



**HAL**  
open science

# Lymphocytes T régulateurs et Transplantation hépatique : modulation de l'activité des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ par les drogues immunosuppressives

Céline Miroux

► **To cite this version:**

Céline Miroux. Lymphocytes T régulateurs et Transplantation hépatique : modulation de l'activité des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ par les drogues immunosuppressives. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S001 . tel-00632785

**HAL Id: tel-00632785**

**<https://theses.hal.science/tel-00632785>**

Submitted on 15 Oct 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2**  
**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTE**

Présentée par :

**Céline Miroux**

Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2**

*Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie*

*Spécialité : Immunologie*

---

**LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET TRANSPLANTATION HEPATIQUE :**  
**MODULATION DE L'ACTIVITÉ DES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS CD4+CD25+**  
**PAR LES DROGUES IMMUNOSUPPRESSIVES**

Soutenue publiquement le Vendredi 11 Février 2011

Devant le Jury composé de :

<b>Pr Lionel Prin</b>	<b>Président du Jury</b>
<b>Dr Evelyne Jouvin-Marche</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr Hans Yssel</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr Filoména Conti</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr Czeslaw Wychowski</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr Nadira Delhem</b>	<b>Directeur de Thèse</b>

***Science sans conscience n'est que ruine de l'âme.***

*François Rabelais, Pantagruel*

## REMERCIEMENTS

*Quel difficile exercice que de synthétiser en deux ou trois pages seulement les remerciements que je voudrais adresser aux différentes personnes que j'ai rencontrées et appréciées durant ma vie de thésard ainsi, qu'aux personnes que je connais et qui m'entourent depuis bien plus longtemps que ça.*

*Après avoir enfin achevé la version finale de ce manuscrit, je vais tenter de satisfaire à cet exercice de mon mieux. Toutes mes excuses aux personnes que je pourrais oublier, mes pensées vont vers vous également.*

*Je voudrais tout d'abord remercier le **Pr Lionel Prin** d'avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse. Je suis très honorée.*

*Je voudrais également remercier le **Dr Evelyne Jouvin-Marche** et le **Dr Hans Yssel**, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je vous suis reconnaissante de l'intérêt que vous avez donné à ce travail de thèse.*

*Mes remerciements vont également au **Dr Czesław Wychowski** pour avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. J'espère que la collaboration que nous avons entamée en 2010 portera ses fruits. Je vous suis très reconnaissante de l'enthousiasme avec lequel vous vous impliquez dans nos projets.*

*Un grand merci à toi aussi **Filoména** pour avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Je suis vraiment heureuse que tu sois présente le jour de ma soutenance. Nous avons forgé ce projet ensemble et l'avons progressivement mûri au cours de nos discussions scientifiques. Je ne sais comment te remercier de la « tournure » que tu lui a donné.*

*Maintenant, j'en arrive logiquement à remercier ma directrice de thèse, le Dr Nadira Delhem. **Nadira**, merci de m'avoir acceptée dans ton équipe avant même le DEA. Tu te souviens que, durant ce stage, je te soutenais que je ne ferais jamais de thèse ... Et l'année suivante je m'inscrivais en DEA ! Merci de m'avoir donné les moyens scientifiques et matériels pour développer la douce histoire de l'isolement des Treg. Ces trois années de thèse ont été très formatrices, je pense que j'ai pu développer mon autonomie, et mon esprit critique, ... Merci surtout de m'avoir fait confiance. Cette confiance mutuelle a fait que je t'ai suivie les yeux fermés, même lorsque notre avenir à tous était incertain ! Même si nos rapports n'ont pas toujours été les meilleurs (la faute à nos caractères : des signes de feu, il paraît !), je pense que l'on a appris à bien travailler ensemble. Comment ne pas te remercier également pour ton soutien au cours de cette année 2009 qui fut si difficile pour moi. Merci de m'avoir, encore une fois, fait confiance à ce moment. Aujourd'hui, je souhaite te remercier également pour ton soutien dans mes nouveaux projets professionnels ; je sais que tu aurais aimé que je suive tes pas, mais mes ambitions me conduisent ailleurs ...*

***Véronique**, je te remercie très sincèrement de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de ton équipe de recherche. Tu as toujours été là pour me conseiller dans l'avancement de ce projet, même si ton temps était occupé ailleurs dans tes nouvelles fonctions d'administration et d'animation scientifique au sein du Cancéropôle Nord-Ouest. C'est peut être ces autres occupations qui m'ont inspirées. Ainsi, je tiens à te remercier tout particulièrement pour tes conseils et ton aide*

*dans ma nouvelle orientation professionnelle. Comment ne pas oublier également ces barbec' dans ton jardin et le gouter de Noël au coin du feu. Ces petits plaisir me manqueront ...*

***Pr Yvan de Launoit, Yvan,** tu m'as permis de poursuivre cette thèse au sein de ton unité et de jouir ainsi d'une atmosphère de recherche de grande qualité. De plus, depuis début 2010, tu es devenu le directeur de notre équipe, quel honneur ! Nos échanges au cours de nos réunions et tes points d'informations sur les côtés plus « politique » et administratif de la science, ont été très importants pour moi.*

*J'en arrive maintenant aux collègues de « paillasse », comme on dit. Ces gens qui ont partagés mon univers chaque jour ; à la paillasse, en salle sang ou dans les bureaux ...*

***Olivier,** comment ne pas te remercier ... C'est toi qui m'a fait entrer au laboratoire et qui m'a fait découvrir le monde des cancers viro-induits. Nous avons fait un long bout de chemin ensemble, nous avons passé beaucoup de bons moments ! Tu n'as pas été pour moi qu'un collègue, mais plus une 2<sup>ème</sup> famille : le Grand Frère. Nous avons découvert ensemble le monde des Treg et leur grande fragilité (ça n'aime pas les trop grandes chaleurs les Treg ...). Nous en avons aussi coulé des milliers de Ficoll (environ 50 L !). Tu m'as toujours été d'une grande aide au laboratoire, dont tu détiens la mémoire. Comment donc ne pas te remercier pour m'avoir fait entrer dans cette famille, pour partager avec toi cette expérience humaine et scientifique qu'est la thèse ! Te connaissant assez bien, je pense, je n'ai qu'une dernière chose à ajouter : « Poursuis tes rêves les plus fous, va au bout de tes ambitions ... »*

*Ma chère **Nath β** (Hé oui, c'est resté !), pour toi les mots me manquent ... Tu ne faisais pas partie de l'équipe mais pour moi c'était tout comme, même plus. Que de bons moments passés ensemble, que de fous rires, de confidences, de discussion sur la vie et l'avenir ... Tu as toujours su me conseiller, et inversement, je t'ai souvent écoutée ... Je ne sais même pas comment te remercier d'avoir été là à mon écoute. Comment aussi oublier nos virées boutiques (mes comptes s'en souviennent) ou nos pauses clopes parfois interminables (Et là, c'est Nadira qui s'en souvient ;)). Tu es pour moi comme un modèle de ce que j'aimerais devenir : Une femme épanouie ! Tu as su franchir le pas de quitter le monde de la recherche et j'espère avoir l'opportunité de t'y suivre ... Je sais que l'amitié qui a grandi ne s'effacera pas de si tôt ... Nath, je te souhaite le meilleur pour ta carrière et dans ta vie perso ... SURTIOUT, ne change pas !*

***Thibaut,** alias Tiboté, dans cette grande famille maintenant, tu es le petit frère. Tu reprends derrière moi la belle histoire des Treg et du VHC, un sujet qui me tenait à cœur mais que, faute de temps, je n'ai pu mener ! Je sais que tu le porteras bien et loin ...*

*Mon Dr House légendaire aura toujours su me faire retrouver le sourire avec son accent Ch'timi pur souche ! Tu es aussi cynique que lui mais c'est aussi pour cela qu'on t'aime. Merci pour ton écoute de chaque instant, ton soutien, ta joie de vivre (malgré tout ...), nos discussions philosophiques sur la société et la nature humaine, et bien sur tes cours d'histoire de France et de notre ville de Lille (A quand la prochaine balade ?). Je n'oublierais jamais notre team VHC (Vrais Handicapés du Coccyx). Je n'ai qu'une chose à ajouter : « Ne laisse rien de côté, tout est important ... ». Keep care !*

***Nathalie,** ton arrivée a contribué à l'agrandissement de notre famille. J'ai un profond respect pour la passion et la rigueur que tu mets dans chacune des choses que tu entreprends. Je t'ai ouvert le monde des Treg avec toutes les mauvaises surprises que cela comporte, mais tu t'es prise au*

jeu ... Enfin, à quand une lignée quand même ?! Merci aussi pour ta bonne humeur de chaque instant ...

**Magalie**, tu as rejoint notre équipe il y a un an maintenant. Ca n'a pas été facile de rejoindre le monde de l'immuno, toi qui en étais si loin ! Toutes mes félicitations et mes vœux de réussite dans la reprise de tes études. Je sais que ce n'est pas facile de conjuguer vie de maman et vie d'étudiante ....

**Dhafer**, tu es le dernier arrivé dans le monde des cancers viro-induits. Je suis ravie de te compter parmi mes collègues (malgré le fait que tu me fait me sentir encore plus petite avec tes 1,97 m ). J'admire chez toi la rapidité avec laquelle tu t'es adapté à ta nouvelle vie Lilloise. Et merci aussi de nous faire partager ces merveilleuses pâtisseries tunisiennes ! Je ne peux rien te souhaiter de mieux qu'une belle thèse.

**Audrey**, j'ai beaucoup apprécié ton esprit vif et perspicace au cours de ces années. Merci pour tes précieux conseils scientifiques, tes corrections de mon Français mais surtout pour tes nombreuses leçons de vie humaine et tes petites crises de délire, parfois. Nous avons souvent eu des points de vue divergents dans la gestion de nos vies ou les conseils à donner aux autres (Ange ou Démon ?!, comme dirait Thibaut). Un dernier petit clin d'œil : « J'espère que tu sauras trouver, en tant que chercheuse, le réveil qu'il te faut ! »

A **Jonathan**, je tiens à dire merci pour son soutien sans faille, sa disponibilité et son écoute. C'est une belle amitié qui est née de cette thèse. Certes, ce n'est pas la science qui nous a rapprochés, mais plutôt un concours de circonstances ... Mais une thèse n'est pas seulement un projet, c'est aussi une expérience de la vie, un grand moment d'échanges et de rencontres ... J'aurais appris une chose de toi : « Apprendre à vivre pour soi et non pour les autres ». Pour faire plus sérieux, quand même, je te remercie d'avoir réfléchi avec moi sur mes Western Blot.

Comment ne pas remercier nos chers parisiens ; **Yvon, Filo, Fabien, Lynda, Samia, Sandrine** et maintenant **Khalidoun** ; pour leur accueil toujours chaleureux et enjoués, leurs précieux conseils scientifiques et techniques ; et bien sur, leur beaux chirurgiens !

Je n'oublie pas non plus de remercier l'ensemble des stagiaires qui sont passés au labo, et notamment **Céline, Marie, Jérémy, Gaëlle et Agathe**. Merci pour votre bonne humeur et votre aide dans les manip, vous avez contribué à l'avancement de ce projet.

Je tiens également à remercier mes collègues de bureau pendant 4 ans : **Alioune et Guillaume**. Merci de nous avoir supportés moi et ma musique ...

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble de l'équipe administrative de l'IBL, et en particulier à **Nicole et Marie-Christine** toujours disponibles et d'une grande aide au quotidien.

Enfin je voudrais également remercier **BioAddoct**, ou plutôt les personnes formidables que j'ai rencontrées dans cette association, que nous avons créée en Mai 2009. Cette association m'a beaucoup apportée. J'y ai découvert mon goût de l'organisation d'événements. Nous nous sommes tous dévoués à son bon fonctionnement, pour faire tourner la boutique ... J'espère que celles et ceux qui vont reprendre le flambeau sauront le faire avec autant de fougue ! Je tiens à remercier ici, Le Président Emeric, mes différentes « Fiesta Team » et en particulier Sophie, Fabien, Jonathan, Rémy, Carolina, ...

*Je quitte maintenant la vie du laboratoire, pour des remerciements envers mon entourage personnel.*

*Mes remerciements iront d'abord à mes amies de longues dates ... On forme un beau quatuor !*

*A **Sandrine**, 16 ans d'amitié ça ne s'invente pas ! Un peu comme une sœur de sang ; tu as toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments ... Il y aurait beaucoup trop de choses à raconter, donc je m'arrête là !*

*A **Aline**, maintenant loin des yeux, mais toujours près du cœur ... Heureusement qu'il y a les congrès et les manips sur Paris pour se voir un peu plus !*

*A **Perrine**, toujours là à l'écoute et de très bon conseil.*

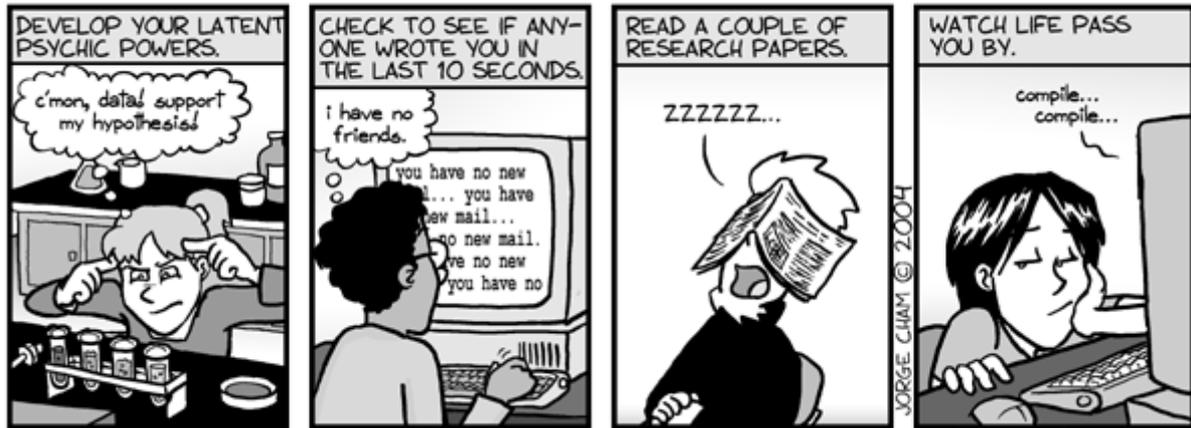
*Je n'oublie pas non plus tous mes « autres » ami(e)s, c'est grâce à vous que j'arrive à garder mon équilibre au quotidien. Vous comptez énormément pour moi.*

***Guillaume et Coralie**, merci de m'avoir tendu la main au moment où j'en avais le plus besoin, merci d'être toujours à mes côtés. **Emilie** qui va bientôt me quitter pour rejoindre le soleil : « Gardes moi un transat ! ». **Claire, Doriane et Anne-Lu** avec qui je passe toujours de merveilleuses soirées. **Yann et Alex, Sam et Ade, Séb et Julie**, ... j'espère qu'on aura encore beaucoup de bons moments ensemble : soirées, vacances et sport pour nous les filles. Je suis heureuse de vous avoir tous rencontrés, vous comptez beaucoup pour moi !*

*Comment ne pas remercier ma famille. Je ne vous ai pas toujours vu autant que je le voulais ... **Papi et Mamie**, je suis heureuse que vous soyez encore là pour assister à ma thèse. **Maman**, c'est grâce à toi si aujourd'hui j'en suis arrivée là, Merci ! Mes petites sœurs, **Aurélien et Julie**, plus si petite maintenant, je suis fière de vous ...*

*Enfin, je tenais tout particulièrement à te remercier Toi, **Manu**. Tu es arrivé dans ma vie au moment où j'en avais le plus besoin, au cours de cette phase stressante de rédaction de la thèse. Tu as eu un don pour me canaliser, me conseiller et m'épauler tout au long de cette « épreuve », ainsi que dans mes choix professionnels actuels. Je voulais également te remercier d'avoir accepté Babar (;)) ... enfin ... Merci surtout d'être là pour moi et de faire mon bonheur aussi simplement ...*

**THINGS TO DO WHILE WAITING FOR YOUR EXPERIMENT TO FINISH** (OR SIMULATION TO RUN, OR CODE TO COMPILE, OR...)



[www.phdcomics.com](http://www.phdcomics.com)

*A theory is something nobody believes, except the person who made it. An experiment is something everybody believes, except the person who made it.*

*Albert Einstein*

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>- 1 -</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>- 3 -</b>
<b>AVANT PROPOS</b>	<b>- 5 -</b>
<b>LE SYSTÈME IMMUNITAIRE : LES LYMPHOCYTES T CD3+</b>	<b>- 6 -</b>
<b>A - DÉVELOPPEMENT ET SÉLECTION DES LYMPHOCYTES T CD3+</b>	<b>- 6 -</b>
1. DÉVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T CD3+	- 6 -
2. SÉLECTION DES LYMPHOCYTES T CD3+	- 7 -
<b>B - RÉCEPTEUR À L'ANTIGÈNE DES LYMPHOCYTES T CD3+ : LE T CELL RECEPTOR (TCR)</b>	<b>- 9 -</b>
1. ORGANISATION GÉNIQUE DU TCR	- 9 -
2. STRUCTURE PROTÉIQUE DU COMPLEXE TCR/CD3	- 10 -
<b>C - TRANSDUCTION DU SIGNAL D'ACTIVATION</b>	<b>- 10 -</b>
<b>D - FONCTIONS EFFECTRICES DES LYMPHOCYTES T</b>	<b>- 13 -</b>
1. LES LYMPHOCYTES T CD8+	- 13 -
2. LA COMPLEXICITE DU LIGNAGE T CD4+ HELPER : TH1, TH2 ET LES AUTRES	- 14 -
<b>LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS</b>	<b>- 19 -</b>
<b>A - LES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T REGULATEURS</b>	<b>- 19 -</b>
1. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS NATURELS (NTREG)	- 20 -
2. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS INDUITS (ITREG)	- 20 -
a. Les cellules CD4+ Th3	- 20 -
b. Les T régulateurs CD4-	- 21 -
c. Les T régulateurs induits de type 1 (Tr1)	- 21 -
<b>B - LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS NATURELS : CD4+CD25+CD127-FoxP3+</b>	<b>- 23 -</b>
1. 25 ANS D'EFFORTS A LA RECHERCHE DU « MARQUEUR » ...	- 23 -
2. DEVELOPPEMENT ET HOMEOSTASIE DU COMPARTIMENT T REGULATEUR CD4+CD25+	- 30 -
a. Développement thymique des T régulateurs naturels CD4+CD25+	- 30 -
b. Développement de T régulateurs en périphérie : Ti - Treg	- 32 -
c. Homéostasie périphérique des T régulateurs naturels CD4+CD25+	- 33 -
3. MECANISMES DE SUPPRESSION	- 35 -
a. Mécanisme de suppression impliquant un contact cellulaire	- 36 -
b. Mécanisme supresseur par sécrétion cytokinique	- 38 -
c. Activité cytotoxique des T régulateurs	- 41 -
<b>C - FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DES T REGULATEURS CD4+CD25+</b>	<b>- 42 -</b>
1. T REGULATEURS ET TOLERANCE FŒTO-MATERNELLE	- 42 -
2. T REGULATEURS ET TOLERANCE EN TRANSPLANTATION D'ORGANE	- 43 -
3. T REGULATEURS ET PATHOLOGIES AUTO-IMMUNES ET IMMUNO-INFLAMMATOIRES	- 45 -
4. T REGULATEURS ET PATHOLOGIES INFECTIEUSES	- 47 -
5. T REGULATEURS ET CANCER	- 50 -

**LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET HEPATOCARCINOME : INFECTION PAR LE VHC - 54 -**

---

<b>A - L'HEPATITE C</b>	<b>- 55 -</b>
1. LE VIRUS DE L'HEPATITE C	- 55 -
a. Variabilité génétique et quasi-espèces	- 55 -
b. Structure du VHC	- 56 -
c. Le cycle viral	- 57 -
d. Tropisme cellulaire du VHC	- 60 -
2. EPIDEMIOLOGIE DE L'HEPATITE C	- 61 -
3. MODE DE TRANSMISSION DU VHC	- 62 -
4. HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE	- 62 -
5. TRAITEMENT DE L'HEPATITE C	- 63 -
<b>B - REPONSE IMMUNITAIRE EFFECTRICE ET HEPATITE C</b>	<b>- 65 -</b>
1. LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE	- 65 -
2. LA REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE	- 67 -
a. La réponse humorale	- 67 -
b. La réponse cellulaire	- 68 -
<b>C - REPONSE IMMUNITAIRE REGULATRICE ET INFECTION CHRONIQUE DU VHC</b>	<b>- 71 -</b>
<b>D - TRANSPLANTATION HEPATIQUE ET RECIDIVE DE LA PATHOLOGIE VIRALE C</b>	<b>- 75 -</b>
1. TRAITEMENT DU CHC : LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE	- 76 -
2. COMPLICATIONS APRES LA TH : LE REJET DU GREFFON ET LA RECIDIVE VIRALE C	- 76 -
a. Le rejet du greffon	- 76 -
b. La récurrence virale C	- 78 -
3. LES FACTEURS ASSOCIES A LA SEVERITE DE LA RECIDIVE VIRALE C	- 79 -
a. Rôle des T régulateurs dans la récurrence virale C	- 79 -
b. Autres facteurs influençant la récurrence virale C	- 80 -

**LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET TRANSPLANTATION HEPATIQUE : ROLE DES IMMUNOSUPPESSEURS - 82 -**

---

<b>A - LA CYCLOSPORINE A (CSA)</b>	<b>- 84 -</b>
1. DECOUVERTE ET UTILISATION DE LA CYCLOSPORINE A	- 84 -
2. MECANISMES D'ACTION DE LA CSA	- 85 -
3. LES ANALOGUES DE CYCLOSPORINE A : NIM 811, DEBIO 025, SCY-635	- 88 -
4. CYCLOSPORINE A : GREFFE DE FOIE ET RECIDIVE DE LA CIRRHOSE C	- 89 -
5. CYCLOSPORINE A ET T REGULATEURS	- 90 -
<b>B - LE TACROLIMUS (FK506)</b>	<b>- 91 -</b>
1. DECOUVERTE ET UTILISATION DU TACROLIMUS	- 91 -
2. MECANISMES D'ACTION DU TACROLIMUS	- 92 -
3. TACROLIMUS : GREFFES HEPATIQUES ET RECIDIVE DE LA CIRRHOSE C	- 94 -
4. TACROLIMUS ET T REGULATEURS	- 95 -
<b>C - LA RAPAMYCINE (SIROLIMUS)</b>	<b>- 95 -</b>
1. DECOUVERTE ET UTILISATION DE LA RAPAMYCINE	- 95 -
2. MECANISMES D'ACTION DE LA RAPAMYCINE	- 97 -
3. RAPAMYCINE : GREFFE DU FOIE ET RECIDIVE DE LA CIRRHOSE C	- 98 -
4. RAPAMYCINE ET T REGULATEURS	- 99 -
<b>D - LE MYCOPHENOLATE MOFETIL (MMF)</b>	<b>- 100 -</b>
1. DECOUVERTE ET UTILISATION DU MYCOPHENOLATE MOFETIL	- 100 -
2. MECANISMES D'ACTION DU MYCOPHENOLATE MOFETIL	- 101 -
3. MYCOPHENOLATE MOFETIL : GREFFES DU FOIE ET RECIDIVE DU CHC	- 103 -
4. MYCOPHENOLATE MOFETIL ET T REGULATEURS	- 104 -

<b>E - LES CORTICOÏDES</b>	<b>- 104 -</b>
1. DECOUVERTE ET UTILISATION DES CORTICOÏDES	- 104 -
2. MECANISMES D'ACTION DES CORTICOÏDES	- 105 -
3. CORTICOÏDES : GREFFES HEPATIQUES ET RECIDIVE DU CHC	- 107 -
4. CORTICOÏDES ET T REGULATEURS	- 107 -
<b>F - TRAITEMENTS EN COURS D'EVALUATION DANS LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE</b>	<b>- 108 -</b>
<b>ARTICLE 1 - CHAPITRE 7 DU LIVRE "REGULATORY T CELLS"</b>	<b>- 111 -</b>
<hr/>	
<b>ARTICLE 2 - REVUE GENERALE</b>	<b>- 113 -</b>
<hr/>	
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>- 115 -</b>
<hr/>	
<b>RESULTATS</b>	<b>- 117 -</b>
<hr/>	
ARTICLE 3	- 118 -
ARTICLE 4	- 120 -
ARTICLE 5	- 122 -
ARTICLE 6	- 124 -
FIGURE 42	- 126 -
ARTICLE 7	- 128 -
ARTICLE 8	- 130 -
ARTICLE 9 – REVUE	- 132 -
<b>COMMUNICATIONS - CONGRES</b>	<b>- 134 -</b>
<hr/>	
<b>DISCUSSION - CONCLUSION</b>	<b>- 136 -</b>
<hr/>	
<b>LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS : UN POTENTIEL THERAPEUTIQUE ?</b>	<b>- 153 -</b>
A - APPORT DANS LA TRANSPLANTATION D'ORGANES	- 153 -
B - APPORT DANS LES PATHOLOGIES AUTO-IMMUNES ET IMMUNO-INFLAMMATOIRES	- 155 -
C - CIBLE DANS L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE	- 159 -
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>- 164 -</b>
<hr/>	
<b>FORMATIONS DOCTORALES</b>	<b>- 187 -</b>
<hr/>	
DOCTORIALES FRANCO - BELGES	- 188 -
NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE	- 190 -

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

### **PARTIE INTRODUCTION**

<b>Figure 1</b>	Principales étapes du développement thymique des lymphocytes T	<b>7</b>
<b>Figure 2</b>	Organisation spatiale du complexe TCR/CD3	<b>8</b>
<b>Figure 3</b>	Réarrangements des segments de gène codant les chaînes $\alpha$ et $\beta$ du TCR	<b>9</b>
<b>Figure 4</b>	Schématisation des processus de sélection thymique	<b>10</b>
<b>Figure 5</b>	Voies de transduction du signal en aval du TCR	<b>11</b>
<b>Figure 6</b>	Différenciation et rôle du lignage CD4+ helper	<b>17</b>
<b>Figure 7</b>	Trente ans de travaux pour établir ce phénotype non exhaustif des lymphocytes T CD4+CD25+ régulateurs naturels	<b>24</b>
<b>Figure 8</b>	Développement intra-thymique du lignage T régulateur	<b>30</b>
<b>Figure 9</b>	Mécanismes de suppression contact dépendant	<b>37</b>
<b>Figure 10</b>	Mécanismes de suppression cytokine dépendant	<b>39</b>
<b>Figure 11</b>	Cytotoxicité des T régulateurs	<b>41</b>
<b>Figure 12</b>	Schématisation de la migration des Treg au cours de la transplantation	<b>44</b>
<b>Figure 13</b>	Balance entre les lymphocytes Th et Treg : Immunité anti-infectieuse protectrice versus prévention d'immunopathologie	<b>47</b>
<b>Figure 14</b>	Les Treg - obstacle majeur à l'immunosurveillance anti-tumorale	<b>51</b>
<b>Figure 15</b>	Distribution mondiale des géotypes du VHC	<b>56</b>
<b>Figure 16</b>	Structure du VHC	<b>57</b>
<b>Figure 17</b>	Cycle viral du VHC	<b>57</b>
<b>Figure 18</b>	Schématisation de l'entrée du VHC	<b>58</b>
<b>Figure 19</b>	Traduction et maturation de la polyprotéine virale	<b>59</b>
<b>Figure 20</b>	Prévalence du Virus de l'Hépatite C en 2007	<b>61</b>
<b>Figure 21</b>	Chronologie de l'évolution de l'hépatite C et ses complications	<b>63</b>
<b>Figure 22</b>	Réponses à la bithérapie IFN $\alpha$ / Ribavirine, selon le géotype viral	<b>64</b>
<b>Figure 23</b>	Echappement du VHC au système immunitaire inné	<b>66</b>
<b>Figure 24</b>	Schématisation de la réponse immunitaire humorale au cours des phases aiguë et chronique de l'infection par le VHC	<b>67</b>
<b>Figure 25</b>	Echappement du VHC à la réponse immunitaire adaptative	<b>69</b>
<b>Figure 26</b>	Historique d'apparition des immunosuppresseurs	<b>82</b>
<b>Figure 27</b>	Schématisation des mécanismes d'action des drogues immunosuppressives	<b>83</b>
<b>Figure 28</b>	Modélisation 3D et structure de la molécule de cyclosporine A	<b>84</b>
<b>Figure 29</b>	Mécanisme d'action de la Cyclosporine A (CsA) et du Tacrolimus (FK506)	<b>86</b>
<b>Figure 30</b>	Inhibition de l'ouverture du pore de transition mitochondrial par la CsA	<b>87</b>
<b>Figure 31</b>	Mécanisme d'action anti-viral de la CsA	<b>87</b>
<b>Figure 32</b>	Structure des analogues de CsA : NIM 811, Debio 025 et SCY-635	<b>88</b>
<b>Figure 33</b>	Structure du Tacrolimus	<b>91</b>
<b>Figure 34</b>	Mode d'action du Tacrolimus	<b>93</b>
<b>Figure 35</b>	Hypothèse sur le mode d'action du tacrolimus dans la transformation oncogénique	<b>94</b>
<b>Figure 36</b>	Structure de la Rapamycine	<b>96</b>
<b>Figure 37</b>	Mécanismes d'action de la Rapamycine	<b>97</b>
<b>Figure 38</b>	Métabolisme du Mycophénolate mofetil	<b>101</b>

<b>Figure 39</b>	Mécanismes d'action du mycophénolate mofétil	<b>102</b>
<b>Figure 40</b>	Action anti-virale du MMF	<b>102</b>
<b>Figure 41</b>	Les corticoïdes ont une activité anti-inflammatoire en régulant l'expression de gènes cibles selon deux mécanismes distincts	<b>106</b>

**PARTIE RÉSULTATS**

<b>Figure 42</b>	Effet de la Rapamycine sur la prolifération et l'activité suppressive des Treg	<b>126</b>
------------------	--	------------

**PARTIE DISCUSSION**

<b>Figure 43</b>	Augmentation de la sécrétion de TGF- $\beta$ suite à l'activation des Treg	<b>143</b>
<b>Figure 44</b>	Activation de la transcription de l'IL-2 par les signaux TCR	<b>146</b>
<b>Figure 45</b>	Expression de Blimp-1 dans les cellules T	<b>147</b>
<b>Figure 46</b>	Modèle de l'implication de Blimp-1 dans les Treg	<b>147</b>
<b>Figure 47</b>	Rôle des Treg dans les maladies auto-immunes : leçons des modèles expérimentaux	<b>156</b>
<b>Figure 48</b>	Schématisation de l'effet de divers thérapies cellulaires dirigées contre les Treg, sur la balance Treg / Teff	<b>159</b>
<b>Figure 49</b>	Les traitements anti-tumoraux peuvent agir à différents niveaux sur les Treg	<b>161</b>

*NB : Les figures illustrant les structures des molécules ont pour source le site Wikipedia.fr*

## ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique	<b>GTP</b>	Guanosine TriPhosphate
<b>AHR</b>	Airway HyperReactivity	<b>GVHD</b>	Graft Versus Host Disease
<b>ALAT</b>	Alanine Amino-Transférase	<b>HDAC</b>	Histone DéAcétylAse
<b>AP-1</b>	Activator Protein 1	<b>HDACi</b>	Histone DéAcétylAse inhibitor
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique	<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein
<b>Aza</b>	Azathioprine	<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>Blimp-1</b>	B lymphocyte-induced maturation protein-1	<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>CBG</b>	Corticoid Binding Globulin	<b>IBD</b>	Inflammatory Bowel Disease
<b>CCL</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 1	<b>ICAM</b>	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
<b>CCR</b>	Chemokine Receptor	<b>iDC</b>	immature Dendritic Cell
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation	<b>IDO</b>	Indolamine 2,3-Dioxygenase
<b>cDC</b>	conventional Dendritic Cell	<b>IFN</b>	Interféron
<b>CDK</b>	Cyclin Dependent Kinase	<b>Ig</b>	Immunoglobulin
<b>CEA</b>	CarcinoEmbryonic Antigen	<b>IL</b>	Interleukine
<b>CGR11</b>	Glucocorticoid Receptor type II	<b>IMPDH</b>	Inosine MonoPhosphate DeHydrogénase
<b>CHC</b>	Carcinome Hépatocellulaire	<b>IP3</b>	inositol-1,4,5-triphosphate
<b>CLDN1</b>	Claudine 1	<b>IPEX</b>	Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy-X-linked syndrom
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
<b>CMV</b>	CytoMégalo Virus	<b>iTreg</b>	induced Treg
<b>CPA</b>	Cellule Présentatrice d'Antigène	<b>IVIg</b>	Intravenous Immunoglobulin
<b>CsA</b>	Cyclosporine A	<b>JNK</b>	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal Kinases
<b>CTL</b>	Cytotoxic T Lymphocyte	<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4	<b>KO</b>	KnockOut
<b>CXCR</b>	C-X-C chemokine receptor	<b>LAG-3</b>	Lymphocyte-activation protein 3
<b>CyP</b>	Cyclophiline	<b>LAT</b>	Linker for Activation of T cells
<b>DAG</b>	DiAcyl Glycérol	<b>LDL-R</b>	Low Density Lipoprotein-Receptor
<b>DC</b>	Dendritic Cell	<b>L-SIGN</b>	Liver/Lymph node-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin
<b>DC-SIGN</b>	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin	<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>DN</b>	Double Négatif	<b>MEC</b>	Matrice extra-Cellulaire
<b>DP</b>	Double Positif	<b>MMF</b>	Mycophénolate Mofétil
<b>EAE</b>	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis	<b>MPA</b>	Mycophenolic Acid
<b>EBV</b>	Epstein Barr Virus	<b>MSC</b>	Mesenchymal Stem Cell
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	<b>mTOR</b>	mammalian Target of Rapamycin
<b>Erk</b>	Extracellular signal Regulated protein Kinase	<b>N-FAT</b>	Nuclear Factor of Activated T cells
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	<b>NF-kB</b>	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>FKBP</b>	FK Binding Protein	<b>NK</b>	Natural Killer
<b>FoxP3</b>	Forkhead Box P3	<b>NKT</b>	Natural Killer T
<b>FR4</b>	Folate Receptor 4	<b>NOD</b>	Non-Obese Diabetic
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane	<b>NS</b>	Non Structurale
<b>GEF</b>	Guanine nucleotide Exchange Factor	<b>Nt</b>	Nucléotide
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein	<b>nTreg</b>	Lymphocyte T régulateur naturel CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
<b>GITR</b>	Glucocorticoid-Induced TNFR-related protein	<b>OCLN</b>	Occludine
<b>Grb2</b>	Growth factor receptor-bound protein 2	<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>GRE</b>	Glucocorticoid Responsive Element	<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell
<b>GSK</b>	Glycogen Synthase Kinase	<b>PCR</b>	Polymerase Chain reaction

## Abréviations

---

<b>PD1</b>	Programmed Death 1
<b>pDC</b>	plasmacytoïd Dendritic Cell
<b>PI3k</b>	phosphaditylinositol-3-OH kinase
<b>PIP</b>	phosphatidylinositol-3-phosphate
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PLC</b>	Progéniteur Lymphoïde Commun
<b>pSGS</b>	syndrome primaire de Goujerot-Sjogren
<b>pT<math>\alpha</math></b>	pré-chaine $\alpha$ du TCR
<b>PTEN</b>	Phosphatase and TENsin homolog
<b>RA</b>	Arthrite Rhumatoïde
<b>RAG</b>	Recombination Activating Gene
<b>Rapa</b>	Rapamycine
<b>rATG</b>	rabbit Anti-Thymocyte Globulin
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	Retinoic acid-related Orphan Receptor $\gamma$ t
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SLE</b>	Lupus Erythémateux Systemique
<b>SLPI</b>	Secretory Leucocyte Protease Inhibitor
<b>SP</b>	Simple Positif
<b>SRBI</b>	Scavenger Receptor Class B type I
<b>STAT</b>	Signal Transduction And Transcription
<b>SVR</b>	Sustained Viral Response
<b>Tac</b>	Tacrolimus
<b>TCR</b>	T Cell Receptor
<b>Teff</b>	T effecteur
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>Th</b>	T helper
<b>TH</b>	Transplantation Hépatique
<b>TIL</b>	Tumor-Infiltrating Lymphocyte
<b>Ti-Treg</b>	TGF $\beta$ induced Treg
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis factor
<b>TNFR2</b>	Type II Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Receptor
<b>Tr1</b>	Treg induit de type 1
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth factor
<b>VHB</b>	Virus de l'Hépatite B
<b>VHC</b>	Virus de l'Hépatite C
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficiência Humaine
<b>XLAAD</b>	X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome
<b>ZAP-70</b>	Zeta chain-Associated Protein kinase 70

## AVANT PROPOS

Chers lecteurs,

Cette introduction est scindée en quatre parties, afin de faciliter la lecture du manuscrit et afin de présenter chronologiquement la problématique des travaux effectués au cours de ces trois années de thèse.

La **première partie** introduit des généralités sur le développement et la fonction des lymphocytes T CD3+, et plus particulièrement des lymphocytes T CD4+.

La **seconde partie** commence par une description des différentes populations régulatrices existantes, pour développer ensuite de manière plus approfondie la sous-population de cellules T régulatrices CD4+CD25+. Ainsi, vous lirez l'histoire de la caractérisation des T régulateurs CD4+CD25+ par la découverte progressive de différents marqueurs. Les conditions et les facteurs influençant leur développement et leur homéostasie sont ensuite présentés. Finalement sont détaillés, leur fonction physiologique naturelle dans la tolérance, et pathologique dans l'auto-immunité ou le cancer, comme par exemple dans le carcinome hépatocellulaire (CHC).

La **troisième partie** s'intéresse à l'histoire du CHC associé à l'infection par le virus de l'hépatite C. Le virus de l'hépatite C, ses différents géotypes et son mécanisme de réplication sont abordés. Ensuite, le développement de la pathologie, ses complications et les traitements envisagés sont présentés. Enfin, l'immunité effectrice et régulatrice associée à l'évolution de la pathologie est expliquée.

La **quatrième et dernière partie** traite des différents immunosuppresseurs utilisés après la transplantation hépatique, de leur impact sur la récurrence de la cirrhose C après la transplantation et ainsi que de leur efficacité dans le contrôle du rejet du greffon. Cette partie présente également l'effet que peuvent avoir certaines drogues immunosuppressives sur le recrutement et la fonction des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+.

## **LE SYSTÈME IMMUNITAIRE : LES LYMPHOCYTES T CD3+**

Les lymphocytes T sont des cellules importantes de l'immunité adaptative car elles orchestrent, coordonnent et réalisent les réponses mises en œuvre pour éliminer les agents pathogènes. En effet, les lymphocytes T CD4+ (*Cluster of Differentiation*) auxiliaires ou T helpers (*Th*) sont des intermédiaires de la réponse immunitaire qui activent d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse. Les lymphocytes T CD8+, quant à eux, fonctionnent comme des cellules tueuses ou cytotoxiques car ils sont à même de détruire directement des cellules cibles exprimant les antigènes spécifiques qu'elles reconnaissent. Ces lymphocytes Tαβ sont fortement majoritaires dans l'organisme, même s'il existe une population de lymphocytes Tγδ (représentant 1 à 10% des lymphocytes T totaux) essentiellement présente dans le sang, la peau et les muqueuses.

