.

Koning, F., Maloy, W. L., and Coligan, J. E. (1990). The implications of subunit interactions for the structure of the T cell receptor-CD3 complex. Eur J Immunol *20*, 299-305.

Krause, P., Bruckner, M., Uermosi, C., Singer, E., Groettrup, M., and Legler, D. F. (2009). Prostaglandin E(2) enhances T-cell proliferation by inducing the costimulatory molecules OX40L, CD70, and 4-1BBL on dendritic cells. Blood *113*, 2451-2460.

Krensky, A. M., Weiss, A., Crabtree, G., Davis, M. M., and Parham, P. (1990). T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. N Engl J Med *322*, 510-517.

Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. Eur J Immunol *31*, 3026-3037.

Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S. H., and Mittrucker, H. W. (2002). Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. J Exp Med *196*, 1585-1592.

Kursar, M., Koch, M., Mittrucker, H. W., Nouailles, G., Bonhagen, K., Kamradt, T., and Kaufmann, S. H. (2007). Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis. J Immunol *178*, 2661-2665.

Kurtz, J., Raval, F., Vallot, C., Der, J., and Sykes, M. (2009). CTLA-4 on alloreactive CD4 T cells interacts with recipient CD80/86 to promote tolerance. Blood *113*, 3475-3484.

Kyriakis, J. M. (1999). Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. Gene Expr *7*, 217-231.

La Cava, A., Van Kaer, L., and Fu Dong, S. (2006). CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. Trends Immunol *27*, 322-327.

Lagaraine, C., Hoarau, C., Chabot, V., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2005). Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. Int Immunol *17*, 351-363.

Lagaraine, C., and Lebranchu, Y. (2003). Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. Transplantation *75*, 37S-42S.

Lagaraine, C., Lemoine, R., Baron, C., Nivet, H., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2008). Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. J Leukoc Biol.

Lakkis, F. G., Arakelov, A., Konieczny, B. T., and Inoue, Y. (2000). Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. Nat Med *6*, 686-688.

Lan, R. Y., Ansari, A. A., Lian, Z. X., and Gershwin, M. E. (2005). Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. Autoimmun Rev *4*, 351-363.

Larsen, C. P., Steinman, R. M., Witmer-Pack, M., Hankins, D. F., Morris, P. J., and Austyn, J. M. (1990). Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. J Exp Med *172*, 1483-1493.

Larsson, M., Messmer, D., Somersan, S., Fonteneau, J. F., Donahoe, S. M., Lee, M., Dunbar, P. R., Cerundolo, V., Julkunen, I., Nixon, D. F., and Bhardwaj, N. (2000). Requirement of mature dendritic cells for efficient activation of influenza A-specific memory CD8+ T cells. J Immunol *165*, 1182-1190.

Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., *et al.* (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol *2*, 261-268.

Le Moine, A., and Goldman, M. (2003). Non-classical pathways of cell-mediated allograft rejection: new challenges for tolerance induction? Am J Transplant *3*, 101-106.

Lechler, R. I., and Batchelor, J. R. (1982a). Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. J Exp Med *156*, 1835-1841.

Lechler, R. I., and Batchelor, J. R. (1982b). Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. J Exp Med *155*, 31-41.

Lecoeur, H., Fevrier, M., Garcia, S., Riviere, Y., and Gougeon, M. L. (2001). A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. J Immunol Methods *253*, 177-187.

Lee, A. W., Truong, T., Bickham, K., Fonteneau, J. F., Larsson, M., Da Silva, I., Somersan, S., Thomas, E. K., and Bhardwaj, N. (2002a). A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. Vaccine *20 Suppl 4*, A8-A22.

Lee, G. K., Park, H. J., Macleod, M., Chandler, P., Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2002b). Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. Immunology *107*, 452-460.

Lee, J. I., Ganster, R. W., Geller, D. A., Burckart, G. J., Thomson, A. W., and Lu, L. (1999). Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. Transplantation *68*, 1255-1263.

Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B., and Bluestone, J. A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. Science *282*, 2263-2266.

Lee, Y. K., Mukasa, R., Hatton, R. D., and Weaver, C. T. (2009). Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. Curr Opin Immunol *21*, 274-280.

Lee, Y. R., Yang, I. H., Lee, Y. H., Im, S. A., Song, S., Li, H., Han, K., Kim, K., Eo, S. K., and Lee, C. K. (2005). Cyclosporin A and tacrolimus, but not rapamycin, inhibit MHC-restricted antigen presentation pathways in dendritic cells. Blood *105*, 3951-3955.

Lennert, K., and Remmele, W. (1958). [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]. Acta Haematol *19*, 99-113.

Levings, M. K., and Roncarolo, M. G. (2005). Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. Curr Top Microbiol Immunol *293*, 303-326.

Li, M. O., Wan, Y. Y., and Flavell, R. A. (2007). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. Immunity *26*, 579-591.

Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., *et al.* (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. J Immunol *180*, 5916-5926.

Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol *3*, 361-370.

Lin, M. T., Storer, B., Martin, P. J., Tseng, L. H., Gooley, T., Chen, P. J., and Hansen, J. A. (2003). Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. N Engl J Med *349*, 2201-2210.

Lin, M. T., Storer, B., Martin, P. J., Tseng, L. H., Grogan, B., Chen, P. J., Zhao, L. P., and Hansen, J. A. (2005). Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation: synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor beta genotype of donor. Blood *106*, 3995-4001.

Lindahl, K. F., and Wilson, D. B. (1977). Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. I. Estimates of the absolute frequency of killer cells generated in vitro. J Exp Med *145*, 500-507.

Ling, V., Wu, P. W., Spaulding, V., Kieleczawa, J., Luxenberg, D., Carreno, B. M., and Collins, M. (2003). Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. Genomics *82*, 365-377.