### **A - Développement et sélection des lymphocytes T CD3+**

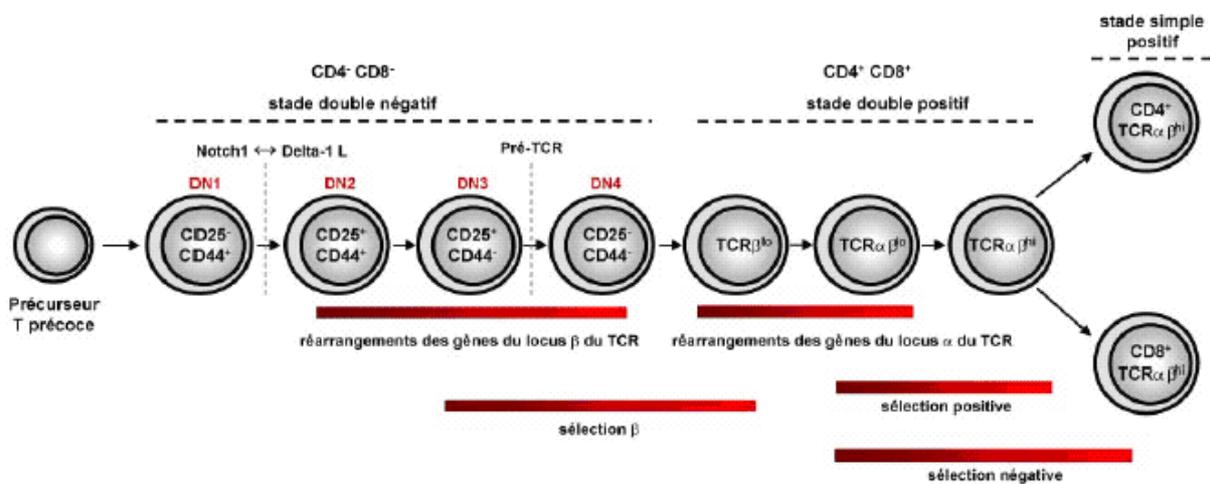
#### *1. Développement des lymphocytes T CD3+*

L'ontogenèse des lymphocytes Tαβ est un long processus qui débute, comme pour toutes les cellules d'origine hématopoïétique, au sein de la moelle osseuse au cours d'un processus appelé hématopoïèse. Au cours de cette différenciation, la cellule souche hématopoïétique peut donner soit un progéniteur myéloïde commun, soit un progéniteur lymphoïde commun (PLC). Le PLC est une cellule multipotente qui peut générer trois lignages lymphoïdes (B, T et NK) suivant les signaux qu'elle intègre. Le choix d'un lignage T conduit ce PLC à migrer en périphérie et à pénétrer au niveau du thymus pour y poursuivre son processus de différenciation. Cette phase de différenciation en cellule pro-T permet de constituer un stock de thymocytes immatures, qui vont subir un processus de sélection drastique. En effet, seuls 2% d'entre eux sortiront du thymus pour constituer le pool périphérique de lymphocytes T matures.

Le développement lymphocytaire T est instrumenté par l'expression successive et ordonnée de différents marqueurs de surface dont les co-récepteurs CD4 et CD8 et les marqueurs CD25 et CD44. Sur la base de l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8, il est possible de fractionner la maturation des thymocytes en trois étapes principales : le stade

double négatif (DN), le stade double positif (DP) et enfin le stade simple positif (SP) (Figure 1).

Au cours du stade double négatif, les thymocytes CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> représentent entre 1 et 5% des thymocytes totaux (Beals *et al.* 1997), et l'expression des marqueurs CD25 et CD44 permet de distinguer quatre stades différents, de DN1 à DN4 (Godfrey *et al.* 1993). Le stade DN1 se caractérise par l'expression unique du marqueur CD44. La transition du stade DN1 à DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) s'accompagne d'une intense prolifération, dépendante de l'IL-7 (von Freuden-Jeffry *et al.* 1995). Au cours des stades DN2 et DN3 se produit le réarrangement des gènes codant la chaîne  $\beta$  du TCR (*T Cell Receptor*). La chaîne  $\beta$  fonctionnelle peut alors s'apparier avec la pré-chaîne  $\alpha$  (pT $\alpha$ ), pour former le complexe pré-TCR (Saint-Ruf *et al.* 1994; von Boehmer 2005). L'initiation de la transduction du signal par ce complexe permet de lever le blocage au stade DN3. Le stade DN4 est associé à la perte du marqueur CD25 puis à la co-expression des marqueurs CD4 et CD8 effectuée en parallèle d'une prolifération cellulaire intense, marquant le début du stade DP (Alam *et al.* 1996), soit 80 à 90% des thymocytes totaux (Sebzda *et al.* 1999). A partir de là, vont débiter les recombinaisons géniques de la chaîne  $\alpha$  du TCR, permettant l'expression d'un TCR fonctionnel à la surface des cellules DP.



**Figure 1 : Principales étapes du développement thymique des lymphocytes T.** Le processus de maturation intra-thymique des précurseurs T a pour objectif la génération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> matures. Durant leur développement aux stades double négatif et double positif, les thymocytes vont subir un remodelage génique afin d'exprimer un TCR $\alpha\beta$  fonctionnel (Sebzda, *et al.* 1999).

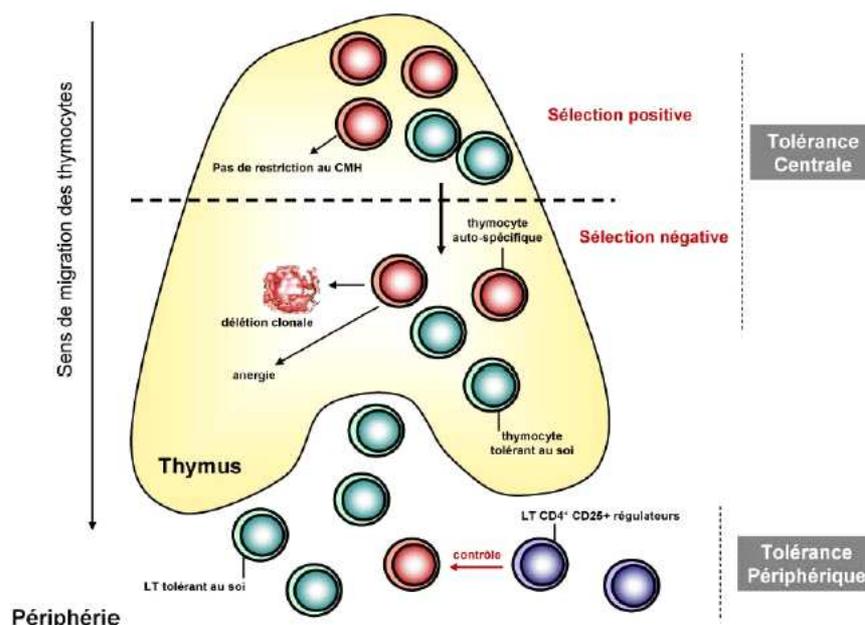
## 2. Sélection des lymphocytes T CD3+

La sélection des lymphocytes T matures s'opère via deux processus, la sélection positive puis la sélection négative (Figure 2). L'expression du TCR $\alpha\beta$  mature à la surface

des thymocytes marque le début de la sélection positive. Ce TCR est généré aléatoirement et est spécifique d'un antigène donné. Cependant pour être sélectionné positivement, il doit être capable de reconnaître des peptides antigéniques présentés par un CMH (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité*). Le paramètre affinité du TCR vis-à-vis des complexes CMH / peptide antigénique aboutira à une élimination de près de 90% des lymphocytes DP étant incapables d'intégrer les signaux de survie nécessaires.

Après cette première sélection, les thymocytes subissent une sélection négative. L'objectif étant cette fois d'éliminer les cellules ayant une trop forte affinité pour les complexes CMH / peptide antigénique du soi, soit par induction d'apoptose (délétion clonale) ou par inactivation fonctionnelle (anergie). Ces thymocytes ayant un TCR potentiellement auto-réactif peuvent, en effet, être à l'origine du développement d'une réponse auto-immune (Weih *et al.* 1995).

Malgré l'efficacité de la sélection thymique, des lymphocytes T pouvant reconnaître des antigènes du soi échappent à cette double sélection et émergent dans la circulation sanguine et dans les tissus lymphoïdes périphériques. Afin de palier à cet « échappement » il existe des mécanismes de tolérance périphérique actifs réalisés par les lymphocytes T CD4+CD25+ régulateurs (Redmond and Sherman 2005; Walker and Abbas 2002) (Figure 2).



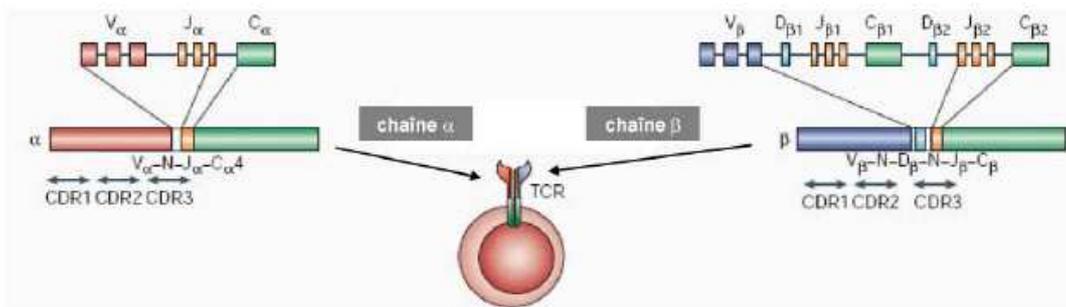
**Figure 2 : Schématisation des processus de sélection thymique.** Après avoir réarrangé les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR les thymocytes subissent une première sélection, la sélection positive, où la restriction au CMH conditionne la survie des thymocytes. La sélection négative permet ensuite d'éliminer les thymocytes ayant une trop forte autospécificité (apoptose, anergie). Une fois la périphérie atteinte, une partie des LT potentiellement autoréactifs est contrôlée par les LT CD4+CD25+ régulateurs, mécanisme « actif » majeur de la tolérance périphérique.

Les thymocytes ayant passé la sélection positive et négative sont des lymphocytes T SP dits naïfs (car ils n'ont jamais été en contact avec l'antigène dont ils sont spécifiques). Une fois hors du thymus, ces lymphocytes T vont circuler par voie systémique continuellement entre les différents organes lymphoïdes secondaires dans l'attente de l'éventuelle rencontre avec l'antigène dont ils sont spécifiques, et qui va permettre leur prolifération, différenciation et l'acquisition de fonctions effectrices.

## B - Récepteur à l'antigène des lymphocytes T CD3+ : le T Cell Receptor (TCR)

### 1. Organisation génique du TCR

L'organisation des gènes du TCR est réalisée de manière aléatoire. Ce mécanisme a pour but d'assurer le plus large répertoire de TCR, capable d'interagir spécifiquement avec le plus grand nombre de peptides antigéniques portés par les différents agents pathogènes. C'est dans le thymus, lors du développement des lymphocytes T, qu'a lieu le réarrangement des gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , grâce aux enzymes de recombinaisons RAG1 (*Recombination Activating Gene*) (Mombaerts *et al.* 1992) et RAG2 (Shinkai *et al.* 1993). Chez l'homme, les loci  $\alpha$  et  $\beta$  sont composés, dans leur configuration germinale, de segments V (Variable), J (Joining) et C (Constant) pour la chaîne  $\alpha$  et V, D (Diversity), J et C pour la chaîne  $\beta$ . Tout d'abord, les gènes de la chaîne  $\beta$  se réarrangent avec l'association d'un segment D avec un segment J, puis un segment V est réarrangé avec le segment DJ (Figure 3). Dans un second temps, le réarrangement des gènes codant la chaîne  $\alpha$  se déroule de façon similaire. Par ces mécanismes, la multiplicité des segments de gènes permet d'établir une importante diversité combinatoire et jonctionnelle (Arden *et al.* 1995).

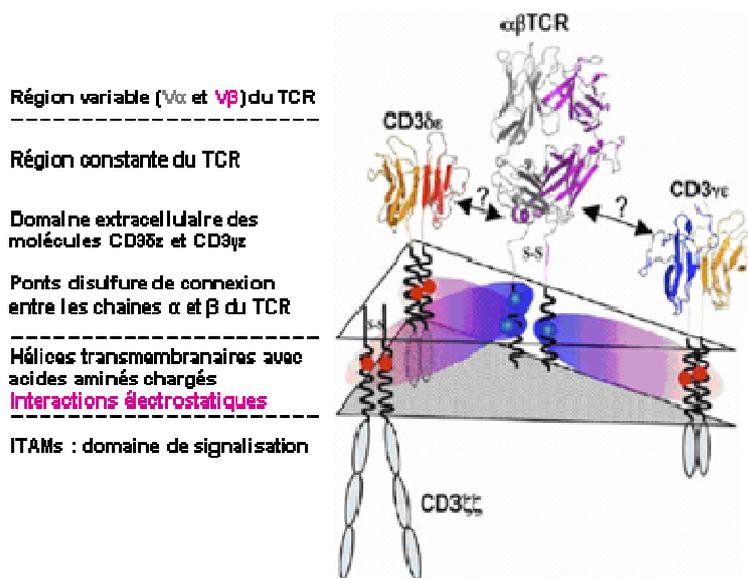


**Figure 3 : Réarrangements des segments de gène codant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR.** La chaîne  $\beta$  est la première à être réarrangée, d'abord les segments D et J, puis le segment V sont réarrangés. Un réarrangement productif permettra d'initier le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  (Nikolich-Zugich *et al.* 2004).

Le nombre de TCR pouvant être sélectionnés au cours du développement thymique est estimé à plus de  $10^{13}$ . L'évaluation de cette diversité en périphérie a été estimée à  $2 \times 10^7$  TCR chez l'homme (Nikolich-Zugich, et al. 2004) (revue).

## 2. Structure protéique du complexe TCR/CD3

La cellule T via son TCR accumule des informations quantitatives et qualitatives sur l'antigène présenté par le complexe CMH I ou II. Cependant, l'absence de domaines intracellulaires pour le TCR nécessite son association avec des molécules CD3, dotées d'importants domaines intracellulaires de signalisation. 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 Tyrosine-based Activation Motifs*) (Figure 4). La phosphorylation des tyrosines de ces motifs va permettre le recrutement de protéines de signalisation (Samelson et al. 1985) et va pouvoir induire les voies de transduction du signal permettant ainsi l'activation de la cellule T (Clevers et al. 1988).



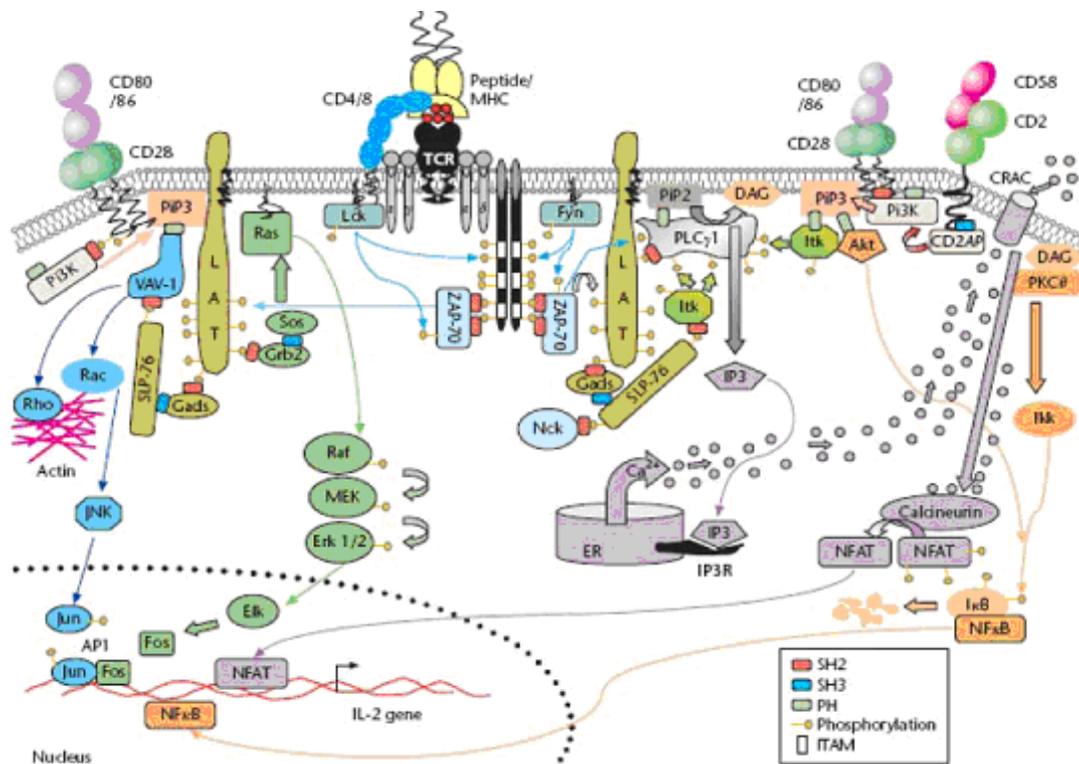
**Figure 4: Organisation spatiale du complexe TCR/CD3.** Le TCR constitué de deux chaînes  $\alpha$  (gris) et  $\beta$  (violet) a pour fonction principale la reconnaissance du complexe CMH/peptide antigénique. Cette reconnaissance permet de recueillir des informations qualitatives et quantitatives qui seront traduites en cascade par des voies de signalisation intracellulaire induites par les molécules CD3, portant des motifs ITAMs (Kuhns et al. 2006).

## C - Transduction du signal d'activation

La transduction du signal au sein du lymphocyte T est induite par la reconnaissance d'un complexe CMH / peptide par le TCR. Le type de réponse produite par le lymphocyte T dépend des différents facteurs de transcription activés par ces voies de signalisation. Celle ci peut être l'induction d'une prolifération cellulaire, d'une différenciation ou bien

d'une fonction cytotoxique. La compréhension de ces mécanismes est d'importance majeure en transplantation par exemple, car elle est la base des mécanismes d'action des drogues immunosuppressives utilisées en pratique courante chez les patients transplantés.

La signalisation mise en place suite à l'interaction du TCR avec son ligand spécifique peut être divisée séquentiellement en trois phases. Tout d'abord, l'activation et le recrutement rapide de protéines tyrosines kinases comme Lck et Fyn (des Src kinases) qui vont phosphoryler les tyrosines des motifs ITAM des molécules CD3. Ceci permet le recrutement et la phosphorylation de la protéine tyrosine kinase ZAP-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) (van Oers et al. 1994). ZAP-70 peut alors phosphoryler la protéine adaptatrice LAT (Linker for Activation of T cells), molécule pivot dans la mise en place et la connexion des différentes voies de signalisation (Zhang et al. 1998), permettant l'activation de facteurs de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), NFkB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et AP-1 (Activator Protein-1), initiant ainsi l'expression sélective de gènes codant des cytokines, des récepteurs, etc. (Figure 5).



**Figure 5 : Voies de transduction du signal en aval du TCR.** Quatre principales voies sont observables, chacune identifiée par une couleur différente : la voie Ca<sup>2+</sup>/calcineurine en violet, la voie de la PKCθ en orange, la voie des MAPK en vert et la voie JNK/Jun en bleu. Les protéines adaptatrices sont en marron. Toutes ces voies de signalisation convergent vers le noyau de la cellule T où des facteurs de transcription vont pouvoir induire l'expression de certains gènes (IL-2, etc) (Valitutti 2006).

La **PLC $\gamma$ 1** recrutée par LAT conduit à la formation de deux seconds messagers : l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG) (Bacchetta *et al.* 2006) nécessaire à la mise en place des autres voies de signalisation (Figure 5).

Tout d'abord la **voie calcique**, où la fixation de l'IP<sub>3</sub> sur ses récepteurs présents à la surface du réticulum endoplasmique va permettre le relargage des stocks de calcium réticulaires dans le cytoplasme et l'ouverture des canaux calciques calcium dépendants (canaux CRAC) au niveau de la membrane plasmique. Le calcium va alors se fixer sur la calmoduline, ce qui permet l'activation de la calcineurine. La calcineurine est une phosphatase qui assure la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT, permettant sa translocation nucléaire. NFAT induit l'expression de multiples gènes dont celui de l'IL-2 (Feske *et al.* 2001; Lewis 2001) (Figure 5).

Le DAG induit la **voie de la PKC $\theta$** , en phosphorylant la PKC $\theta$ , il favorise son activation ainsi que son recrutement au niveau des « rafts » membranaires (Bi *et al.* 2001). La PKC $\theta$  va activer I $\kappa$ B qui phosphoryle I $\kappa$ B, alors dégradé au niveau du protéasome (Isakov and Altman 2002), libérant ainsi NF $\kappa$ B qui est transloqué dans le noyau pour activer la transcription des cytokines (Figure 5).

Suite à l'engagement du TCR avec son ligand spécifique la protéine LAT peut également lier la protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) (Zhang *et al.* 2000), qui recrute la GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) Sos ce qui permet l'activation de la GTPase Ras. Ras active ensuite la **voie des MAPK** (*Mitogen Activated Protein Kinase*). La MAPKKK Raf-1 phosphoryle Erk 1 et 2 (*Extra-cellular signal-Regulated protein Kinase*), qui sont alors transloquées dans le noyau et activent différents facteurs de transcription (Rincon 2001; Treisman 1996) (revues) (Figure 5). En parallèle, la protéine Vav est phosphorylée et recrutée au niveau de SLP-76, induisant la phosphorylation de **JNK** (*c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinases*) par la Rho GTPase Rac. JNK peut alors phosphoryler c-Jun, qui s'associe à c-Fos pour former le complexe AP-1, facteur de transcription de certains gènes de l'immunité, telle que l'IL-2 (*Interleukin-2*) (Figure 5).

Après engagement du TCR, la **Pi3k** (*phosphatidylinositol-3-OH kinase*) est rapidement activée et recrutée au niveau membranaire (Harriague and Bismuth 2002). L'activation de la Pi3K produit du phosphatidylinositol-3-phosphate (PiP), du phosphatidylinositol-3,4-phosphate (PiP<sub>2</sub>) ainsi que du phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate (PiP<sub>3</sub>). Ces lipides membranaires permettent le recrutement à la membrane

plasmique de plusieurs protéines, telles que Akt / PKB, qui vont alors (i) stimuler les facteurs de transcription E2F (contrôle du cycle cellulaire), (ii) inhiber FoxO1 (impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire) (Fabre et al. 2005), (iii) inactiver GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*), responsable de l'export nucléaire de N-FAT (Beals, et al. 1997) et ainsi intervenir dans la régulation de la production cytokinique.

L'activation de ces voies de signalisation va permettre d'orienter la différenciation du lymphocyte T vers des fonctions effectrices différentes.

## **D - Fonctions effectrices des lymphocytes T**

### **1. Les lymphocytes T CD8+**

L'activation et la différenciation du lymphocyte T CD8+ est initiée lors de la rencontre entre une cellule T CD8+ naïve et une CPA (*Cellule Présentatrice d'Antigène*) présentant un antigène peptidique spécifique par le CMH I, au sein des organes lymphoïdes secondaires. La reconnaissance du ligand spécifique à la surface d'une CPA permet l'activation de ces cellules et leur différenciation en Lymphocytes T Cytotoxiques (CTL : *Cytotoxic T Lymphocyte*). Les CTL ont pour fonction d'éliminer les cellules infectées ou les cellules cancéreuses et de contrôler de nombreuses infections virales et bactériennes. Il a été montré *in vivo* une infiltration de CTL spécifiques d'antigènes tumoraux ou TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*), au sein de tumeurs solides, conduisant à l'élimination des cellules cancéreuses (Boissonnas et al. 2007). Les mécanismes cytotoxiques utilisés par les CTL sont multiples. Ils peuvent notamment sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  qui entraînent la mort des cellules cibles. Dans le cadre de l'immunité anti-tumorale, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les CTL est très importante, de par ses effets anti-angiogéniques et cytostatiques sur la prolifération des cellules cancéreuses (Dunn et al. 2006) (revue). Mais, le mécanisme clé dans l'action cytotoxique des CTL est la voie perforine/granzyme (Yannelli et al. 1986). Il a été proposé que la perforine induisait la mort des cellules cibles en créant des pores dans leurs membranes plasmiques (Henkart and Henkart 1982), ce qui a été confirmé par son homologie de séquence avec la protéine C9 du complément, qui est connue pour former des pores dans les membranes cellulaires (Tschopp and Mollnes 1986). En plus de la

fonction lytique de la perforine, il y a également altération de la cellule cible par le relargage de sérines protéases appelées les granzymes A et B (Lowin *et al.* 1995). Après avoir pénétré dans la cellule cible par les pores membranaires réalisés par la perforine, les granzymes induisent l'apoptose de la cellule (Heusel *et al.* 1994). Les granzymes A induisent un processus apoptotique au sein de la cellule cible via une voie indépendante des caspases (Beresford *et al.* 2001) alors que les granzymes B utilisent une voie dépendante des caspases (Sutton *et al.* 2003). D'autres protéines sont également présentes dans les granules lytiques des CTL comme par exemple la granulysine qui détériore les membranes bactériennes (Stenger *et al.* 1998) et qui peut *in vitro* avoir des propriétés pro-apoptotiques sur des lignées de cellules tumorales (Wang *et al.* 2000). Un autre mécanisme cytotoxique utilisé par les CTL est la voie Fas / Fas-Ligand (Fas-L) (Ostergaard *et al.* 1987). L'expression de Fas-L à la surface des CTL augmente après la stimulation du TCR. Elle va permettre la stimulation du récepteur Fas (récepteur de mort appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF) sur la cellule cible, induisant l'activation de la caspase 8 et donc l'apoptose de la cellule (Scaffidi *et al.* 1998). Ces fonctions cytotoxiques des T CD8+ sont initiées grâce à la production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4+ (Bevan 2004).

## 2. La complexité du lignage T CD4+ helper : Th1, Th2 et les autres

Les lymphocytes T CD4+ helper représentent une population hétérogène jouant un rôle essentiel dans la réponse immunitaire adaptative. Ce lignage est constitué de cellules effectrices et de cellules régulatrices. Les lymphocytes T helpers ou auxiliaires sont appelés ainsi car ils permettent d'aider au développement des réponses cellulaires et humorales, notamment en participant à la commutation isotypique des lymphocytes B ainsi qu'au développement et au maintien de l'activité des T CD8+.

L'existence d'au moins deux populations de cellules T CD4+, les Th1 et Th2, a été démontrée pour la première fois en 1972 par Parish et Liew (Parish and Liew 1972). Quelques années plus tard, leur hétérogénéité fonctionnelle a été attribuée à leur profil de sécrétion cytokinique différent (Mosmann *et al.* 1986). Elles dériveraient d'un précurseur commun, sécrétant de l'IL-2 mais pas d'IL-4 ni d'IFN- $\gamma$ , qui va se différencier en lymphocyte Th0 produisant à la fois les cytokines Th1 et Th2 après stimulation. Suite à la

phase de développement intrathymique, ces lymphocytes Th0 rejoignent les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques), où ils interagissent avec des cellules dendritiques (DC : *Dendritic Cell*) présentatrices d'antigène. La reconnaissance du peptide antigénique présenté par le CMH de classe II des DC, permet alors au lymphocyte T CD4+ de s'activer, de proliférer et d'acquérir ses fonctions effectrices.

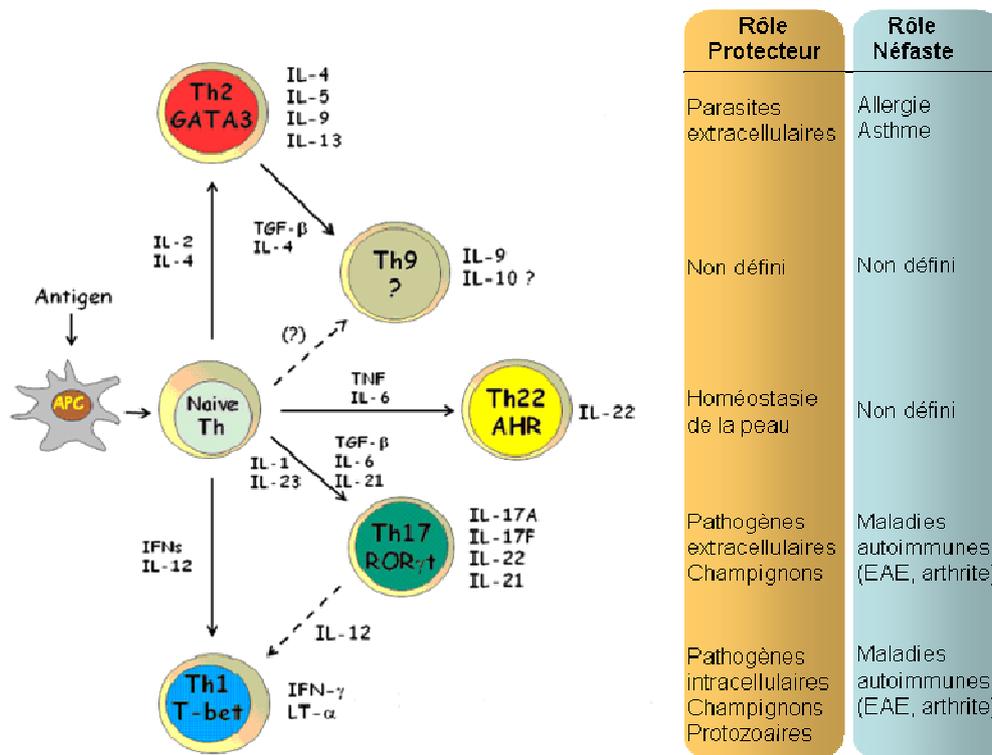
La différenciation en **lymphocytes Th1 ou Th2** dépend ensuite de facteurs environnementaux tels que les cytokines (Figure 6). Ainsi, la différenciation des Th1 est dépendante de l'IL-12 (Hsieh *et al.* 1993) sécrétée par des DC et de l'IFN- $\alpha$  (*Interféron- $\alpha$* ) (Parronchi *et al.* 1992) sécrété par les cellules NK (*Natural Killer*), en réponse à une infection parasitaire ou à certains virus (Abbas *et al.* 1996) (revue). De plus, l'IL-12 a une action répressive sur l'expression du facteur de transcription Gata-3, régulateur clé du développement Th2 (Ouyang *et al.* 1998). En parallèle, l'IFN- $\gamma$  active, via STAT1 (*Signal Transduction And Transcription*), le facteur de transcription T-bet requis pour la polarisation Th1 (Afkarian *et al.* 2002). L'IL-4, quant à elle, permet l'orientation vers un phénotype Th2. La source principale d'IL-4 semble être les lymphocytes T CD4+ eux-mêmes, mais elle peut être également produite par les mastocytes, les basophiles et les cellules NKT (*Natural Killer T*) (Le Gros *et al.* 1990; Noben-Trauth *et al.* 2000). La signalisation induite par l'IL-4 permet, via STAT6, la transcription du facteur de transcription clé dans la polarisation Th2 : Gata-3 (Zhu *et al.* 2001).

Ces deux populations de Th vont, par leur sécrétion de cytokines, s'inhiber mutuellement, favorisant ainsi leur propre développement (O'Garra 1998). Le lignage Th1 est impliqué dans les réponses contre les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries...). Le profil de sécrétion cytokinique est de type pro-inflammatoire (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), lymphotoxine ou TNF- $\beta$ ). Par ailleurs, les cellules Th1 agissent sur les CPA en augmentant leur capacité de phagocytose, leur production de médiateurs pro-inflammatoires ainsi que leur capacité de présentation antigénique et d'activation des lymphocytes T naïfs. En outre, les Th1 peuvent être impliqués dans certaines maladies auto-immunes et maladies inflammatoires chroniques, telles que la maladie de Crohn ou l'athérosclérose (Murphy and Reiner 2002). Les lymphocytes Th2, quant à eux, sont impliqués dans les réponses contre les pathogènes extracellulaires (parasitoses...) avec le profil cytokinique suivant : IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13. Les lymphocytes Th2 sont également impliqués dans le développement des maladies allergiques (Romagnani

2000) (revue); où ils sont en mesure d'activer les éosinophiles via l'IL-5 et l'IL-13 (importance dans le rejet de greffe) et jouent un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B. Ils ont également un effet inhibiteur sur les réponses pro-inflammatoires, par leur sécrétion d'IL-10, IL-4 et IL-13.

Des données récentes ont suggéré l'existence d'une nouvelle sous-population de lymphocytes T CD4+ « *helpers* », **les lymphocytes Th17**, producteurs d'IL-17 (Figure 6). Dès 2005, des études ont montré que les Th17 ne seraient pas un variant des lignées Th1 ou Th2, mais bien un lignage à part entière. En effet, en l'absence d'IL-4, d'IFN- $\gamma$  et des facteurs de transcription STAT1 et STAT6, les précurseurs naïfs se différencient en lymphocytes Th17 (Harrington *et al.* 2005; Park *et al.* 2005). L'identité cellulaire de cette population a été confirmée par la découverte d'un facteur de transcription spécifique : ROR $\gamma$ t (*Retinoic acid-related Orphan Receptor gamma t*), dont l'expression est induite par la combinaison d'IL-6 et de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth factor- $\beta$* ) (Ivanov *et al.* 2006). Chez la souris, l'IL-23, cytokine de la famille de l'IL-12, bien qu'importante dans le maintien des réponses Th17 (Dong 2006; Weaver *et al.* 2007) (revues) ne semble pas être critique pour leur induction, il apparaît que ce soit plutôt la combinaison d'IL-6 et de TGF- $\beta$  qui soit cruciale (Bettelli *et al.* 2006; Mangan *et al.* 2006). Chez l'Homme, l'importance du TGF- $\beta$  dans le développement des Th17 semble controversée et il semblerait que ce soit l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 qui permettraient la différenciation d'un CD4+CD161+ en lymphocyte Th17 (Annunziato and Romagnani 2009; Cosmi *et al.* 2008). Les Th17 ont, en plus de leur fonction dans la protection de l'hôte contre les pathogènes, un rôle dans le développement des manifestations auto-immunes, telles que la sclérose multiple, l'arthrite rhumatoïde ou le psoriasis (Ivanov, *et al.* 2006). Par ailleurs, les cellules Th17 semblent être les cellules responsables des maladies inflammatoires chroniques (Annunziato and Romagnani 2009) (revue). Une notion intéressante, suggérée par Bettelli *et al.*, est qu'il y aurait, en fonction de la quantité de TGF- $\beta$  et d'IL-6 présente dans le microenvironnement, une différenciation des précurseurs T CD4+ soit en T<sub>i</sub>-Treg (TGF- $\beta$  *induced Treg*, néo-conversion de lymphocytes T CD4+CD25-Foxp3- en lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3+ régulateurs) si la concentration en TGF- $\beta$  est supérieure, soit en lymphocytes Th17 si la concentration en IL-6 est plus importante. En situation physiologique, le TGF- $\beta$  prépondérant, favoriserait la génération de Treg afin d'assurer la

tolérance périphérique au soi, alors que dans une situation physiopathologique et inflammatoire, l'IL-6 produit par les cellules de l'immunité innée favoriserait plutôt le développement d'effecteurs afin d'assurer une réponse optimale (Bettelli, *et al.* 2006). Par ailleurs, il a été récemment décrit une trans-différenciation des Treg en cellules Th17, sous l'action de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-2 (Deknuydt *et al.* 2009; Koenen *et al.* 2008). De même, il a été récemment montré que les cellules Th17 différenciées à partir de T CD4+, se trans-diffénciaient en fait à partir de la population régulatrice FoxP3+, sous l'action de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-2. L'IL-1 $\beta$  induirait ainsi l'expression du récepteur à l'IL-1 (IL-1R), qui de par sa signalisation diminuerait l'expression de FoxP3 en faveur d'une expression de ROR $\gamma$ t (Valmori *et al.* 2010). Au contraire, il semblerait qu'au cours de pathologies inflammatoires, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  permettent aux cellules souches mésenchymateuses (MSC, *Mesenchymal Stem Cell*) d'induire des cellules T régulatrices fonctionnelles au sein des Th17, et ceci via une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et de la méthylation du promoteur de FoxP3 et une diminution de la méthylation du gène RORC (Ghannam *et al.* 2010).



**Figure 6 : Différenciation et rôle du lignage CD4+ helper.** La différenciation des différentes populations T CD4+ effectrices est un processus initié par l'interaction entre une cellule présentatrice d'antigène et un précurseur T naïf. L'environnement cytokinique, généré par la réponse innée initiale, joue un rôle important dans la détermination du type de cellule effectrice qui sera induit. Chaque sous-population de T helpers possède ainsi sa propre signature moléculaire et développe des fonctions protectrices et pathogéniques différentes. Adapté de (Annunziato and Romagnani 2009)

L'IL-22, cytokine sécrétée par les cellules Th17, a récemment permis de distinguer une autre population de cellules T CD4+, **les Th22** (Duhén *et al.* 2009; Trifari *et al.* 2009) (Figure 6). Leur différenciation se fait en présence d'IL-6 et de TNF ou en présence de DC plasmacytoïdes (pDC). Ces cellules ont un phénotype mémoire (Annunziato and Romagnani 2009; Trifari, *et al.* 2009). De par leur forte sécrétion d'IL-22, cytokine agissant sur les cellules non hématopoïétiques (cellules épithéliales ou kératinocytes), et l'expression du récepteur CCR10 (*Chemokine Receptor*, récepteur à la chimiokine CCL27 (*Chemokine (C-Cmotif) Ligand*) produite par les kératynocytes), ces cellules présenteraient un tropisme cutané. Cependant, le CCR10 est aussi le récepteur de la chimiokine CCL28, sécrétée par certaines muqueuses (intestin, poumons, seins), et conférerait ainsi un tropisme mucosal aux cellules Th22 (Yssel and Bensussan 2010) (revue). La validation du tropisme de ces cellules devrait permettre de déterminer leur implication dans les pathologies cutanées tels que le psoriasis (Duhén, *et al.* 2009; Trifari, *et al.* 2009).

Par ailleurs, une nouvelle population de cellules T CD4+ helper productrices d'IL-9, **les Th9**, a récemment été identifiée chez la souris (Dardalhon *et al.* 2008; Veldhoen *et al.* 2008). La culture de cellules Th2, en présence d'IL-4 et de TGF- $\beta$ , permettrait le développement d'une population CD4+ sécrétrice d'IL-9 et d'IL-10, non régulatrice. Peu de choses sont connues sur ces cellules Th9, mais elles semblent favoriser l'inflammation tissulaire.

Les études récentes sur le lignage T CD4+ ont permis de démontrer que ces cellules étaient beaucoup plus hétérogènes qu'on ne le pensait. Selon le pathogène et le type d'interaction avec la CPA, un même lymphocyte T semble pouvoir modifier la répartition de ses protéines de signalisation et évoluer vers un lignage T helper ou T régulateur plus adapté au type de réponse immunitaire nécessaire (Chang *et al.* 2007).

## **LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS**

Une des grandes interrogations en immunologie depuis les cinquante dernières années est de comprendre comment le système immunitaire réussit si finement à discriminer le soi du non soi, empêchant ainsi le développement de réponses auto-immunes tout en favorisant une immunité efficace contre les pathogènes (virus, bactéries...) ou contre les tumeurs (soi modifié, antigènes embryonnaires ou viraux).

La fin des années 1960 a marqué le début de travaux qui ont suggéré, pour la première fois, l'existence d'un mécanisme d'induction de tolérance au soi. Nishizuka *et al.* montrent, en effet, dans un modèle murin de thymectomie néonatale, réalisée trois jours après la naissance, que l'absence de thymus conduit à des anomalies ovariennes qui peuvent être prévenues par la greffe d'un thymus provenant d'un animal histocompatible (Nishizuka and Sakakura 1969). En 1981, des travaux de transferts de splénocytes sur des souris thymectomisées trois jours après la naissance ont également montré une réversion des anomalies ovariennes induites par l'ablation du thymus. Ces travaux ont suggéré l'existence d'une sous-population de cellules T suppressives qui contrôlerait en périphérie le compartiment lymphocytaire T autospécifique (Taguchi and Nishizuka 1981). Depuis, de nombreuses équipes ont essayé de mieux caractériser, phénotyper et isoler cette sous-population lymphocytaire suppressive, dans différents modèles. Elles ont rencontré de nombreuses difficultés liées notamment à l'absence de marqueurs réellement spécifiques et à la complexité de leurs mécanismes d'action.