Lisbonne, M., and Leite-de-Moraes, M. C. (2003). Invariant Valpha14 NKT lymphocytes: a double-edged immuno-regulatory T cell population. Eur Cytokine Netw *14*, 4-14.

Liu, Y. J., Xu, J., de Bouteiller, O., Parham, C. L., Grouard, G., Djossou, O., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Banchereau, J., and Moore, K. W. (1997). Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform. J Exp Med *185*, 165-170.

Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., and Linehan, D. C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. J Immunol *169*, 2756-2761.

Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R., and Lechler, R. (1994). Anergic T cells as suppressor cells in vitro. Science *264*, 1587-1589.

Loser, K., Apelt, J., Voskort, M., Mohaupt, M., Balkow, S., Schwarz, T., Grabbe, S., and Beissert, S. (2007). IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. J Immunol *179*, 365-371.

Lotze, M. T., and Tracey, K. J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat Rev Immunol *5*, 331-342.

Lu, L., Lee, W. C., Takayama, T., Qian, S., Gambotto, A., Robbins, P. D., and Thomson, A. W. (1999). Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4Ig). J Leukoc Biol *66*, 293-296.

Lukacs-Kornek, V., Engel, D., Tacke, F., and Kurts, C. (2008). The role of chemokines and their receptors in dendritic cell biology. Front Biosci *13*, 2238-2252.

Lunsford, K. E., Horne, P. H., Koester, M. A., Eiring, A. M., Walker, J. P., Dziema, H. L., and Bumgardner, G. L. (2006). Activation and maturation of alloreactive CD4-independent, CD8 cytolytic T cells. Am J Transplant *6*, 2268-2281.

Mahnke, K., Ring, S., Johnson, T. S., Schallenberg, S., Schonfeld, K., Storn, V., Bedke, T., and Enk, A. H. (2007). Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. Eur J Immunol *37*, 2117-2126.

Manavalan, J. S., Rossi, P. C., Vlad, G., Piazza, F., Yarilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., and Suciu-Foca, N. (2003). High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. Transpl Immunol *11*, 245-258.

Manolios, N., Letourneur, F., Bonifacino, J. S., and Klausner, R. D. (1991). Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. Embo J *10*, 1643-1651.

Margalit, M., and Ilan, Y. (2005). Induction of immune tolerance: a role for Natural killer T lymphocytes? Liver Int *25*, 501-504.

Marth, T., Zeitz, M., Ludviksson, B. R., Strober, W., and Kelsall, B. L. (1999). Extinction of IL-12 signaling promotes Fas-mediated apoptosis of antigen-specific T cells. J Immunol *162*, 7233-7240.

Martin, P. J. (1993). Donor CD8 cells prevent allogeneic marrow graft rejection in mice: potential implications for marrow transplantation in humans. J Exp Med *178*, 703-712.

Martin, S. R., and Bayley, P. M. (2002). Regulatory implications of a novel mode of interaction of calmodulin with a double IQ-motif target sequence from murine dilute myosin V. Protein Sci *11*, 2909-2923.

Martinon, F., and Tschopp, J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. Trends Immunol *26*, 447-454.

Matasic, R., Dietz, A. B., and Vuk-Pavlovic, S. (2000). Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin. Immunology *101*, 53-60.

Mathur, A. N., Chang, H. C., Zisoulis, D. G., Stritesky, G. L., Yu, Q., O'Malley, J. T., Kapur, R., Levy, D. E., Kansas, G. S., and Kaplan, M. H. (2007). Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. J Immunol *178*, 4901-4907.

McAdam, A. J., Schweitzer, A. N., and Sharpe, A. H. (1998). The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. Immunol Rev *165*, 231-247.

McColl, S. R. (2002). Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. Immunol Cell Biol *80*, 489-496.

McKenna, K., Beignon, A. S., and Bhardwaj, N. (2005). Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. J Virol *79*, 17-27.

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol *1*, 135-145.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature *388*, 394-397.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. Mol Cell *2*, 253-258.

Mehling, A., Grabbe, S., Voskort, M., Schwarz, T., Luger, T. A., and Beissert, S. (2000). Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. J Immunol *165*, 2374-2381.

Mele, T. S., and Halloran, P. F. (2000). The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. Immunopharmacology *47*, 215-245.

Melero, I., Bach, N., and Chen, L. (1997). Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T lymphocytes in immune responses to tumor antigens. Life Sci *60*, 2035-2041.

Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol *4*, 762-774.

Mempel, T. R., Pittet, M. J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H., and von Andrian, U. H. (2006). Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. Immunity *25*, 129-141.

Menard, S., Candalh, C., Ben Ahmed, M., Rakotobe, S., Gaboriau-Routhiau, V., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2006). Stimulation of immunity without alteration of oral tolerance in mice fed with heat-treated fermented infant formula. J Pediatr Gastroenterol Nutr *43*, 451-458.

Menard, S., Laharie, D., Asensio, C., Vidal-Martinez, T., Candalh, C., Rullier, A., Zerbib, F., Megraud, F., Matysiak-Budnik, T., and Heyman, M. (2005). Bifidobacterium breve and Streptococcus thermophilus secretion products enhance T helper 1 immune response and intestinal barrier in mice. Exp Biol Med (Maywood) *230*, 749-756.

Messmer, D., Yang, H., Telusma, G., Knoll, F., Li, J., Messmer, B., Tracey, K. J., and Chiorazzi, N. (2004). High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. J Immunol *173*, 307-313.

Meuer, S. C., Acuto, O., Hercend, T., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L. (1984). The human T-cell receptor. Annu Rev Immunol *2*, 23-50.

Miller, J. F., and Heath, W. R. (1993). Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. Immunol Rev *133*, 131-150.

Miller, M. L., Sun, Y., and Fu, Y. X. (2009). Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator signaling on NKT cells inhibits cytokine release and tissue injury in early immune responses. J Immunol *183*, 32-36.

Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D., and Kaveri, S. V. (2004). Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. J Immunol *172*, 4676-4680.

Mittendorf, E. A., Storrer, C. E., Shriver, C. D., Ponniah, S., and Peoples, G. E. (2005). Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+ cells recognizing HER2/neu vaccine peptides. Breast Cancer Res Treat *92*, 85-93.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., *et al.* (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity *30*, 899-911.

Mizumoto, N., and Takashima, A. (2004). CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. J Clin Invest *113*, 658-660.

Mondino, A., and Jenkins, M. K. (1994). Surface proteins involved in T cell costimulation. J Leukoc Biol *55*, 805-815.

Monti, P., Mercalli, A., Leone, B. E., Valerio, D. C., Allavena, P., and Piemonti, L. (2003). Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. Transplantation *75*, 137-145.

Morelli, A. E., and Thomson, A. W. (2003). Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. Immunol Rev *196*, 125-146.

Morelli, A. E., and Thomson, A. W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. Nat Rev Immunol *7*, 610-621.

Morelon, E., Mamzer-Bruneel, M. F., Peraldi, M. N., and Kreis, H. (2001). Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. Nephrol Dial Transplant *16*, 18-20.

Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A. M., Liu, Y. J., Blazar, B. R., and Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol *173*, 4433-4442.

Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol *7*, 145-173.

Mullie, C., Yazourh, A., Singer, E., Lecroix, F., Blareau, J. P., Romond, M. B., and Romond, C. (2002). Partial characterization of bifidobacterium breve C50 cell-free whey compounds inducing modifications to the intestinal microflora. J Dairy Sci *85*, 1383-1389.

Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., *et al.* (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. Science *297*, 1867-1870.

Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J., and Marrack, P. (2002). CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 8832-8837.

Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Ndhlovu, L. C., Nose, M., Noda, T., and Sugamura, K. (2000). Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. J Exp Med *191*, 365-374.

Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A. D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M. R., Sayegh, M. H., and Khoury, S. J. (2003). Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. J Clin Invest *112*, 1037-1048.

Nakagawa, S., Ohtani, T., Mizuashi, M., Mollah, Z. U., Ito, Y., Tagami, H., and Aiba, S. (2004). p38 Mitogen-Activated protein kinase mediates dual role of ultraviolet B radiation in induction of maturation and apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. J Invest Dermatol *123*, 361-370.

Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H., and Furue, M. (2006). Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. J Dermatol Sci *42*, 1-11.

Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., and Moroi, Y. (2004). Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Int Immunol *16*, 1701-1709.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (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*, 629-644.

Newell, K. A., He, G., Guo, Z., Kim, O., Szot, G. L., Rulifson, I., Zhou, P., Hart, J., Thistlethwaite, J. R., and Bluestone, J. A. (1999). Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells. J Immunol *163*, 2358-2362.

Ng, W. F., Duggan, P. J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A. D., Isaacs, J. D., and Lechler, R. I. (2001). Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. Blood *98*, 2736-2744.

Niedbala, W., Cai, B., Liu, H., Pitman, N., Chang, L., and Liew, F. Y. (2007). Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 15478-15483.

Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesia of the gonad after neonatal thymectomy in mice. Science *166*, 753-755.

Nolan, K. F., Strong, V., Soler, D., Fairchild, P. J., Cobbold, S. P., Croxton, R., Gonzalo, J. A., Rubio, A., Wells, M., and Waldmann, H. (2004). IL-10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals. J Immunol *172*, 2201-2209.

Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C. M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. Immunology *118*, 240-249.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. J Biol Chem *276*, 4812-4818.

Ohashi, P. S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C. T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. Cell *65*, 305-317.

Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. J Immunol *159*, 3838-3848.

Oida, T., Zhang, X., Goto, M., Hachimura, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S., and Weiner, H. L. (2003). CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. J Immunol *170*, 2516-2522.

Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 10113-10118.

Opitz, B., Puschel, A., Beermann, W., Hocke, A. C., Forster, S., Schmeck, B., van Laak, V., Chakraborty, T., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2006). Listeria monocytogenes activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. J Immunol *176*, 484-490.

O'Shea, J. J., Ma, A., and Lipsky, P. (2002). Cytokines and autoimmunity. Nat Rev Immunol *2*, 37-45.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nat Immunol *8*, 1353-1362.

Papiernik, M., and Banz, A. (2001). Natural regulatory CD4 T cells expressing CD25. Microbes Infect *3*, 937-945.

Papiernik, M., de Moraes, M. L., Pontoux, C., Vasseur, F., and Penit, C. (1998). Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. Int Immunol *10*, 371-378.

Parra, E., Wingren, A. G., Hedlund, G., Bjorklund, M., Sjogren, H. O., Kalland, T., Sansom, D., and Dohlsten, M. (1994). Costimulation of human CD4+ T lymphocytes with B7 and lymphocyte function-associated antigen-3 results in distinct cell activation profiles. J Immunol *153*, 2479-2487.

Pedersen, A. E., Gad, M., Walter, M. R., and Claesson, M. H. (2004). Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3). Immunol Lett *91*, 63-69.

Penna, G., and Adorini, L. (2000). 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. J Immunol *164*, 2405-2411.

Peters, P. J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J. W., and Geuze, H. J. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. J Exp Med *173*, 1099-1109.

Piccirillo, C. A., Letterio, J. J., Thornton, A. M., McHugh, R. S., Mamura, M., Mizuhara, H., and Shevach, E. M. (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*, 237-246.

Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. J Immunol *167*, 1137-1140.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science *282*, 2085-2088.

Popov, I. A., Fedoseyeva, E. V., Orr, P. L., Garovoy, M. R., and Benichou, G. (1995). Direct evidence for in vivo induction of CD8+ cytotoxic T cells directed to donor MHC class I peptides following mouse allotransplantation. Transplantation *60*, 1621-1624.

Powrie, F., Carlino, J., Leach, M. W., Mauze, S., and Coffman, R. L. (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*, 2669-2674.

Prasad, D. V., Nguyen, T., Li, Z., Yang, Y., Duong, J., Wang, Y., and Dong, C. (2004). Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. J Immunol *173*, 2500-2506.

Prasad, D. V., Richards, S., Mai, X. M., and Dong, C. (2003). B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. Immunity *18*, 863-873.

Prickett, T. C., McKenzie, J. L., and Hart, D. N. (1988). Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. Transplantation *46*, 754-761.

Puccetti, P., and Grohmann, U. (2007). IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. Nat Rev Immunol *7*, 817-823.

Puig-Kroger, A., Sanz-Rodriguez, F., Longo, N., Sanchez-Mateos, P., Botella, L., Teixido, J., Bernabeu, C., and Corbi, A. L. (2000). Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. J Immunol *165*, 4338-4345.

Pulendran, B. (2004). Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. Immunol Rev *199*, 227-250.

Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F., and Noelle, R. J. (2004). CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. Annu Rev Immunol *22*, 307-328.

Randolph, G. J. (2001). Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. Semin Immunol *13*, 267-274.

Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M. B., Layton, G. T., Rainer, C., Senior, R. M., Shipley, J. M., Fritsch, P., Schuler, G., and Romani, N. (2002). Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. J Immunol *168*, 4361-4371.

Reinhardt, R. L., Liang, H. E., and Locksley, R. M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. Nat Immunol *10*, 385-393.

Reis e Sousa, C., Edwards, A. D., Manickasingham, S. P., and Schulz, O. (2001). Conditioning of dendritic cells by pathogen-derived stimuli. Immunobiology *204*, 595-597.

Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., and Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. Cell Death Differ *14*, 2076-2084.

Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. J Exp Med *188*, 2175-2180.

Richards, D. M., Dalheimer, S. L., Ehst, B. D., Vanasek, T. L., Jenkins, M. K., Hertz, M. I., and Mueller, D. L. (2004). Indirect minor histocompatibility antigen presentation by allograft recipient cells in the draining lymph node leads to the activation and clonal expansion of CD4+ T cells that cause obliterative airways disease. J Immunol *172*, 3469-3479.

Riley, J. L., and June, C. H. (2005). The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. Blood *105*, 13-21.

Riley, J. L., Mao, M., Kobayashi, S., Biery, M., Burchard, J., Cavet, G., Gregson, B. P., June, C. H., and Linsley, P. S. (2002). Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 11790-11795.

Rock, K. L., Hearn, A., Chen, C. J., and Shi, Y. (2005). Natural endogenous adjuvants. Springer Semin Immunopathol *26*, 231-246.

Romond, M. B., Ais, A., Guillemot, F., Bounouader, R., Cortot, A., and Romond, C. (1998). Cell-free whey from milk fermented with Bifidobacterium breve C50 used to modify the colonic microflora of healthy subjects. J Dairy Sci *81*, 1229-1235.

Roncarolo, M. G., Levings, M. K., and Traversari, C. (2001). Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. J Exp Med *193*, F5-9.

Rossi, M., and Young, J. W. (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. J Immunol *175*, 1373-1381.

Roth, E., Schwartzkopff, J., and Pircher, H. (2002). CD40 ligation in the presence of self-reactive CD8 T cells leads to severe immunopathology. J Immunol *168*, 5124-5129.

Rothenfusser, S., Tuma, E., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. Hum Immunol *63*, 1111-1119.

Rouse, B. T. (2007). Regulatory T cells in health and disease. J Intern Med *262*, 78-95.

Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., and Abraham, R. T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. J Biol Chem *270*, 815-822.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol *22*, 531-562.

Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. J Exp Med *161*, 72-87.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol *155*, 1151-1164.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+

regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol Rev *182*, 18-32.

Sakaguchi, S., Wing, K., and Miyara, M. (2007). Regulatory T cells - a brief history and perspective. Eur J Immunol *37 Suppl 1*, S116-123.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (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*, 389-400.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med *179*, 1109-1118.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J Exp Med *187*, 875-883.

Sant'Angelo, D. B., Waterbury, G., Preston-Hurlburt, P., Yoon, S. T., Medzhitov, R., Hong, S. C., and Janeway, C. A., Jr. (1996). The specificity and orientation of a TCR to its peptide-MHC class II ligands. Immunity *4*, 367-376.

Santodonato, L., D'Agostino, G., Nisini, R., Mariotti, S., Monque, D. M., Spada, M., Lattanzi, L., Perrone, M. P., Andreotti, M., Belardelli, F., and Ferrantini, M. (2003). Monocyte-derived dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cell response. J Immunol *170*, 5195-5202.

Saoulli, K., Lee, S. Y., Cannons, J. L., Yeh, W. C., Santana, A., Goldstein, M. D., Bangia, N., DeBenedette, M. A., Mak, T. W., Choi, Y., and Watts, T. H. (1998). CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. J Exp Med *187*, 1849-1862.

Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A. G. (2008). Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. Immunity *28*, 402-413.

Sato, K., and Fujita, S. (2007). Dendritic cells: nature and classification. Allergol Int *56*, 183-191.

Sawyer, G. J., Dalchau, R., and Fabre, J. W. (1993). Indirect T cell allorecognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens. Transpl Immunol *1*, 77-81.

Sayegh, M. H., Perico, N., Gallon, L., Imberti, O., Hancock, W. W., Remuzzi, G., and Carpenter, C. B. (1994). Mechanisms of acquired thymic unresponsiveness to renal allografts. Thymic recognition of immunodominant allo-MHC peptides induces peripheral T cell anergy. Transplantation *58*, 125-132.

Schildknecht, A., Miescher, I., Yagita, H., and van den Broek, M. (2007). Priming of CD8+ T cell responses by pathogens typically depends on CD70-mediated interactions with dendritic cells. Eur J Immunol *37*, 716-728.