### **A - Les différentes sous-populations de lymphocytes T régulateurs**

Toute cellule ayant une activité immunosuppressive est définie comme une cellule régulatrice. Initialement identifiés en situation de désordres immunologiques tels que certaines pathologies auto-immunes inflammatoires, les lymphocytes T régulateurs se caractérisent par leur capacité à inhiber la réponse T helper et T cytotoxique. Ces cellules se distinguent également par un profil de cytokines distinct de celui des cellules Th1 et Th2. Bien que considérées comme jouant un rôle prépondérant dans le maintien de la tolérance au soi, des études récentes suggèrent que les cellules T régulatrices pourraient également être induites *in vivo* contre des antigènes bactériens, viraux ou parasitaires et

pourraient favoriser la persistance du pathogène en supprimant la réponse Th1 protectrice (Belkaid and Rouse 2005). Deux groupes de cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices sont distingués, les lymphocytes T régulateurs dits « naturels » et les T régulateurs dits « induits ».

### 1. Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg)

Les nTreg sont des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques des antigènes du soi qui expriment le CD25 (récepteur  $\alpha$  à l'IL-2) et le facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box P3*) à des niveaux élevés. Leur phénotype se distingue également par l'expression des marqueurs CD62 ligand, CD103, GITR (*Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor*), CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), CD152, neurophiline et CD45RO. Les nTregs sont sélectionnés dans le thymus où elles deviennent des cellules T régulatrices. Cette population sera décrite de manière plus détaillée dans la suite de l'introduction.

### 2. Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg)

Les iTreg sont le résultat, de (i) l'activation d'une cellule T mature en l'absence d'une exposition à un antigène ou en présence de certaines cytokines inhibitrices, ou de (ii) la conversion de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naives. Parmi les Treg induits, on distingue les cellules T régulatrices de type 1 (Tr1), les cellules Th3 et plus récemment les Ti-Treg. Les Tr1 et les Th3, contrairement aux nTreg, sont spécifiques d'antigènes non présents dans le thymus tels que les antigènes de la tolérance orale, de la flore bactérienne, certains antigènes issus de pathogènes ou des auto-antigènes modifiés (Cottrez and Groux 2004).

#### a. Les cellules CD4<sup>+</sup> Th3

Les cellules CD4<sup>+</sup> Th3 ont été identifiées lors de l'analyse des mécanismes de tolérance orale. Les cellules Th3 se distinguent des cellules T effectrices par leur sécrétion accrue de TGF- $\beta$  et leur activité suppressive contre les cellules Th1 et Th2. Ces cellules peuvent être différenciées, *in vitro* à partir de précurseurs Th, en présence de TGF- $\beta$ , d'IL-4, d'IL-10 et d'anti-IL-12 ; et *in vivo*, suite à l'administration orale d'IL-4. Ces cellules sont activées de manière antigène dépendante mais ont un mécanisme de suppression indépendant de la spécificité antigénique (Weiner 2001) (revue). Les cellules Th3 ont également la capacité d'induire l'expression de FoxP3 à la fois dans les cellules CD25<sup>-</sup> et CD25<sup>+</sup>, elles favorisent donc la différenciation de cellules régulatrices FoxP3<sup>+</sup> (Carrier *et al.* 2007).

b. Les T régulateurs CD4-

Une population de cellules régulatrices doubles négatives CD4-CD8- a été observée dans les tissus lymphoïdes périphériques. Elles représentent 1 à 5% des cellules Tαβ et ont une activité suppressive sur la réponse immune. Peu de choses sont connues quant à leur origine. Certaines études ont montré qu'elles dériveraient de cellules CD8+, de cellules NK, et plus récemment de cellules CD4+ via une inhibition de la transcription du gène CD4 (Zhang *et al.* 2007).

Récemment, une population de cellules CD4<sup>low</sup>/negCD25<sup>+</sup> a été identifiée dans des cultures *ex vivo* de cellules T conventionnelles et de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Cette population, qui présente un phénotype activé, est constituée à la fois de cellules Tγδ et Tαβ et semble pré-exister à faible fréquence dans le sang. Elle a une activité suppressive, contact dépendante, très importante *in vitro* qui dépasserait celle des Treg naturels (Vogtenhuber *et al.* 2008).

c. Les T régulateurs induits de type 1 (Tr1)

Les Tr1 sont induits en périphérie par les cellules dendritiques immatures (iDC) CD11c<sup>low</sup> CD45RB<sup>high</sup> et en présence d'IL-10 autocrine (Hori *et al.* 2003). L'IL-10 joue un rôle central dans leur différenciation en coopération avec l'IFNα produit par les pDC (Fujio *et al.* 2010) (revue). Par ailleurs, des DC maturées en présence d'IL-10 semblent plus aptes à générer des Tr1 que les iDC (Fujio, *et al.* 2010; Roncarolo *et al.* 2006) (revues). Ils migrent directement au site de l'inflammation où ils inhibent les réponses vis-à-vis d'antigènes non exprimés dans le thymus et participent ainsi à la tolérance périphérique.

Les Tr1 ont à la fois les marqueurs phénotypiques des Th1 et des Th2, mais ils présentent également un phénotype de surface particulier, incluant la molécule T1/ST2, les distinguant des Th1, et le CCR5, les distinguant des Th2 (McGuirk *et al.* 2002). Il a été décrit que l'expression concomitante de l'intégrine α2 (CD49b) et β2 (CD18) à la surface d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> permettait de caractériser spécifiquement un lymphocyte Tr1 (Rahmoun *et al.* 2006). Les Tr1 sont caractérisés par une production élevée d'IL-10 et de TGF-β, cytokines leurs permettant d'avoir une activité immunosuppressive. Des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves peuvent se transformer en Tr1 et produire de l'IL-10 en présence de certaines drogues immunosuppressives ou d'une stimulation chronique avec des antigènes infectieux, tumoraux ou allergiques (Groux 2003; Groux *et al.* 1997).

Les Tr1 expriment le CXCR3 (*C-X-C Chemokine Receptor*), CCR5, CCR3, CCR4 et CCR8. Et lorsqu'ils sont activés ils expriment CD40L, CD69, CD28, CTLA-4, IL-2R- $\alpha$ , IL-15R $\alpha$  et HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen*). Après stimulation via leur TCR, les Tr1 sécrètent de fortes quantités d'IL-10, de TGF- $\beta$  et d'IL-5, de faibles quantités d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 et pas d'IL-4 (Kleinewietfeld *et al.* 2009). La sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- $\beta$ ) leur permet d'inhiber les réponses T auxiliaires naïves de type 1 et 2, mais également les réponses T mémoires. Ils présentent donc un mécanisme immunosuppresseur cytokine-dépendant, principalement via l'IL-10 qui inhibe les DC et les monocytes. En effet, la sécrétion d'IL-10 est détectée dès 4h après l'activation et la concentration maximale est atteinte 12h à 24h après l'activation (Bacchetta *et al.* 1994).

Les cellules Tr1 sont anergiques *in vitro* après stimulation via le TCR et cet état d'anergie est attribué à l'effet autocrine de l'IL-10. Cependant, la stimulation par le TCR est indispensable à l'acquisition des fonctions régulatrices (Groux 2003). Contrairement aux cellules T effectrices et aux T régulateurs CD4+CD25+, leur facteur de prolifération principal est l'IL-15, et non l'IL-2. Les Tr1 sont antigènes spécifiques mais leur suppression est dite « collatérale » car ils affectent toutes cellules à proximité, à la différence des T régulateurs CD4+CD25+ qui sont plus précis grâce à leur mécanisme d'action contact dépendant. Il apparait tout de même que dans certaines situations, telle l'allergie, l'activation des Tr1 nécessite un signal contact-dépendant via les molécules PD-1 (*Programmed Death-1*), GITR, CTLA-4 ou le TGF- $\beta$  membranaire. Il a été montré que les Tr1 pouvaient aussi inhiber des réactions immunitaires pathogéniques dans différents modèles de maladies inflammatoires, notamment intestinales, et allergiques, ou au cours de transplantations (Burchill *et al.* 2007) (revue). Cependant, dans ce type de pathologie, leur mécanisme de suppression précis reste encore mal connu.

Comparativement aux T CD4+CD25+, qui semblent représenter une population régulatrice majoritaire, la population Tr1 a été beaucoup moins bien caractérisée. Outre qu'elle ait été découverte plus récemment, la grande difficulté réside aussi dans le fait qu'il n'est toujours pas possible d'isoler *ex-vivo* des Tr1, rendant difficile à la fois leur caractérisation cellulaire et moléculaire. La plupart des études aujourd'hui, se basent essentiellement sur la production d'IL-10 par une cellule T CD4+ pour valider le phénotype de Tr1.

De nombreuses autres populations de T régulateurs ont été décrites, telles que les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup> naturelles sécrétrices d'IL-10 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-7R<sup>-</sup> et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAG3<sup>+</sup>) ou induites par une stimulation CD46, la vitamine D<sub>3</sub> ou la dexaméthasone, ... Cependant, l'étude de ces populations demeure difficile par l'absence de marqueurs spécifiques permettant de les différencier (Fujio, *et al.* 2010) (revue).

Mon travail de thèse a plus particulièrement porté sur l'étude de deux sous-populations de lymphocytes CD4<sup>+</sup> régulateurs, les Tr1 et les lymphocytes T régulateurs naturels CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

## **B - Les lymphocytes T régulateurs naturels : CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>**

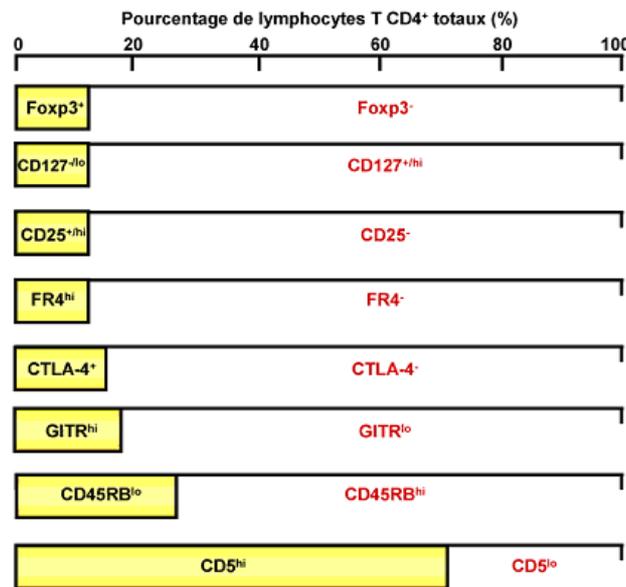
### *1. 25 ans d'efforts à la recherche du « marqueur » ...*

Au début des années 1980, Sakaguchi *et al.* ont apporté de nouveaux éléments dans la caractérisation de cette population lymphocytaire suppressive. Toujours en utilisant le modèle murin de thymectomie néonatale, ils ont montré que le transfert de splénocytes pouvait prévenir le développement d'une ovarite auto-immune chez la souris en montrant que la population cellulaire responsable de la protection pouvait être restreinte par le phénotype suivant : T CD4<sup>+</sup>CD5<sup>high</sup> (ou Lyt-1<sup>high</sup>) (Sakaguchi *et al.* 1982). **CD5** est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à un haut niveau dans les lymphocytes T matures et ligand potentiel de CD72. Peu de temps après, le même groupe a affiné ces résultats en démontrant qu'après déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup>CD5<sup>high</sup> et injection de la fraction résiduelle CD4<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>, il y a développement chez ces animaux de pathologies auto-immunes multi-organes. L'injection du compartiment T CD4<sup>+</sup>CD5<sup>high</sup> prévient le développement de ces pathologies (Sakaguchi *et al.* 1985).

En 1990, Powrie *et al.* ont proposé la sous-expression de la molécule **CD45RB** comme marqueur de cette population régulatrice. CD45RB est une protéine tyrosine phosphatase exprimée par la quasi-totalité des cellules d'origine hématopoïétique. Ils ont montré que l'injection de la sous-population T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> à des rats athymiques, induisait le développement de pathologies auto-immunes multi-organes et une perte de poids, alors que le transfert adoptif de la fraction cellulaire T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> n'était pas pathogénique. Même quantitativement minoritaire, la population T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> est

capable de contrôler la population effectrice T CD4+CD45RBhigh (Powrie and Mason 1990; Powrie and Mason 1990). En 1993, il a été montré que le transfert de lymphocytes T CD4+CD45RBhigh induisait le développement d'une pathologie inflammatoire et auto-immune au niveau des muqueuses intestinales, l'IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) et que l'injection de la fraction autologue T CD4+CD45RBlow ou bien la coinjection des fractions T CD4+CD45RBhigh et T CD4+CD45RBlow n'induisait pas l'IBD (Morrissey et al. 1993; Powrie et al. 1993).

L'inconvénient principal de ces marqueurs est qu'ils englobent encore des populations cellulaires trop importantes pour permettre vraiment de distinguer précisément la population T régulatrice des populations T effectrices (les lymphocytes T CD4+CD45RBlow représentent entre 25 et 30% des lymphocytes T CD4+ totaux chez une souris naïve) (Figure 7) (Sakaguchi 2004).



**Figure 7 : Trente ans de travaux pour établir ce phénotype non exhaustif des lymphocytes T CD4+CD25+ régulateurs naturels.** CD5 a été le marqueur initial permettant de découvrir qu'au sein des lymphocytes T CD4+ circulants, il existait une population effectrice et une population douée de propriétés suppressives capable de contrôler le compartiment T potentiellement auto-réactif. C'est en 1995 qu'un grand pas est franchi avec le marqueur CD25 qui permet d'identifier plus précisément la population régulatrice de la population effectrice, en restreignant ce compartiment entre 5 et 10% des lymphocytes T CD4+ totaux. Quelques années plus tard, un nouveau tournant est marqué par la caractérisation du facteur de transcription Foxp3 permettant précisément d'identifier les Treg. D'autres marqueurs : CD127 et FR4 semblent permettre une spécificité aussi bonne que Foxp3 pour l'identification des Treg avec l'avantage d'être des marqueurs de surface (Sakaguchi 2004).

C'est en 1995 qu'un grand pas est franchi avec la découverte du marqueur de surface **CD25** (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2), qui permet réellement de différencier, au moins fonctionnellement, la population de lymphocytes T CD4+ régulateurs des autres populations. En effet, le compartiment T CD4+CD25+/high régulateur, qui représente

entre 5 et 10% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux chez l'homme, constitue une population cellulaire prévenant le développement de pathologies auto-immunes dans des modèles de transferts adoptifs comme ceux décrits précédemment (Sakaguchi *et al.* 1995). Bien que le CD25 semble être un marqueur prometteur dans la caractérisation des cellules T régulatrices, son expression n'est cependant pas très spécifique. Il est à noter que les cellules effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> expriment, en effet, le CD25 suite à l'activation, afin de constituer un récepteur à l'IL-2 fonctionnel.

Une avancée significative a été réalisée grâce à la découverte de **FoxP3**, facteur de transcription clé dans le développement et la fonction des nTreg (Fontenot and Rudensky 2005; Sakaguchi 2004; Zheng and Rudensky 2007). FoxP3 appartient à la grande famille des facteurs de transcription possédant un domaine « *winged helix-forkhead* » (*Forkhead box* ou *Fox*) de liaison à l'ADN (*Acide DésoxyriboNucléique*). C'est en 1982 que l'étude d'un cas clinique (dix-sept garçons de la même famille morts avant 1 an avec les symptômes suivants : diarrhées, diabète de type 1, anémie hémolytique, poussées d'eczéma, réponses antivirales exagérées, manifestations auto-immunes) a permis de décrire un nouveau syndrome auto-immun lymphoprolifératif. Ce syndrome, l'IPEX (*Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy-X-linked syndrom*), est associé à une anomalie de fonctionnement du compartiment T et dépend d'une mutation récessive située sur le chromosome X (Powell *et al.* 1982). Il faudra attendre 2001 pour qu'une mutation dans le gène codant FoxP3 soit identifiée comme la cause du développement de l'IPEX (Bennett *et al.* 2001; Wildin *et al.* 2002). Une mutation de FoxP3 peut induire également un syndrome auto-immun apparenté : XLAAD (*X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrom*) (Chatila 2005) (revue). En parallèle de ces données obtenues chez l'homme, un modèle de souris *scurfy*, présentant des mutations « perte de fonction » dans le gène codant FoxP3 et développant un syndrome auto-immun lymphoprolifératif apparenté à l'IPEX, a permis de mieux comprendre l'importance de FoxP3 pour le système immunitaire. Les souris *scurfy* mâles meurent, aux environs de trois à quatre semaines de vie, suite à l'apparition de pathologies auto-immunes multi-organes avec présence de forts infiltrats lymphocytaires (Brunkow *et al.* 2001; Godfrey *et al.* 1991; Lin *et al.* 2005; Wildin *et al.* 2001). Des souris femelles ou des femmes hétérozygotes pour la mutation ne développent aucun symptôme ce qui indique que les cellules T exprimant

FoxP3 sont capables d'empêcher le développement de manifestations auto-immunes et donc de contrôler le développement des réponses immunitaires auto-spécifiques. Ces observations ont permis d'associer ces mutations de FoxP3 à une absence de Treg fonctionnels aussi bien chez les patients IPEX que chez les souris *scurfy* (Zheng and Rudensky 2007) (revue). Des travaux ont montré que, dans le modèle murin *Scurfy*, les mutations touchant FoxP3 conduisent à une absence de Treg, et qu'au contraire chez les patients IPEX, le nombre de cellules T CD4+CD25<sup>high</sup> en périphérie est identique à celui obtenu à partir de prélèvements de donneurs sains. Des tests fonctionnels *in vitro* montrent que les lymphocytes T CD4+CD25<sup>high</sup> de ces patients IPEX ont une altération importante de leur potentiel suppresseur sur des effecteurs T autologues. Ces données indiquent que chez les patients IPEX, les diverses mutations pouvant toucher FoxP3 conduisent à des anomalies biologiques hétérogènes mais pas à un défaut dans le développement des Treg (Bacchetta, et al. 2006; Le Bras and Geha 2006).

Bien que, le facteur de transcription FoxP3 soit le marqueur qui ait permis d'identifier de manière plus précise les Treg murins, il n'est cependant pas le marqueur « universel » des Treg chez l'Homme, en particulier depuis que son expression a également été retrouvée dans les cellules CD4+CD25<sup>-</sup> après l'activation (Ziegler 2007) (revue). Toutefois, le niveau d'expression de FoxP3 atteint dans ces cellules sera toujours inférieur à celui observé dans des Treg (Gavin et al. 2006; Walker et al. 2003). FoxP3 assure dans les Treg un contrôle et une régulation transcriptionnelle sur le niveau d'expression de nombreuses molécules, potentiellement marqueurs de cette population régulatrice (Sakaguchi 2005).