Schwartz, R., and Dameshek, W. (1959). Drug-induced immunological tolerance. Nature *183*, 1682-1683.

Schwartz, R. H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. Science *248*, 1349-1356.

Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. Annu Rev Immunol *21*, 305-334.

Seder, R. A., Marth, T., Sieve, M. C., Strober, W., Letterio, J. J., Roberts, A. B., and Kelsall, B. (1998). Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. J Immunol *160*, 5719-5728.

Seong, S. Y., and Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. Nat Rev Immunol *4*, 469-478.

Seya, T., Funami, K., Taniguchi, M., and Matsumoto, M. (2005). Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. J Endotoxin Res *11*, 369-374.

Sharpe, A. H., and Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol *2*, 116-126.

Shedlock, D. J., Whitmire, J. K., Tan, J., MacDonald, A. S., Ahmed, R., and Shen, H. (2003). Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during Listeria monocytogenes infection. J Immunol *170*, 2053-2063.

Shen, L., and Rock, K. L. (2006). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. Curr Opin Immunol *18*, 85-91.

Shevach, E. M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol *2*, 389-400.

Shevach, E. M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. Immunity *25*, 195-201.

Shevach, E. M., McHugh, R. S., Thornton, A. M., Piccirillo, C., Natarajan, K., and Margulies, D. H. (2001). Control of autoimmunity by regulatory T cells. Adv Exp Med Biol *490*, 21-32.

Shi, G., Cox, C. A., Vistica, B. P., Tan, C., Wawrousek, E. F., and Gery, I. (2008). Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. J Immunol *181*, 7205-7213.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nat Immunol *3*, 135-142.

Shimizu, K., Fujii, S., Fujimoto, K., Kawa, K., Yamada, A., and Kawano, F. (2000). Tacrolimus (FK506) treatment of CD34+ hematopoietic progenitor cells promote the development of dendritic cells that drive CD4+ T cells toward Th2 responses. J Leukoc Biol *68*, 633-640.

Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol *2*, 151-161.

Shortman, K., and Naik, S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. Nat Rev Immunol *7*, 19-30.
Shortman, K., Vremec, D., Corcoran, L. M., Georgopoulos, K., Lucas, K., and Wu, L. (1998). The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. Immunol Rev *165*, 39-46.

Sica, G. L., Choi, I. H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S. D., Tamura, H., Chapoval, A. I., Flies, D. B., Bajorath, J., and Chen, L. (2003). B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. Immunity *18*, 849-861.

Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. Science *284*, 1835-1837.

Singer, G. G., Carrera, A. C., Marshak-Rothstein, A., Martinez, C., and Abbas, A. K. (1994). Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. Curr Opin Immunol *6*, 913-920.

Sojka, D. K., Huang, Y. H., and Fowell, D. J. (2008). Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. Immunology *124*, 13-22.

Sordi, V., Bianchi, G., Buracchi, C., Mercalli, A., Marchesi, F., D'Amico, G., Yang, C. H., Luini, W., Vecchi, A., Mantovani, A., *et al.* (2006). Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin. Transplantation *82*, 826-834.

Sotomayor, E. M., Borrello, I., Tubb, E., Rattis, F. M., Bien, H., Lu, Z., Fein, S., Schoenberger, S., and Levitsky, H. I. (1999). Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40. Nat Med *5*, 780-787.

Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. Cytokine Growth Factor Rev *16*, 581-592.

Sperling, A. I., Sedy, J. R., Manjunath, N., Kupfer, A., Ardman, B., and Burkhardt, J. K. (1998). TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. J Immunol *161*, 6459-6462.

Sprent, J., and Kishimoto, H. (2002). The thymus and negative selection. Immunol Rev *185*, 126-135.
Sprent, J., and Webb, S. R. (1995). Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. Curr Opin Immunol *7*, 196-205.

Srivastava, P. K., and Maki, R. G. (1991). Stress-induced proteins in immune response to cancer. Curr Top Microbiol Immunol *167*, 109-123.

Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A. H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. Blood *99*, 2468-2476.

Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol *9*, 271-296.

Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med *137*, 1142-1162.

Steinmuller, D. (1985). Which T cells mediate allograft rejection? Transplantation *40*, 229-233.

Steinschulte, C., Taner, T., Thomson, A. W., Bein, G., and Hackstein, H. (2003). Cutting edge: sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells. J Immunol *171*, 542-546.

Stephens, G. L., McHugh, R. S., Whitters, M. J., Young, D. A., Luxenberg, D., Carreno, B. M., Collins, M., and Shevach, E. M. (2004). Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. J Immunol *173*, 5008-5020.

Stephens, L. A., Mottet, C., Mason, D., and Powrie, F. (2001). Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. Eur J Immunol *31*, 1247-1254.

Stohlman, S. A., Bergmann, C. C., Lin, M. T., Cua, D. J., and Hinton, D. R. (1998). CTL effector function within the central nervous system requires CD4+ T cells. J Immunol *160*, 2896-2904.

Stoitzner, P., Holzmann, S., McLellan, A. D., Ivarsson, L., Stossel, H., Kapp, M., Kammerer, U., Douillard, P., Kampgen, E., Koch, F., *et al.* (2003). Visualization and characterization of migratory

Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207. J Invest Dermatol *120*, 266-274.

Strauss, L., Bergmann, C., Gooding, W., Johnson, J. T., and Whiteside, T. L. (2007a). The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer Res *13*, 6301-6311.

Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J. T., and Whiteside, T. L. (2007b). A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. Clin Cancer Res *13*, 4345-4354.

Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M. J., Lang, S., Kirkwood, J. M., and Whiteside, T. L. (2008). Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. J Immunol *180*, 2967-2980.

Strauss, L., Bergmann, C., and Whiteside, T. L. (2009). Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. J Immunol *182*, 1469-1480.

Strobl, H., and Knapp, W. (1999). TGF-beta1 regulation of dendritic cells. Microbes Infect *1*, 1283-1290.

Suchin, E. J., Langmuir, P. B., Palmer, E., Sayegh, M. H., Wells, A. D., and Turka, L. A. (2001). Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. J Immunol *166*, 973-981.

Suciu-Foca, N., Reed, E., Marboe, C., Harris, P., Yu, P. X., Sun, Y. K., Ho, E., Rose, E., Reemtsma, K., and King, D. W. (1991). The role of anti-HLA antibodies in heart transplantation. Transplantation *51*, 716-724.

Suh, W. K., Gajewska, B. U., Okada, H., Gronski, M. A., Bertram, E. M., Dawicki, W., Duncan, G. S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., *et al.* (2003). The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. Nat Immunol *4*, 899-906.

Sullivan, K. E., McDonald-McGinn, D., and Zackai, E. H. (2002). CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. Clin Diagn Lab Immunol *9*, 1129-1131.

Sun, W., Wang, Q., Zhang, L., Liu, Y., Zhang, M., Wang, C., Wang, J., and Cao, X. (2003). Blockade of CD40 pathway enhances the induction of immune tolerance by immature dendritic cells genetically modified to express cytotoxic T lymphocyte antigen 4 immunoglobulin. Transplantation *76*, 1351-1359.

Sun, Y., Brown, N. K., Ruddy, M. J., Miller, M. L., Lee, Y., Wang, Y., Murphy, K. M., Pfeffer, K., Chen, L., Kaye, J., and Fu, Y. X. (2009). B and T lymphocyte attenuator tempers early infection immunity. J Immunol *183*, 1946-1951.

Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (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*, 1212-1218.

Sutmuller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G., and Adema, G. J. (2006). Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. J Clin Invest *116*, 485-494.

Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T. (2003). CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. J Exp Med *198*, 889-901.

Swanson, J. A., and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. Trends Cell Biol *5*, 424-428.

Taams, L. S., and Akbar, A. N. (2005). Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Curr Top Microbiol Immunol *293*, 115-131.

Taams, L. S., van Eden, W., and Wauben, M. H. (1999). Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions. Eur J Immunol *29*, 1543-1550.

Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T., and Takada, H. (2005). Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. Infect Immun *73*, 7967-7976.

Tadokoro, C. E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A. C., Maraver, A., Lafaille, J. J., and Dustin, M. L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. J Exp Med *203*, 505-511.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. Int Immunol *10*, 1969-1980.

Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol *17*, 1-14.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. Annu Rev Immunol *21*, 335-376.

Tan, P. H., Sagoo, P., Chan, C., Yates, J. B., Campbell, J., Beutelspacher, S. C., Foxwell, B. M., Lombardi, G., and George, A. J. (2005). Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. J Immunol *174*, 7633-7644.

Tanaka, K., Albin, M. J., Yuan, X., Yamaura, K., Habicht, A., Murayama, T., Grimm, M., Waaga, A. M., Ueno, T., Padera, R. F., *et al.* (2007). PDL1 is required for peripheral transplantation tolerance and protection from chronic allograft rejection. J Immunol *179*, 5204-5210.

Taner, T., Hackstein, H., Wang, Z., Morelli, A. E., and Thomson, A. W. (2005). Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. Am J Transplant *5*, 228-236.

Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R., and Udey, M. C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. Nature *361*, 82-85.

Tang, X., Maricic, I., Purohit, N., Bakamjian, B., Reed-Loisel, L. M., Beeston, T., Jensen, P., and Kumar, V. (2006). Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells. J Immunol *177*, 7645-7655.

Taraban, V. Y., Rowley, T. F., and Al-Shamkhani, A. (2004). Cutting edge: a critical role for CD70 in CD8 T cell priming by CD40-licensed APCs. J Immunol *173*, 6542-6546.

Taylor, P. A., Lees, C. J., Fournier, S., Allison, J. P., Sharpe, A. H., and Blazar, B. R. (2004). B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. J Immunol *172*, 34-39.

Terada, N., Lucas, J. J., Szepesi, A., Franklin, R. A., Domenico, J., and Gelfand, E. W. (1993). Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. J Cell Physiol *154*, 7-15.

Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. Nat Immunol *3*, 1156-1162.

Thibault, H., Aubert-Jacquin, C., and Goulet, O. (2004). Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with Bifidobacterium breve c50 and Streptococcus thermophilus 065) on acute diarrhea in healthy infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr *39*, 147-152.

Thomson, A. W., Turnquist, H. R., and Raimondi, G. (2009). Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. Nat Rev Immunol *9*, 324-337.

Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J Exp Med *188*, 287-296.

Thorstenson, K. M., and Khoruts, A. (2001). Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. J Immunol *167*, 188-195.

Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S. F., Frewin, M. R., Cobbold, S. P., and Waldmann, H. (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 15059-15064.

Trambley, J., Bingaman, A. W., Lin, A., Elwood, E. T., Waitze, S. Y., Ha, J., Durham, M. M., Corbascio, M., Cowan, S. R., Pearson, T. C., and Larsen, C. P. (1999). Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection. J Clin Invest *104*, 1715-1722.

Trapani, J. A., and Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nat Rev Immunol *2*, 735-747.

Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. Nat Immunol *10*, 864-871.

Trzonkowski, P., Szmit, E., Mysliwska, J., and Mysliwski, A. (2006). CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. Clin Immunol *119*, 307-316.

Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. Science *323*, 1488-1492.

Turnquist, H. R., Raimondi, G., Zahorchak, A. F., Fischer, R. T., Wang, Z., and Thomson, A. W. (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*, 7018-7031.