De nombreux autres marqueurs de surface ont alors été proposés par différents groupes afin de mieux discriminer les Treg des T conventionnels; tels que le **GITR** (McHugh et al. 2002), le **CTLA-4** (Takahashi et al. 2000), **CD27 (...)** (Godfrey et al. 2004; Ruprecht et al. 2005; Sakaguchi 2005). Comparées aux cellules CD4+CD25<sup>-</sup>, les Treg expriment un taux élevé de **CD45RO**, pas de **CD45RA** et sont fréquemment **CD62L high** (L-Selectine), indiquant plutôt une appartenance au pool de cellules activées ou mémoires (Baecher-Allan et al. 2001). Le **CD103**, ou intégrine  $\alpha\beta$ , semble jouer un rôle important dans le homing et la rétention des Treg aux tissus inflammatoires (Suffia et al. 2005). On retrouve ainsi une accumulation préférentielle de Treg CD103<sup>+</sup> au niveau des ganglions

lymphatiques drainants de souris porteuses de tumeurs (Webster *et al.* 2007). Les Treg expriment également des récepteurs de chimiokines tels que CCR4, CCR5 et CCR8. Les cellules dendritiques matures produisant CCL17 et CCL22, attirent ainsi préférentiellement les Treg au site de présentation de l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires et les zones inflammatoires périphériques (Iellem *et al.* 2001). Il a également été montré que les Treg sont attirés par le CCL4, une chimiokine produite par les cellules B activées, les DC et les macrophages (Bystry *et al.* 2001). **LAG-3** (LAG-3, *Lymphocyte Activation Gene-3*) ou CD223, une protéine membranaire exprimée uniquement à la surface des lymphocytes T et NK activés chez l'homme, a également été montrée comme étant exprimée par les Treg activés et jouerait un rôle dans leur fonction suppressive (Huang *et al.* 2004; Liang *et al.* 2008). Plus récemment, l'expression de LAG-3 sur des cellules CD4+CD25+FoxP3+ a permis de définir une population de cellules régulatrices sécrétrices d'IL-10 et de TGF- $\beta$ , qui est amplifiée au site tumoral et dans le sang de patients atteints de cancer (Camisaschi *et al.* 2010). Le groupe de Lechler, a également rapporté que la **galectine-1**, une  $\beta$ -galactoside-binding protéine, surexprimée de manière constitutive sur les Treg, était un agent important de la régulation médiée par ces cellules (Garin *et al.* 2007). Toujours en quête d'un nouveau marqueur de surface et de façon plus anecdotique Baecher-Allan *et al.* ont montré que le niveau d'expression des molécules de **CMH de classe II** sur des lymphocytes T CD4+CD25+ humains permettait de différencier les Treg des T effecteurs (Baecher-Allan *et al.* 2006).

L'inconvénient de ces molécules de surface est que leur niveau d'expression sur des lymphocytes T conventionnels après activation peut être identique au niveau constitutif observé sur des Treg. Au vu du très large potentiel que ces cellules pourraient avoir en clinique humaine, il est important de pouvoir trouver d'autres marqueurs de surface permettant de les isoler sans avoir une population effectrice contaminante trop importante.

C'est durant l'année 2006, qu'un nouveau pas important dans la discrimination des Treg a été franchi avec deux groupes qui ont parallèlement mis en évidence que les Treg CD4+CD25+Foxp3+ étaient **CD127<sup>low</sup>** alors que les lymphocytes T effecteurs activés (CD25+) ou non activés (CD25-) étaient CD127<sup>high</sup>. CD127 étant la chaîne  $\alpha$  du récepteur à

l'IL-7, un faible niveau d'expression pourrait indiquer que contrairement aux autres populations lymphocytaires T, les Treg n'ont pas de besoin spécifique en IL-7 pour se maintenir en périphérie (contrairement à l'IL-2, d'où le niveau d'expression de CD25 très élevé). Chez l'homme, la proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> est de  $6,35 \pm 0,26\%$  dans le sang de donneurs sains (Seddiki *et al.* 2006). Dans la population T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, il y a une très forte corrélation entre l'expression de Foxp3 et la faible expression de CD127. Des analyses moléculaires par CHIP (puces à ADN) suggèrent que le promoteur du gène codant CD127 est une cible du facteur de transcription Foxp3. De plus, la surexpression de Foxp3 dans une souris transgénique conduit à une population étant de manière homogène CD127<sup>low</sup> et possédant des propriétés suppressives (Liu *et al.* 2006). CD127 serait donc un très bon marqueur de surface permettant d'identifier et d'isoler en combinaison avec le CD25 des populations pures de Treg (Liu, *et al.* 2006). Cependant, Liu *et al.* suggèrent que les lymphocytes T conventionnels mémoires pourraient également sous-exprimer ce marqueur suite à l'activation. Et ces cellules présenteraient des propriétés suppressives lors de tests fonctionnels *in vitro* au contraire des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup> qui ne possèdent aucune activité suppressive (Liu, *et al.* 2006). Plus récemment, il a été montré que plus de  $34 \pm 15\%$  des cellules humaines CD127<sup>low</sup>/- n'exprimaient pas le marqueur FoxP3 et inversement,  $30 \pm 7\%$  des cellules CD127<sup>+</sup> sont FoxP3<sup>+</sup> (Klein *et al.* 2010).

En 2007, certaines études ont impliqué le **CD27** dans les mécanismes de régulation de la réponse immune notamment via son interaction avec le CD70 exprimé à la surface des cellules T activées. D'autres décrivent l'expression de ce membre de la superfamille des récepteurs au TNF comme un moyen de discriminer les Treg des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> activés (Duggleby *et al.* 2007). **CD39** et **CD27** représentent de nouveaux marqueurs de surface des Treg qui révèlent une signature biochimique spécifique caractérisée par la génération d'adénosine péri-cellulaire qui présente un rôle important dans les mécanismes d'immunorégulation cellulaire (Deaglio *et al.* 2007).

Le groupe de Sakaguchi a identifié chez la souris un nouveau marqueur de surface **FR4** (Folate Receptor 4) qui est un sous-type de récepteur à l'acide folique exprimé fortement et constitutivement sur les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Ce marqueur

permet aussi de distinguer entre Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FR4<sup>high</sup>) et T conventionnels activés (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FR4<sup>low</sup>). L'élimination *in vivo* chez la souris des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>FR4<sup>high</sup> avec des anticorps déplétants conduit au développement de pathologies auto-immunes. Les Treg humains expriment également un homologue du FR4 murin. La surexpression rétrovirale de Foxp3 dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conduit à un phénotype FR4<sup>high</sup> suggérant ainsi que Foxp3 contrôle le niveau d'expression de FR4 (Yamaguchi *et al.* 2007).

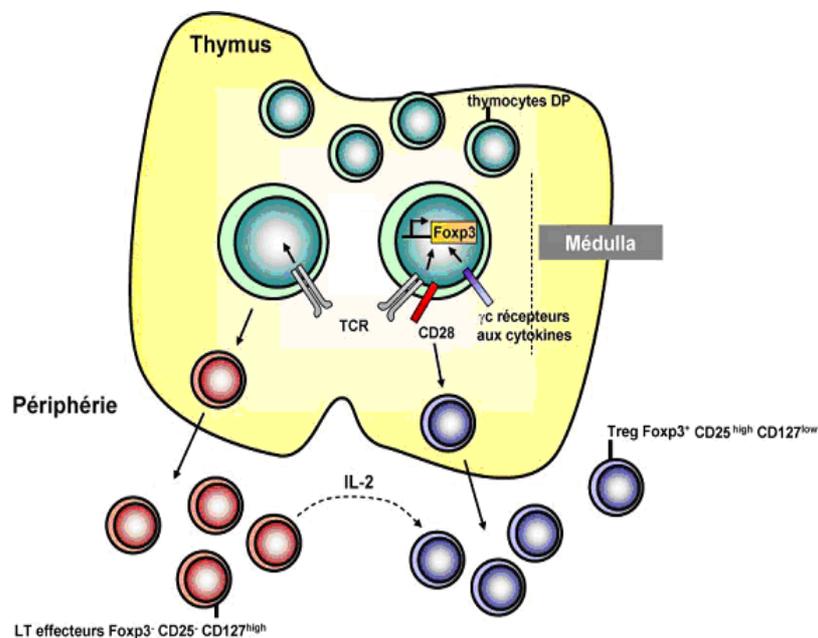
Enfin, très récemment, Kleinewietfeld *et al.* ont montré que l'absence d'expression de **CD49d** (chaîne  $\alpha$  de l'intégrine VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ )) et de CD127 permettait de définir une population de Treg FoxP3<sup>+</sup> fonctionnelle, non contaminée par des cellules effectrices, et qui expriment transitoirement le CD25 suite à l'activation (Kleinewietfeld, *et al.* 2009). Ce marqueur permettrait ainsi de s'abstenir de l'utilisation du CD25 pour l'isolement des cellules T régulatrices, en déplaçant toutes les cellules CD49d<sup>+</sup>, technique déjà commercialisée. Par ailleurs, les Treg isolés de cette manière conservent leur capacité suppressive et ont une expression stable de FoxP3, même après 30 jours d'expansion *in vitro* (Kleinewietfeld, *et al.* 2009). Une autre équipe a, quant à elle, montré que l'expression de **CD44** (molécule d'adhésion, récepteur de l'acide hyaluronique) était positivement corrélée à celle de FoxP3 dans les thymocytes ; et que les Treg CD44<sup>high</sup> ont une activité suppressive et un niveau de sécrétion de cytokines immunosuppressives plus élevés que les Treg CD44<sup>-</sup> (Liu *et al.* 2009). En 2010, il a été montré que la co-expression du **TNFR2** (*Type II Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Receptor*), du CD4 et du CD25 permettait d'identifier une population plus large de Treg FoxP3<sup>+</sup> dans le sang périphérique. Ces cellules ont toutes les caractéristiques phénotypiques des nTreg et sont immunosuppressives *in vitro* (Chen *et al.* 2010\*).

De nombreux marqueurs de la population régulatrice naturelle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ont à ce jour été décrits. Leur caractérisation actuelle est principalement basée sur l'expression concomitante des molécules CD4, CD25, CD127 et FoxP3. « Le » marqueur permettant de discriminer spécifiquement cette population des autres cellules T n'a pas encore été découvert, mais de nombreuses molécules, dont l'expression est plus ou moins spécifique des Treg, sont régulièrement décrites dans la littérature.

## 2. Développement et homéostasie du compartiment T régulateur CD4+CD25+

### a. Développement thymique des T régulateurs naturels CD4+CD25+

Les lymphocytes T CD4+CD25+ régulateurs naturels sont générés dans le thymus comme un lignage séparé et sortent différenciés de cet organe lymphoïde primaire (Fontenot and Rudensky 2005) (revue) (Figure 8). Ce processus de différenciation débute lors de l'induction de l'expression de Foxp3 dans une sous-population de thymocytes ayant un TCR $\alpha\beta$  avec une affinité accrue pour les complexes CMH / peptide du soi (Apostolou *et al.* 2002; Jordan *et al.* 2001). Les thymocytes Foxp3+ possèdent une activité suppressive comme les Treg matures (Zheng and Rudensky 2007) (revue). Cette affinité accrue pour les complexes CMH / peptide autologue permettra aux Treg matures d'exercer leur fonction physiologique : la tolérance périphérique au soi et la prévention du développement de manifestations auto-immunes. En plus de cette affinité du TCR plus importante, la signalisation au travers de la chaîne commune des récepteurs aux cytokines ( $\gamma$ c) ainsi que la costimulation via le CD28 facilitent l'induction de l'expression de Foxp3 dans les thymocytes (Kim and Rudensky 2006) (revue) (Figure 8).



**Figure 8 : Développement intra-thymique du lignage T régulateur.** La différenciation des Treg est un processus intra-thymique effectué tout au long de la vie d'un individu où de nouveaux émigrants thymiques reconstituent le pool périphérique de Treg. La spécification du lignage régulateur est réalisée après induction de Foxp3 dans les thymocytes. Cette induction de Foxp3 semble multifactorielle. D'une part la haute affinité et le caractère autospécifique du TCR va être un facteur important. De plus la costimulation via le CD28 et la signalisation au travers des récepteurs aux cytokines ont un rôle important dans l'induction de Foxp3. L'expression de Foxp3 dans les thymocytes va entraîner l'activation et la répression de plusieurs centaines de gènes, ce qui va permettre entre autre d'aboutir au phénotype CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>. L'IL-2 exocrine produite par les cellules T périphériques permet de maintenir et d'amplifier le pool de Treg périphériques. L'IL-2 n'est toutefois pas requise pour le développement intra-thymique des Treg (Fontenot and Rudensky 2005).

La stimulation du TCR via l'interaction avec le complexe CMH / peptide du soi est nécessaire pour l'expression de FoxP3 dans les Treg durant leur développement thymique (Kim and Leonard 2007; Ohkura and Sakaguchi 2010). Cette signalisation par le TCR est également impliquée dans la fonction de FoxP3 en jouant sur l'assemblage de FoxP3, les protéines interagissant avec FoxP3, le recrutement de FoxP3 sur le promoteur des gènes qu'il module, ainsi que son interaction avec les autres protéines (Ohkura and Sakaguchi 2010).

En parallèle de la signalisation via le TCR, les signaux de costimulation, et notamment le CD28, sont essentiels au développement et à l'homéostasie des Treg. En effet, le nombre de Treg est fortement réduit dans des souris CD28<sup>-/-</sup> ou lorsqu'un anticorps bloquant la liaison du CD28 à B7 est utilisé. Ceci est dû à la fois à un effet direct de la signalisation CD28 dans les Treg, mais aussi au fait qu'en absence de costimulation CD28, les cellules effectrices produisent moins d'IL-2, cytokine essentielle à la prolifération des Treg (Liston and Rudensky 2007).

Une étude utilisant des souris Foxp3-GFP (*Green Fluorescent Protein*), réalisée en insérant la séquence codant la GFP dans le locus de Foxp3, a révélé la présence de thymocytes DP Foxp3<sup>+</sup> et a de plus confirmé l'importance de ce facteur de transcription dans la spécification du lignage régulateur (Fontenot and Rudensky 2005) (revue). L'induction de FoxP3 dans les Treg est sous le contrôle de nombreuses voies de signalisation impliquant le TCR, l'IL-2, STAT, smad, TGF- $\beta$ , Notch, la voie PI3K/Akt/mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) et le facteur de transcription ets-1. Suite à l'engagement du TCR, N-FAT et smad3 vont se lier sur la région proximale du promoteur de FoxP3 pour en activer sa transcription. En parallèle, la présence du TGF- $\beta$  va induire la déméthylation du promoteur de FoxP3 et l'acétylation des histones, facilitant ainsi sa transcription (Kim and Leonard 2007; Ohkura and Sakaguchi 2010). De même, ets-1 est requis pour la déméthylation du promoteur de FoxP3. L'absence de ets-1 réduit le pourcentage de Treg spléniques, l'impliquant ainsi dans le développement des Treg (Mouly *et al.* 2010). L'inhibition des histones déacétylases (HDAC) favorise, en effet, le développement et la fonction des Treg, en partie grâce à une augmentation de l'expression et une stabilisation de FoxP3 (Tao *et al.* 2007). Ouyang *et al.* ont montré l'implication des facteurs de transcription Foxo1 et Foxo3 dans la génération des Treg. En effet, ces protéines Foxo sont capables de se lier au promoteur de FoxP3 et ainsi d'en

réguler l'activité. Des analyses transcriptomiques ont par ailleurs montré que les protéines Foxo étaient capables de réguler de nombreux marqueurs associés aux Treg, suggérant ainsi leur rôle dans la génération des Treg (Ouyang *et al.* 2010).

**b. Développement de T régulateurs en périphérie : Ti-Treg**

Le fait que le TGF- $\beta$ 1 associé à une stimulation du TCR permettait *in vitro*, chez l'homme et la souris, la conversion de lymphocytes T naïfs CD4+CD25-Foxp3<sup>-</sup> en lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup> régulateurs a été largement documenté (Rao *et al.* 2005). Cette néoconversion de T effecteurs en Treg ou Ti-Treg permet d'obtenir des cellules présentant une activité suppressive *in vitro* mais également *in vivo* après transfert adoptif dans des modèles murins (Chen *et al.* 2003; Fantini *et al.* 2007; Fantini *et al.* 2004; Luo *et al.* 2007). Ces Ti-Treg transférés *in vivo* chez la souris persistent dans l'organisme assurant ainsi une fonction régulatrice à long terme chez l'animal (Selvaraj and Geiger 2007). Le groupe de Schevach a montré que la présence d'IL-2 semble être un paramètre important pour réaliser cette néoconversion en Ti-Treg (Davidson *et al.* 2007). Par ailleurs, Itch, une E3 ubiquitine ligase, est également impliquée dans l'expression de FoxP3 induite par le TGF- $\beta$ , donc dans la génération de Treg adaptatifs ; mais en aucun cas dans le développement des nTreg (Su and Liu 2010). Par ailleurs, l'expression rétrovirale ectopique de FoxP3 permet de convertir les cellules T naïves CD4+CD25<sup>-</sup> en cellules CD4+CD25<sup>+</sup> aux propriétés immunosuppressives, montrant ainsi l'importance de ce facteur dans le développement périphérique des Treg (Su and Liu 2010).

Coombes *et al.* ont montré cette conversion *in vivo* chez la souris en identifiant une population de DC CD103<sup>+</sup> présente au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques et possédant le potentiel d'induire (après stimulation antigénique au niveau intestinal) des Treg Foxp3<sup>+</sup>. Cette induction *in vivo* de Treg par les DC CD103<sup>+</sup> est également dépendante du TGF- $\beta$  et de l'acide rétinoïque (Coombes *et al.* 2007). Plus récemment, il a été montré que cette conversion de Treg était dépendante deIDO (*Indolamine 2,3-Dioxygenase*), l'absence ou la mutation deIDO conduisant à la différenciation de cellules T effectrices Th1 et Th17 (Matteoli *et al.* 2010). Une étude a, par ailleurs, montré que les lymphocytes B activés CD40<sup>+</sup> étaient plus efficaces que les iDC dans l'induction et l'expansion des Treg CD4<sup>high</sup>CD25<sup>+</sup>. Il semblerait que cette génération de Treg soit

dépendante d'un contact cellulaire impliquant le TCR, les molécules de costimulation CD80/86 et l'IL-2. Les Treg générés par les cellules B CD40+ ont une activité suppressive plus importante que ceux générés par les iDC (Zheng *et al.* 2010).

c. Homéostasie périphérique des T régulateurs naturels CD4+CD25+

FoxP3 a également été montré comme important dans le maintien de la fonction suppressive des Treg en périphérie. L'inhibition de l'expression de FoxP3 dans les Treg, par siRNA (*small interference RNA*), provoque un défaut de l'expression des marqueurs associés à la fonction régulatrice des Treg, une diminution de la sécrétion de cytokines immunosuppressives ainsi qu'une levée de leur anergie, ce qui conduit à la diminution de leur activité suppressive sur les cellules T conventionnelles CD4+CD25- (Sun *et al.* 2010). Comme évoqué plus haut, Foxp3 va activer ou réprimer l'expression de certains gènes au cours du développement avec pour conséquence une forte expression de CD25 (CD25<sup>high</sup>) et une faible expression de CD127 (CD127<sup>low</sup>). Une analyse génomique récente par Zheng *et al.* a permis d'identifier des sites de liaison de FoxP3 sur approximativement 700 gènes (tels que l'IL-2, l'IFN- $\gamma$ , N-FAT ou NFkB). L'analyse des cellules T FoxP3+ montre que FoxP3 peut agir à la fois comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel. Ces travaux confirment le statut de Foxp3 comme responsable de l'établissement intra-thymique du lignage régulateur et des propriétés prolifératives et fonctionnelles des Treg en périphérie (Zheng and Rudensky 2007) (revue). FoxP3 joue son rôle de répresseur transcriptionnel en association avec d'autres facteurs de transcription, tels que N-FAT ou Runx1, en particulier sur le gène de l'IL-2 (Wu *et al.* 2006).