Turnquist, H. R., Sumpter, T. L., Tsung, A., Zahorchak, A. F., Nakao, A., Nau, G. J., Liew, F. Y., Geller, D. A., and Thomson, A. W. (2008). IL-1beta-driven ST2L expression promotes maturation resistance in rapamycin-conditioned dendritic cells. J Immunol *181*, 62-72.

Vacca, C., Fallarino, F., Perruccio, K., Orabona, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Velardi, A., Fioretti, M. C., Puccetti, P., and Grohmann, U. (2005). CD40 ligation prevents onset of tolerogenic properties in human dendritic cells treated with CTLA-4-Ig. Microbes Infect *7*, 1040-1048.

Vakkila, J., Demarco, R. A., and Lotze, M. T. (2008). Coordinate NF-kappaB and STAT1 activation promotes development of myeloid type 1 dendritic cells. Scand J Immunol *67*, 260-269.

Valzasina, B., Guiducci, C., Dislich, H., Killeen, N., Weinberg, A. D., and Colombo, M. P. (2005). Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. Blood *105*, 2845-2851.

van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B., and van Kooyk, Y. (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. J Exp Med *201*, 1281-1292.

van Kooten, C., and Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol *67*, 2-17.

van Maurik, A., Herber, M., Wood, K. J., and Jones, N. D. (2002). Cutting edge: CD4+CD25+ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8+ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. J Immunol *169*, 5401-5404.

van Nierop, K., and de Groot, C. (2002). Human follicular dendritic cells: function, origin and development. Semin Immunol *14*, 251-257.

Vanbervliet, B., Homey, B., Durand, I., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., de Bouteiller, O., Vicari, A., and Caux, C. (2002). Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. Eur J Immunol *32*, 231-242.

VanBuskirk, A. M., Burlingham, W. J., Jankowska-Gan, E., Chin, T., Kusaka, S., Geissler, F., Pelletier, R. P., and Orosz, C. G. (2000). Human allograft acceptance is associated with immune regulation. J Clin Invest *106*, 145-155.

Vassiliou, E., Jing, H., and Ganea, D. (2003). Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. Cell Immunol *223*, 120-132.

Veldhoen, M., Moncrieffe, H., Hocking, R. J., Atkins, C. J., and Stockinger, B. (2006). Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells. J Immunol *176*, 6202-6210.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. Nat Immunol *9*, 1341-1346.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., *et al.* (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. Nat Immunol *5*, 1166-1174.

Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C., and O'Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol *172*, 5986-5993.

von Herrath, M. G., Yokoyama, M., Dockter, J., Oldstone, M. B., and Whitton, J. L. (1996). CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. J Virol *70*, 1072-1079.

Vu, M. D., Amanullah, F., Li, Y., Demirci, G., Sayegh, M. H., and Li, X. C. (2004). Different costimulatory and growth factor requirements for CD4+ and CD8+ T cell-mediated rejection. J Immunol *173*, 214-221.

Wadia, P. P., Herrera, N. D., Abecassis, M. M., and Tambur, A. R. (2009). Mycophenolic acid inhibits maturation and function of human dendritic cells and B cells. Hum Immunol *70*, 692-700.

Walker, L. S., Chodos, A., Eggena, M., Dooms, H., and Abbas, A. K. (2003). Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. J Exp Med *198*, 249-258.

Walker, M. R., Carson, B. D., Nepom, G. T., Ziegler, S. F., and Buckner, J. H. (2005). De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 4103-4108.

Wang, G. Y., Chen, G. H., Li, H., Huang, Y., Wang, G. S., Jiang, N., and Fu, B. S. (2009). Rapamycin-treated mature dendritic cells have a unique cytokine secretion profile and impaired allostimulatory capacity. Transpl Int *22*, 1005-1016.

Wang, X. N., Sviland, L., Ademokun, A. J., Dunn, J., Cavanagh, G., Proctor, S. J., and Dickinson, A. M. (1998). Cellular alloreactivity of human cord blood cells detected by T-cell frequency analysis and a human skin explant model. Transplantation *66*, 903-909.

Wang, Y., Gao, D., Lunsford, K. E., Frankel, W. L., and Bumgardner, G. L. (2003). Targeting LFA-1 synergizes with CD40/CD40L blockade for suppression of both CD4-dependent and CD8-dependent rejection. Am J Transplant *3*, 1251-1258.

Ward, K. A., Stewart, L. A., and Schwarer, A. P. (2006). CD34+-derived CD11c+ + + BDCA-1+ + CD123+ + DC: expansion of a phenotypically undescribed myeloid DC1 population for use in adoptive immunotherapy. Cytotherapy *8*, 130-140.

Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J. R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S. K., Hurchla, M. A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., *et al.* (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. Nat Immunol *4*, 670-679.

Watts, T. H., and DeBenedette, M. A. (1999). T cell co-stimulatory molecules other than CD28. Curr Opin Immunol *11*, 286-293.

Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., and Harrington, L. E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annu Rev Immunol *25*, 821-852.

Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T. Y., Watford, W. T., *et al.* (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. Immunity *30*, 155-167.

Weichhart, T., Costantino, G., Poglitsch, M., Rosner, M., Zeyda, M., Stuhlmeier, K. M., Kolbe, T., Stulnig, T. M., Horl, W. H., Hengstschlager, M., *et al.* (2008). The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. Immunity *29*, 565-577.

Weiner, H. L. (2001a). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev *182*, 207-214.

Weiner, H. L. (2001b). Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. Microbes Infect *3*, 947-954.

Wild, J., Grusby, M. J., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (1999). Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. J Immunol *163*, 1880-1887.

Wing, K., Ekmark, A., Karlsson, H., Rudin, A., and Suri-Payer, E. (2002). Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. Immunology *106*, 190-199.

Wing, K., Suri-Payer, E., and Rudin, A. (2005). CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. Scand J Immunol *62*, 1-15.