Après être sortis du thymus, les Treg sont anergiques et ne prolifèrent qu'en présence d'IL-2 exocrine sécrétée par d'autres cellules immunitaires (Figure 8). L'IL-2 est une cytokine produite rapidement après activation des cellules T au niveau des ganglions lymphatiques drainant le site de l'infection ou de l'inflammation. En induisant la prolifération des Treg dès l'initiation de la réponse immunitaire, l'IL-2 favorise la mise en place d'une réponse suppressive effective dans les plus brefs délais (avec pour but de contrôler la réponse effectrice et d'éviter l'apparition de lésions immunopathologiques). Il a récemment été montré *in vivo* que lors de l'immunisation d'une souris par un antigène

donné il y a expansion des Treg (FR4<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup>) de façon antigène spécifique (Yamaguchi, *et al.* 2007). L'expression importante de CD25 (CD25<sup>high</sup>) donne un avantage prolifératif aux Treg par rapport aux lymphocytes T effecteurs. D'ailleurs, l'IL-2 elle-même régule l'expression du CD25. L'utilisation des souris Foxp3-GFP possédant une déficience soit en IL-2, soit en CD25 (IL-2R $\alpha$ <sup>-/-</sup>) a permis de montrer que l'IL-2 n'est pas impliquée dans le développement intra-thymique des Treg mais que cette cytokine est cruciale *in vivo* pour le maintien et l'homéostasie périphérique des Treg (Burchill, *et al.* 2007; Fontenot and Rudensky 2005) (revue). L'implication exacte de l'IL-2 est difficile à évaluer du fait que, paradoxalement, l'IL-7 et l'IL-15 semblent suffisantes pour maintenir l'homéostasie des Treg en l'absence d'IL-2 (souris IL-2<sup>-/-</sup>) (Burchill, *et al.* 2007) (revue). La fixation de l'IL-2 sur son récepteur permet l'activation de différentes voies de signalisation dans les cellules T (MAPK, PI3K et STAT5), cependant dans les Treg, seule la voie STAT5 est active. En effet, les souris déficientes en STAT5 (mais pas pour les autres voies) présentent un défaut du développement et de la fonction des Treg (Burchill, *et al.* 2007). Une étude complémentaire réalisée chez l'homme a montré que l'IL-2 régule positivement et spécifiquement dans les Treg l'expression de Foxp3 et que cette régulation implique la liaison des protéines STAT3 et STAT5 sur le premier intron du gène codant pour FoxP3 (Zorn *et al.* 2006).

Une autre cytokine qui semble importante dans l'homéostasie périphérique des Treg est l'IFN- $\gamma$  dont l'action sur la réponse immunitaire semble dépendre du contexte inflammatoire. L'IFN- $\gamma$  a en effet des fonctions paradoxales, en favorisant d'une part le développement d'une réponse pro-inflammatoire de type Th1 et d'autre part en permettant aux Treg de contrôler le déroulement des réponses immunes (Wood *et al.* 2007) (revue). L'équipe de Kathryn Wood a proposé en 2005 un modèle où les Treg produisaient rapidement et seulement de manière transitoire de l'IFN- $\gamma$ , crucial pour leur fonction *in vivo*. Cette production d'IFN- $\gamma$  par les Treg peut de plus créer un micro-environnement suppressif induisant une inhibition de l'activation et de la prolifération des cellules T effectrices et ce, en influençant la fonction des CPA (Sawitzki *et al.* 2005; Wood and Sawitzki 2006).

Enfin, la cytokine clé impliquée dans le maintien en périphérie et la mise en place des fonctions effectrices des Treg est le **TGF- $\beta$** . Il existe plusieurs isoformes du TGF- $\beta$  : le TGF- $\beta$ 1, le TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3. Le TGF- $\beta$ 1 est l'isoforme ayant une activité immunologique, les autres jouant plutôt un rôle au cours de l'embryogenèse ou bien lors des processus de myogenèse. Le TGF- $\beta$  est une cytokine pléiotropique (la plupart des cellules possèdent un récepteur au TGF- $\beta$ ) très conservée au cours de l'évolution, et possédant un effet immunosuppresseur prononcé. En effet, une souris exprimant un dominant négatif du récepteur de type II au TGF- $\beta$  (dnTGF- $\beta$ RII), et donc possédant des cellules T incapables de répondre à cette cytokine, va développer des pathologies auto-immunes. Cela démontre, l'importance cruciale du TGF- $\beta$  dans l'homéostasie du compartiment T (Gorelik and Flavell 2000). En 2005, Marie *et al.* ont montré que le TGF- $\beta$ 1 était critique pour l'homéostasie et l'activité régulatrice du pool de Treg périphériques mais non requis pour le développement intrathymique de ces cellules. En effet, des souris TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> âgées de 8 à 10 jours présentent une réduction significative du nombre de Treg en périphérie mais un nombre inchangé de thymocytes FoxP3<sup>+</sup> au sein du thymus (Marie *et al.* 2005). Plus récemment, Ouyang *et al.* ont montré que le TGF- $\beta$  prévenait l'apoptose des Treg, en inhibant l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que Bim, Bax et Bak (Ouyang *et al.* 2010\*). Par ailleurs, dans le modèle murin dnTGF- $\beta$ RII, l'abrogation de la signalisation TGF- $\beta$  - dépendante induit une diminution à la fois du niveau d'expression de FoxP3 mais également de l'activité suppressive des Treg (Marie, *et al.* 2005).

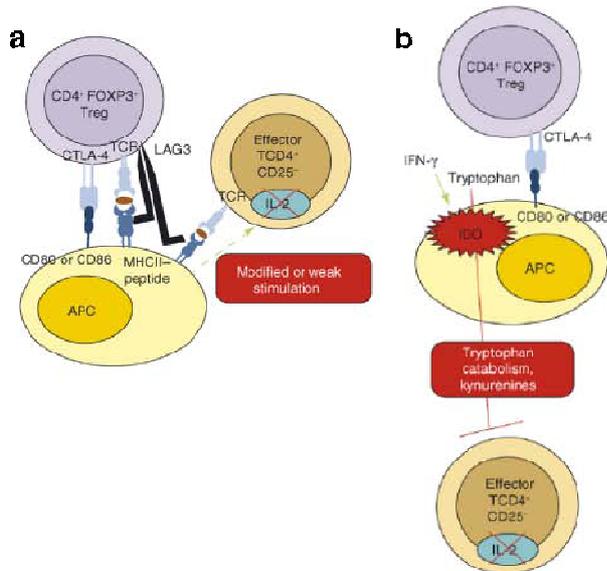
### 3. Mécanismes de suppression

Trouver « Le » mécanisme d'action des Treg a aussi été un grand challenge durant ces dix dernières années. Cependant, après avoir abordé cette question par de multiples systèmes expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, il ne semble pas qu'il y ait un mécanisme d'action principal, mais plusieurs mécanismes d'action différents mis en place suivant le contexte et la fonction cellulaire régulée (prolifération, production de cytokines...). Il est de plus imaginable qu'*in vivo* la régulation s'opère différemment suivant le type de réponse immunitaire à réguler en utilisant des combinaisons de plusieurs mécanismes. Des études *in vitro* ont montré que les Treg supprimaient efficacement l'activation, prolifération et/ou production de cytokines de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> aussi bien dans des systèmes avec des CPA que dans des systèmes sans CPA, avec des stimulations

polyclonales de type CD3/CD28 (Game *et al.* 2005; Godfrey, *et al.* 2004; Piccirillo and Shevach 2001; Thornton and Shevach 1998). *In vivo*, il a été observé par des approches de microscopie biphotonique intravitale que les Treg peuvent bloquer l'exocytose des granules lytiques des CTL (Mempel *et al.* 2006). Les Treg sont également capables d'inhiber les lymphocytes B à plusieurs niveaux. Ils peuvent inhiber leur prolifération, la production d'immunoglobulines ainsi que la commutation isotypique (Lim *et al.* 2005; Miyara and Sakaguchi 2007). L'aptitude des Treg à inhiber les cellules NK et les cellules NKT a été également bien documentée (Azuma *et al.* 2003; Ghiringhelli *et al.* 2005). Les Treg peuvent également moduler la maturation des DC, en diminuant l'expression de leur molécule de costimulation et en réduisant leur capacité de présentation antigénique (Misra *et al.* 2004) (revue). La suppression induite par les Treg peut se faire sur des cellules T naïves, effectrices ou mémoires. Cependant leur potentiel régulateur sur l'activation ou la réponse proliférative est plus efficace sur des populations lymphocytaires T naïves (Suvas *et al.* 2003). Plus récemment, Chaudhry *et al.* ont montré que les Treg sont capables d'inhiber la réponse inflammatoire médiée par les cellules Th17, via un mécanisme STAT3 dépendant (Chaudhry *et al.* 2009). La prolifération, la cytotoxicité et la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17 par les lymphocytes T $\gamma\delta$  sont également inhibées par les lymphocytes T régulateurs, par contact cellulaire dépendant du GITR (Goncalves-Sousa *et al.* 2010).

#### a. Mécanisme de suppression impliquant un contact cellulaire

La question de la nécessité du **contact cellulaire** pour la suppression des Treg a été posée. Cette notion de contact cellulaire dans la suppression a été introduite avec des expériences de suppression *in vitro*, qui sont maintenant devenues des méthodes classiques pour évaluer le potentiel suppresseur d'une population de Treg. Dans ces expériences de coculture les Treg inhibent la prolifération et la production de cytokines des T CD4<sup>+</sup> répondeuses, après stimulation via le TCR. La présence d'une membrane semipermeable séparant les deux populations cellulaires inhibe la suppression réalisée par les Treg (Thornton and Shevach 1998; von Boehmer 2005\*). Deux molécules semblent principalement impliquées dans cette suppression dépendante du contact cellulaire : CTLA-4 (ou CD152) et LAG3 (Figure 9a et 9b).



**Figure 9 : Mécanisme de suppression contact dépendant.** (a) Influence du contact cellulaire, rôle de l'interaction CTLA-4 et des molécules de co-stimulation CD80/CD86 sur la CPA ; interaction entre LAG3 et les molécules de CMH de classe II. (b) Induction d'IDO via CTLA-4 dans les DC (Miyara and Sakaguchi 2007)

Les Treg expriment de manière constitutive **CTLA-4** contrairement aux cellules T naïves qui ne l'expriment que tardivement après activation. Il a de plus été montré que l'activation des Treg induisait une augmentation du niveau d'expression de CTLA-4 (Sakaguchi 2004). En effet, l'expression forcée de FoxP3 dans des cellules T naïves augmente l'expression de CTLA-4, suggérant ainsi que l'expression de CTLA-4 est régulée positivement par ce facteur de transcription (Hori, *et al.* 2003). Le blocage de CTLA-4 chez la souris conduit au développement de pathologies autoimmunes multi-organes (Sakaguchi 2004). De plus, des études génomiques chez l'homme ont montré que l'altération quantitative de la forme transmembranaire ou soluble de CTLA-4 conduisait à une destruction auto-immune des tissus (Ueda *et al.* 2003). Le blocage de CTLA-4 lors de tests de suppression *in vitro* par des anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 inhibe l'activité suppressive des Treg (von Boehmer 2005\*) (revue). *In vivo*, Sojka *et al.* ont montré que des Treg déficients pour le CTLA-4 sont incapables de réguler l'expansion de cellules CD4+ effectrices dans un environnement lymphopénique (Sojka *et al.* 2009). Par ailleurs, l'inhibition *in vivo* de CTLA-4, à la fois chez la souris et chez l'Homme, induirait une augmentation de la prolifération des Treg (Kavanagh *et al.* 2008; Tang *et al.* 2008). CTLA-4 présent sur les Treg va pouvoir agir de plusieurs manières dans l'induction de mécanismes régulateurs. Tout d'abord il est possible que CTLA-4 présent à la surface des Treg puisse interagir avec les molécules accessoires CD80 et CD86 à la surface de la CPA, permettant ainsi de transduire un signal de costimulation (en plus de l'activation via le TCR) aux Treg, nécessaire à la mise en place de leur activité suppressive (Miyara and Sakaguchi 2007)

(revue) (Figure 9a). Ensuite des travaux ont montré que CTLA-4 exprimé à la surface des Treg pouvait interagir avec les molécules CD80 et CD86 des DC afin d'induire l'expression de IDO, enzyme responsable du catabolisme du tryptophane (Figure 9b). Le catabolisme du tryptophane va conduire à la synthèse de métabolites toxiques comme les kynurénines, ainsi la déplétion en tryptophane va pénaliser la prolifération cellulaire (Fallarino *et al.* 2003; Grohmann *et al.* 2002). Au final l'induction d'IDO au sein des DC par les Treg va créer un micro-environnement tolérogénique propice à la conversion de cellules T CD4+ naïves en Treg et pour les cellules T CD8+ à une internalisation des chaînes  $\zeta$  du TCR induisant une altération des fonctions effectrices et notamment de leur fonction cytotoxique (Fallarino *et al.* 2006).

**LAG3** également connue sous l'appellation de CD223 est une molécule d'adhérence, associée au CD4, qui se lie aux molécules du CMH de classe II présentes à la surface d'une CPA (Figure 9a). LAG3 est exprimée à la surface des Treg après activation. L'injection à des souris d'anticorps bloquants anti-LAG3 inhibe l'activité suppressive des Treg *in vivo*. De plus, des Treg isolés à partir de souris LAG3<sup>-/-</sup> présentent une activité régulatrice altérée lors de tests fonctionnels *in vitro*. Le fait que LAG3 puisse se lier aux molécules de CMH II pourrait expliquer le potentiel des Treg à inhiber différentes populations de cellules immunitaires (DC, macrophages, lymphocytes T activés chez l'homme, lymphocytes B). Cependant son rôle précis dans la biologie des Treg reste encore à préciser, car contrairement aux souris CTLA-4<sup>-/-</sup> ou TGF- $\beta$ <sup>-/-</sup>, les souris LAG3<sup>-/-</sup> ne développent aucune manifestation auto-immune (Huang, *et al.* 2004).

#### b. Mécanisme suppresseur par sécrétion cytokinique

De nombreuses études ont montré **l'implication des cytokines** dans la suppression. Contrairement aux données expérimentales, indiquant la nécessité d'un contact cellulaire pour que les Treg puissent mettre en place leur activité régulatrice, de nombreux travaux mettent en avant le rôle crucial de la sécrétion des cytokines par les Treg : et notamment l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (Figure 10). Ces cytokines aux propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires connues vont directement ou indirectement contribuer à la régulation, par la mise en place d'un environnement dit tolérogène.

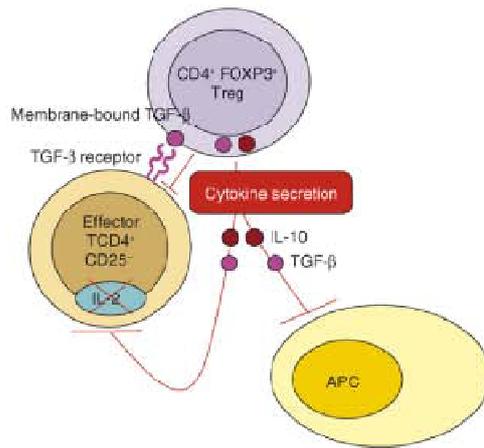


Figure 10 : Mécanismes de suppression cytokines dépendant. Les cytokines immunosuppressives : IL-10 et TGF-β sont sécrétées et permettent ainsi l'inhibition des T effecteurs et des CPA (Miyara and Sakaguchi 2007)

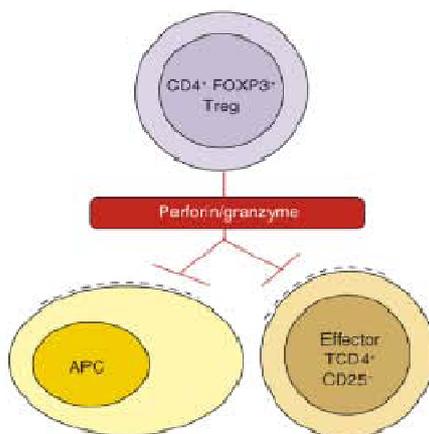
Plusieurs modèles expérimentaux *in vivo* supportent le rôle de l'**IL-10**, surtout des modèles de pathologies ayant une composante inflammatoire importante. Par exemple, le contrôle du développement de la colite par les Treg CD4+CD25+CD45Rblow requiert l'IL-10. En effet, des Treg isolés à partir de souris IL10<sup>-/-</sup> ne peuvent pas prévenir cette pathologie (Annacker *et al.* 2001). Kingsley *et al.* ont montré que l'IL-10 était impliquée dans l'inhibition par les Treg du rejet de greffes de peau, et que l'administration d'anticorps anti-IL-10 bloquants accélèrait le rejet (Kingsley *et al.* 2002). Il a également été montré que les Treg infiltrant la lamina propria intestinale ou le système nerveux central peuvent respectivement inhiber le développement de la colite et de l'EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) par une sécrétion locale d'IL-10 ou de TGF-β (Lavasani *et al.* 2010; Ogino *et al.* 2010). Plus récemment, l'inhibition par siRNA, de la production d'IL-10 empêche les Treg d'exercer leur activité suppressive sur les cellules T naïves xénogéniques mais pas allogéniques (Sun *et al.* 2010\*). De plus, après analyse des différents pools de Treg, il apparaît que les Treg infiltrant l'intestin produisent de l'IL-10 contrairement aux Treg spléniques. Ces données suggèrent que l'environnement peut influencer le profil de sécrétion des Treg et les fonctions suppressives mises en place (McGeachy *et al.* 2005; Uhlig *et al.* 2006). Un autre argument en faveur de cette théorie est que l'addition d'anticorps bloquants anti-IL-10 et/ou anti-TGF-β n'inhibe pas l'activité suppressive des Treg sur la prolifération de T effecteurs, lors de tests classiques de suppression *in vitro* (Piccirillo *et al.* 2002; Sakaguchi 2004; von Boehmer 2005\*). De même, dans un modèle murin d'hyper-réactivité aérienne (AHR, *Airway HyperReactivity*), seule l'inhibition de l'IL-10, et pas celle du TGF-β, inhibe l'effet protecteur des Treg sur l'AHR (Presser *et al.* 2008).

La cytokine tenant un rôle majeur dans la biologie des Treg est le **TGF- $\beta$** . Cette molécule intervient à la fois dans l'homéostasie de ces cellules ainsi que dans la régulation de nombreuses fonctions effectrices et ce pour différents types cellulaires. Le TGF- $\beta$  pourrait être non seulement produit par les Treg (présence intra-cellulaire d'importante quantité d'ARNm (*Acide RiboNucléique*) du TGF- $\beta$  et détection de la sécrétion de cette cytokine en ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)); ou les Treg, eux mêmes pourraient également induire la production de TGF- $\beta$  par les CPA afin d'établir un micro-environnement suppressif (von Boehmer 2005\*) (revue). Des données du groupe de Powrie montrent que l'injection de Treg isolés de souris TGF- $\beta$ 1-/- inhibe le développement de la colite et que l'ajout d'anticorps bloquants anti-TGF- $\beta$  ne prévient plus le développement de la pathologie. Ceci suggère que, dans ce modèle de colite, les Treg induisent la production de TGF- $\beta$  via d'autres cellules. Au cours de ce même travail, ils ont constaté que des cellules T CD4+CD45RBhigh effectrices exprimant un dnTGF- $\beta$ RII échappent au contrôle des Treg *in vivo* dans la prévention de la colite, démontrant ainsi que les cellules T CD4+CD45RBhigh effectrices sont la cible directe du TGF- $\beta$  (Fahlen *et al.* 2005). Soutenant ces travaux, Mempel *et al.* ont montré en 2006, par des approches morphologiques, en utilisant des CTL exprimant un dnTGF- $\beta$ RII, que les Treg pouvaient réguler la fonction cytotoxique des CTL via un mécanisme TGF- $\beta$  dépendant, en inhibant de manière réversible l'exocytose des granules lytiques. Les CTL non régulés tuent en moyenne 6,6 fois plus vite leurs cibles que les CTL régulés. Ils ont également constaté, en mesurant le niveau des ARNm, que les productions d'IFN- $\gamma$ , de granzymes A et B, de perforine et de FasL par les CTL dnTGF- $\beta$ RII n'étaient pas altérées en présence de Treg. Ce travail a permis d'attribuer un rôle précis au TGF- $\beta$  dans la régulation des CTL (Mempel, *et al.* 2006). Auparavant, une autre équipe avait explicité la capacité des Treg à inhiber de manière TGF- $\beta$  dépendante les fonctions effectrices des CTL sur la lyse de cellules tumorales *in vivo*. Cette inhibition *in vivo* de la fonction lytique n'affectait ni la prolifération ni la production d'IFN- $\gamma$  par les CTL (Chen *et al.* 2005). Il a également été montré que la production de TGF- $\beta$  par les Treg inhibait la cytotoxicité des cellules NK et diminuait le niveau d'expression du récepteur activateur NKG2D à leur surface (Ghiringhelli, *et al.* 2005). Des Treg TGF- $\beta$ -/- sont toutefois capables d'inhiber la prolifération de cellules T CD4+ conventionnelles lors de tests classiques de suppression *in vitro* (Piccirillo, *et al.* 2002). Cependant, Gil-Guerrero *et al.* ont montré que

l'administration d'un peptide synthétique inhibiteur du TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2 abroge l'activité régulatrice des Treg murins et humains *in vitro*. De même, *in vivo*, ce peptide inhibe l'activité des Treg murins, favorisant ainsi les réponses anti-tumorales et infectieuses (Gil-Guerrero *et al.* 2008). Par ailleurs, il a été montré, dans un modèle de colite expérimentale, que les Treg sont capables d'inhiber les réponses inflammatoires Th1 et Th17 via le TGF- $\beta$ . L'injection d'anticorps anti-TGF- $\beta$  permet, en effet, de restaurer la sécrétion cytokinique des cellules effectrices, et en particulier la sécrétion de cytokines Th17 (Ogino, *et al.* 2010). L'importance du TGF- $\beta$  dans la régulation médiée par les Treg a également été rapportée dans un modèle d'hépatite fulminante, où l'injection d'un anticorps bloquant anti-TGF- $\beta$  inhibe l'activité des Treg et où les cellules T exprimant un dominant négatif du TGF- $\beta$ RII sont incapables d'être régulées par ces Treg, ce qui aggrave la destruction du foie (Wei *et al.* 2008).