Woltman, A. M., de Fijter, J. W., Kamerling, S. W., van Der Kooij, S. W., Paul, L. C., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2001). Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. Blood *98*, 174-180.

Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. J Exp Med *184*, 903-911.

Wu, L., and Shortman, K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. Semin Immunol *17*, 304-312.

Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. (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*, 6725-6729.

Yamada, A., Salama, A. D., Sho, M., Najafian, N., Ito, T., Forman, J. P., Kewalramani, R., Sandner, S., Harada, H., Clarkson, M. R., *et al.* (2005). CD70 signaling is critical for CD28-independent CD8+ T cell-mediated alloimmune responses in vivo. J Immunol *174*, 1357-1364.

Yamaguchi, T., Hirota, K., Nagahama, K., Ohkawa, K., Takahashi, T., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2007). Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. Immunity *27*, 145-159.

Yang, D., Chen, Q., Yang, H., Tracey, K. J., Bustin, M., and Oppenheim, J. J. (2007a). High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. J Leukoc Biol *81*, 59-66.

Yang, J., Brook, M. O., Carvalho-Gaspar, M., Zhang, J., Ramon, H. E., Sayegh, M. H., Wood, K. J., Turka, L. A., and Jones, N. D. (2007b). Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 19954-19959.

Yang, J., Popoola, J., Khandwala, S., Vadivel, N., Vanguri, V., Yuan, X., Dada, S., Guleria, I., Tian, C., Ansari, M. J., *et al.* (2008). Critical role of donor tissue expression of programmed death ligand-1 in regulating cardiac allograft rejection and vasculopathy. Circulation *117*, 660-669.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol *5*, 730-737.

Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B. M., Brennan, F. M., and Feldmann, M. (2001). Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. Int Immunol *13*, 675-683.

Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M. A., Kohno, T., *et al.* (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. Nature *402*, 827-832.

Young, J. W., and Steinman, R. M. (1990). Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. J Exp Med *171*, 1315-1332.

Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. J Exp Med *188*, 2205-2213.

Zang, X., Loke, P., Kim, J., Murphy, K., Waitz, R., and Allison, J. P. (2003). B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 10388-10392.

Zaretsky, A. G., Taylor, J. J., King, I. L., Marshall, F. A., Mohrs, M., and Pearce, E. J. (2009). T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. J Exp Med *206*, 991-999.

Zhang, G. B., Dong, Q. M., Xu, Y., Yu, G. H., and Zhang, X. G. (2005). B7-H3: Another Molecule Marker for Mo-DCs? Cell Mol Immunol *2*, 307-311.

Zhang, H., Snyder, K. M., Suhoski, M. M., Maus, M. V., Kapoor, V., June, C. H., and Mackall, C. L. (2007). 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8+ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. J Immunol *179*, 4910-4918.

Zheng, S. G., Gray, J. D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S., and Horwitz, D. A. (2002). Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. J Immunol *169*, 4183-4189.

Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R. (2009a). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. Immunity *30*, 646-655.

Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L. T., and Bluestone, J. A. (2009b). Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. Curr Opin Immunol *21*, 281-285.

Ziegler, S. F. (2006). FOXP3: of mice and men. Annu Rev Immunol *24*, 209-226.

Zuniga, E. I., McGavern, D. B., Pruneda-Paz, J. L., Teng, C., and Oldstone, M. B. (2004). Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. Nat Immunol *5*, 1227-1234.

Roxane LEMOINE

PROPRIETES REGULATRICES DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES TRAITEES PAR L'ACIDE MYCOPHENOLIQUE

Résumé

En transplantation d'organes, la réponse immunitaire de l'hôte contre son donneur reste une cause très importante de perte de greffons. Ainsi, un meilleur contrôle de la réponse par induction d'une tolérance spécifique reste une priorité en transplantation humaine. Dans ce travail, nous avons exploré les effets de l'acide mycophénolique (MPA, immunosuppresseur couramment utilisé en transplantation) sur les cellules dendritiques (DC) humaines. Nous avons mis en évidence que le MPA diminue la capacité des DC à activer des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques allogéniques en diminuant la synthèse d'interféron gamma dans les DC. Par ailleurs, les DC traitées par MPA sont capables d'induire des lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs antigène-spécifiques (iTreg) qui peuvent reprogrammer des DC matures en DC aux propriétés tolérogènes. Enfin, ces iTreg entraînent une réduction de la sécrétion d'IFN-γ par les cellules T $CD8^+$ et une inhibition de leur fonction cytotoxique en réponse à une stimulation allogénique. L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* suggèrent que les DC-MPA humaines pourraient être potentiellement utilisés en thérapie cellulaire afin de promouvoir une tolérance d'allogreffe.

Mots-clés : greffe d'organe, cellules dendritiques, acide mycophénolique, lymphocytes T régulateurs, tolérance

Résumé en anglais

In organ transplantation, host immune response against donor still remains a major cause of graft loss. A better control of allogeneic response through the induction of specific tolerance is a major goal in human transplantation. In this work, we explored the effects of mycophenolic acid (MPA, an immunosuppressive drug currently used in transplantation) on dendritic cell (DC) functions. We demonstrated that MPA inhibits DC ability to induce allogeneic cytotoxic $CD8^+$ T cells through inhibition of interferon gamma synthesis in DC. Moreover, mycophenolic acid-treated dendritic cells (MPA-DC) are able to induce antigen-specific regulatory $CD4^+$ T lymphocytes (iTreg) which can convert fully mature DC into tolerogenic DC. These iTreg decrease the expression of proteins associated with cytotoxic function (perforin and granzymes A and B), reduce IFN-γ production by $CD8^+$ T cells and inhibit their cytotoxic function in response to allogeneic stimulation. These results taken together suggest that human MPA-DC could be use in cellular therapy in order to promote allograft tolerance.

Keywords : organ, transplantation, dendritic cells, mycophenolic acid, regulatory T cells, allograft tolerance