### c. Activité cytotoxique des T régulateurs

Des travaux ont permis de documenter la capacité des Treg Foxp3+ à lyser les cellules effectrices afin de pouvoir contrôler le développement de la réponse immunitaire (Figure 11). Cette cytotoxicité serait médiée par la sécrétion de perforine et de granzymes A et B ; et toucherait les cellules T effectrices, les monocytes et les DCs, cellules clés dans l'initiation et l'amplification de la réponse immunitaire (Gondek *et al.* 2005; Grossman *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2006).



**Figure 11 : Cytotoxicité des T régulateurs.** Les Treg sécrètent des perforine et des granzymes leur permettant de lyser les cellules T effectrices et les CPA. (Miyara and Sakaguchi 2007)

L'implication du granzyme B dans la suppression médiée par les Treg a été observée dans l'inhibition des réponses effectrices anti-tumorale T et B et dans les mécanismes de tolérance de greffe. Cette sécrétion de granzyme B semble être induite

par la stimulation antigénique des Treg via le TCR et leur costimulation par le CD28, en présence d'IL-2. En effet, la signalisation par le TCR induit la voie de signalisation  $\text{P}\delta\text{k} / \text{mTOR}$ , et l'inhibition de ces voies par le LY294002 ou la rapamycine inhibe la synthèse de granzyme B (Efimova and Kelley 2009).

L'ensemble de ces données suggère que le mécanisme suppresseur des Treg dépend du type cellulaire régulé, du contexte physiopathologique et surtout de la fonction cellulaire régulée (Figure 9, 10 et 11). De plus, il est maintenant bien démontré que l'induction de l'activité suppressive des Treg requiert une stimulation antigénique via le TCR et que donc leur activation se ferait de manière antigène spécifique. Cependant la suppression réalisée par les Treg se ferait de manière antigène non spécifique bien qu'exercée dans le micro-environnement proche de la CPA présentant l'antigène spécifique (Joffre *et al.* 2004; Yamaguchi, *et al.* 2007).

### **C - Fonctions physiologiques et physiopathologiques des T régulateurs CD4+CD25+**

Les parties précédentes ont permis de mettre en avant le rôle crucial des Treg dans l'homéostasie générale de l'organisme grâce à leur fonction physiologique principale : le maintien de la tolérance périphérique au soi. Il existe d'autres situations physiologiques ou physiopathologiques dans lesquelles les Treg vont jouer un rôle important. Ce rôle peut-être positif dans le cadre de la tolérance foëto-maternelle, de la tolérance des greffes, du contrôle des maladies auto-immunes ou lors de la modulation des réponses anti-infectieuses mais il peut être également néfaste dans le cadre de l'immunosurveillance anti-tumorale.

#### *1. T régulateurs et Tolérance foëto-maternelle*

La grossesse pourrait, sur un plan immunologique, se décrire comme une greffe semi-allogénique naturelle. Durant la phase de gestation du foëtus, le système immunitaire maternel doit tolérer la présence de non soi, correspondant aux allo-antigènes paternels (Tafari *et al.* 1995). Les agressions du système immunitaire maternel contre le foëtus sont inhibées par différents mécanismes visant à neutraliser localement les cellules immunitaires réactives. Tout d'abord, il y a établissement d'une barrière physique : la barrière transplacentaire constituant une interface sélective entre la mère et

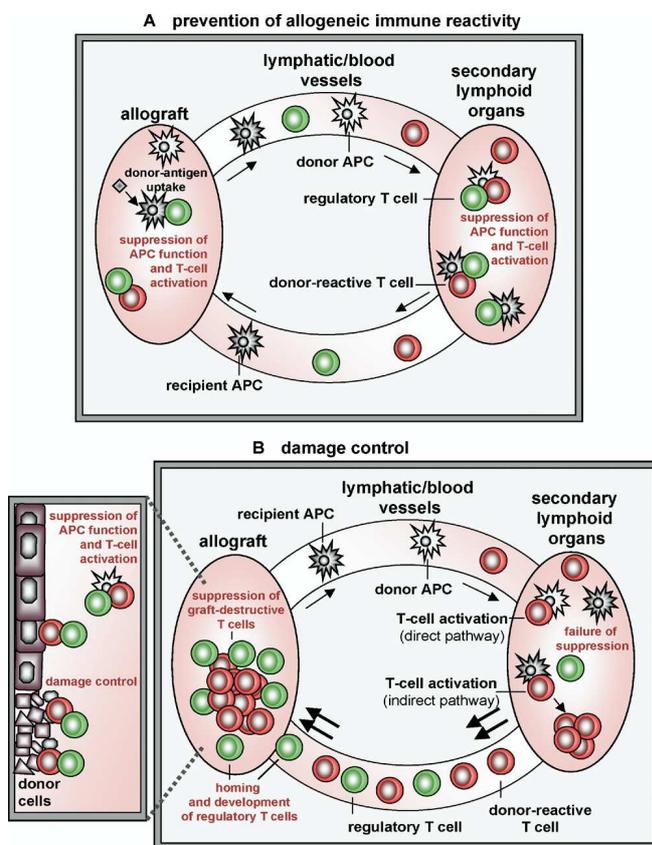
le fœtus, où est exprimé le HLA-G (molécule non classique du CMH I), qui inhibe l'activation des cellules NK. De plus, les cellules trophoblastiques expriment la molécule FasL leur permettant d'induire l'apoptose des lymphocytes T maternels allo-spécifiques (Aluvihare *et al.* 2005) (revue). Malgré leur efficacité, ces mécanismes ont toutefois une action restreinte à un niveau local. Leur seule présence n'explique donc pas la capacité à assurer de manière prolongée une tolérance systémique aux allo-antigènes paternels.

En 2004, Aluvihare *et al.* ont montré dans un modèle murin que durant la période de gestation, il y avait de manière allo-antigène indépendante une expansion systémique du pool périphérique de Treg maternels. Leur absence conduit à un avortement chez la souris, correspondant à un rejet immunologique du fœtus (Aluvihare *et al.* 2004). Chez la souris, l'administration d'un traitement à base d'E2 (17- $\beta$ -œstradiol), ou au cours de la période physiologique de gestation (période au cours de laquelle le niveau systémique des œstrogènes est élevé), il y a une augmentation du niveau d'expression de Foxp3 et expansion du pool périphérique de Treg (Polanczyk *et al.* 2004). *In vitro*, des doses physiologiques d'E2 peuvent être directement responsables de la conversion de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fonctionnelles exprimant un haut niveau de FoxP3 et d'IL-10 (Tai *et al.* 2008). Cependant, les hormones (œstrogènes, progestérone) ne sont pas les seules responsables de l'expansion des Treg au cours de la grossesse. En effet, il semblerait que les antigènes fœto-paternels, processés très tôt durant la grossesse, permettraient la génération de Treg (Schumacher *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2007), et leur relargage continu dans la circulation sanguine maternelle permet le maintien de cette population régulatrice (Zenclussen *et al.* 2010). Ainsi, une diminution du nombre de Treg ou un défaut de leur activité conduit à l'infertilité, à des pré-eclampsies et à des fausses couches. L'ensemble de ces données suggère le potentiel thérapeutique des Treg dans le traitement des maladies de la reproduction (Guerin *et al.* 2009).

## 2. T régulateurs et Tolérance en transplantation d'organe

Lorsque la fonction d'un organe est trop altérée, la transplantation est à ce jour la solution thérapeutique la mieux adaptée. Cependant la réponse déclenchée par le système immunitaire du receveur vis-à-vis du greffon est un obstacle majeur au succès de cette thérapie.

L'utilisation de modèles animaux a permis de démontrer que les Treg jouent un rôle crucial dans l'induction de la tolérance du greffon. L'identification et la caractérisation de cellules T régulatrices capables de contrôler la réaction immunitaire contre le greffon a été le sujet de nombreuses études. Sakaguchi et al. ont montré, pour la première fois, que la déplétion des Treg chez une souris greffée conduisait à une augmentation du rejet de greffe (Sakaguchi, et al. 1995). En effet, un des mécanismes impliqué dans l'induction et le maintien de la tolérance du greffon est la régulation des cellules allo-réactives par les cellules T du donneur (Figure 12).



**Figure 12: Schématisation de la migration des Treg au cours de la transplantation.** (A) Contrôle de la réponse immunitaire aux allo-antigènes : les Treg circulent continuellement entre les organes lymphoïdes secondaires, le sang et l'organe transplanté, où ils contrôlent l'activation et l'expansion des cellules T réactives contre les antigènes du donneur. (B) Lorsque la réponse immunitaire allo-réactive est hors de contrôle, une seconde ligne de régulation est initiée, permettant aux Treg de migrer vers le greffon où s'initie le développement de Treg induits afin de contrôler les lésions immuno-pathologiques (Dijke et al. 2008).

En clinique, il existe une corrélation entre l'acceptation d'une allogreffe et la fréquence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> chez les patients greffés, comme dans le cas d'allogreffes médullaires où le nombre de cellules T régulatrices du donneur est de bon pronostic par rapport au développement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD, *Graft versus host disease*) (Rezvani et al. 2006). En 2006, Demirkiran et al. ont montré que les patients présentant un rejet aigu du greffon hépatique avaient un nombre moins élevé de cellules T régulatrices que les patients ne présentant pas de rejet (Demirkiran et al. 2006). Dans la transplantation cardiaque, il a été montré que l'expression de FoxP3 au

sein de la population T CD4+ était plus faible au cours des épisodes de rejet (Vlad *et al.* 2007). De plus, les Treg isolés de patients présentant un rejet de greffe cardiaque ont un défaut de leur fonction régulatrice. Dans les greffes rénales, l'analyse de la fréquence des Treg circulants, précocement après la transplantation, a permis de montrer que cette fréquence était diminuée lors du rejet aigu par rapport aux patients transplantés ne présentant pas de rejet (Kim *et al.* 2009). Par ailleurs, cette fréquence de Treg est inférieure au niveau observé avant la transplantation, quelque soit le statut de rejet du patient. Le nombre de Treg avant la transplantation est également inférieur à celui observé chez les patients sains, suggérant que l'inflammation présente dans les stades terminaux de la pathologie a une influence négative sur la fréquence des Treg (Karczewski *et al.* 2009). La déplétion de ces cellules, isolées *ex vivo* de patients ayant reçu une greffe rénale, restaure la réponse proliférative contre les antigènes du donneur (Baan *et al.* 2007).

Dans un modèle murin de transplantation de cornée, il a été montré que l'activité des Treg, plus que leur nombre, permet de déterminer la tolérance de l'organe greffé. En effet, le niveau d'expression de FoxP3 dans les Treg était directement associé à leur potentiel régulateur. Dans cette même étude, il a été clairement démontré que lors d'une greffe, les Treg suppriment d'abord l'immunité contre les allo-antigènes au sein des ganglions lymphatiques secondaires pour ensuite inhiber les cellules T allo-réactives directement au sein de l'organe greffé, afin de réduire les lésions immuno-pathologiques (Figure 12) (Chauhan *et al.* 2009).

L'ensemble de ces études indiquent que la fréquence et la fonction des Treg permettrait de discriminer les patients cliniquement stables des patients présentant un rejet du greffon (aiguë ou chronique). Le monitoring de ces cellules devrait permettre d'identifier les patients dont la réponse allo-réactive est inhibée (Dijke, *et al.* 2008) (revue).

### 3. T régulateurs et Pathologies auto-immunes et immuno-inflammatoires

La rupture de la tolérance immunitaire au soi est commune au développement des maladies auto-immunes spécifiques d'organes et systémiques. Cette tolérance immunitaire dépend de mécanismes centraux et périphériques : la délétion clonale

thymique (mécanisme central), l'anergie des lymphocytes autoréactifs,... La tolérance dominante est un mécanisme périphérique actif de contrôle des lymphocytes T et B autoréactifs ayant échappé à la sélection thymique. Rappelons que la découverte du facteur de transcription FoxP3 comme marqueur clé des Treg a renforcé l'implication de ces cellules dans le contrôle des maladies auto-immunes. En effet, une mutation de ce marqueur conduit au développement du syndrome IPEX qui est associé à de multiples manifestations auto-immunes spécifiques d'organes.

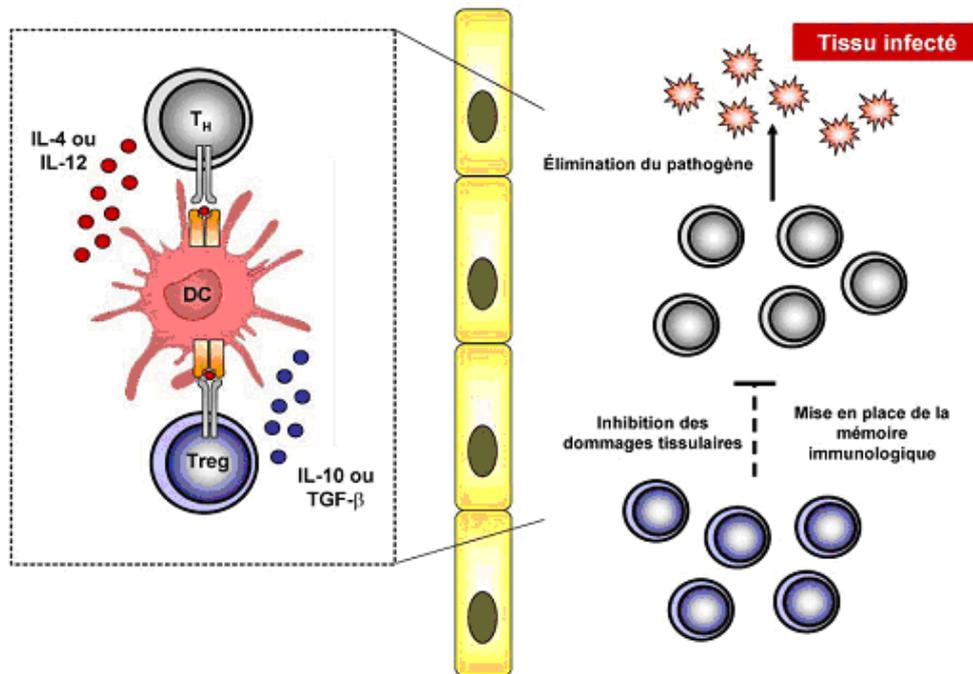
Chez l'Homme, il est généralement observé une diminution de la fréquence des Treg et/ou de l'activité suppressive des Treg dans le Lupus Erythémateux Systémique (SLE), l'arthrite rhumatoïde (RA) ou le syndrome primaire de Goujerot-Sjögren (pSGS) (Bernard *et al.* 2010) (revue). Il a été montré que le nombre de Treg CCR7+ était fortement diminué au sein des glandes salivaires des patients atteint par le pSGS (Ishimaru *et al.* 2010). Dans le SLE, la fréquence et les capacités migratoires de Treg CCR4+ sont fortement altérées, ce qui suggère leur implication dans la pathogenèse de la maladie (Lee *et al.* 2008). Par ailleurs, le syndrome Omenn (mutation des gènes RAG générant des cellules T auto-réactives) est caractérisé par une diminution des cellules T FoxP3+ dans le thymus et les ganglions lymphatiques et une incapacité de ces cellules à supprimer la prolifération des cellules T CD4+ autologues ou allo-géniques (Cassani *et al.* 2010).

Au contraire, certaines études suggèrent une augmentation ou un taux inchangé de la fréquence des Treg chez les patients atteints de maladies auto-immunes. Dans ce sens, il a été montré que les Treg auraient une activité régulatrice altérée chez des patients atteints de sclérose, du syndrome autoimmun polyglandulaire de type 2, de SLE, de diabète de type 1, de psoriasis, de RA, ... Ce défaut fonctionnel des Treg se traduit par une diminution de l'expression des molécules FoxP3 et CTLA-4, une diminution de la survie, une incapacité à inhiber la prolifération et la sécrétion cytokinique de cellules T effectrices. Cette inhibition de l'activité des Treg pourrait être expliquée par la présence de CPA au sein de l'organe lésé, qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 ou le TNF, capables d'inhiber les Treg (Andre *et al.* 2009).

Ces études indiquent donc que les Treg sont essentiels dans le contrôle des pathologies auto-immunes, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de thérapeutiques.

#### 4. T régulateurs et Pathologies infectieuses

Il est possible que lors de la réponse immunitaire adaptative contre les antigènes du pathogène il y ait génération d'une réaction immunitaire dite croisée ou « *cross-réactive* » contre des antigènes du soi aboutissant alors au développement de pathologies auto-immunes. C'est pour palier à cela que le système immunitaire aurait développé des mécanismes suppresseurs afin de préserver l'homéostasie de l'organisme (Figure 13). Il a tout d'abord été décrit des mécanismes de régulation consistant en la production de cytokines anti-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée. Plus récemment, l'implication de l'immunité adaptative a été largement documentée dans différents modèles infectieux avec le rôle capital que jouent les Treg FoxP3+ (Mills 2004) (revue).



**Figure 13: Balance entre les lymphocytes Th et Treg: Immunité anti-infectieuse protectrice versus prévention d'immunopathologie.** Lors de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative contre un agent pathogène, des Treg sont recrutés au niveau du tissu infecté grâce à la chimiokine CCL5 et ils modulent la réponse pro-inflammatoire des lymphocytes T effecteurs (réponses de type Th1 ou Th2 suivant le type de pathogène) via des mécanismes dépendants et indépendants de l'IL-10. Cette modulation est pour l'organisme doublement avantageuse, car elle va permettre d'éviter l'apparition de dommages tissulaires collatéraux et de plus, la persistance périphérique des antigènes du pathogène va favoriser le développement de la mémoire immunitaire. (Mills 2004)

La plupart des infections où les Treg ont un rôle protecteur important sont des cas d'infections chroniques (Belkaid and Rouse 2005). L'isolement de Treg à partir de patients atteints d'une infection chronique par *Helicobacter pylori*, montre que ces cellules

régulatrices sont capables d'inhiber des réponses cellulaires T spécifiques des antigènes bactériens mais pas des réponses cellulaires T spécifiques d'autres antigènes (Lundgren *et al.* 2003). Un exemple bien documenté à ce jour est le cas de l'infection gastro-intestinale bactérienne par *Helicobacter hepaticus* qui va causer une inflammation intestinale. Le transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux dans une souris infectée par *Helicobacter hepaticus* va permettre d'induire une réponse immunitaire moins importante contre le pathogène évitant le développement de la colite, en comparaison au transfert de T CD4<sup>+</sup> isolées de souris IL10<sup>-/-</sup>. Les auteurs de ce travail ont donc montré l'importance de la génération d'un pool de Treg antigène spécifique qui va moduler la réponse immunitaire anti-bactérienne via un mécanisme dépendant de l'IL-10 (Kullberg *et al.* 2002). En 2002, Belkaid *et al.* ont montré, dans un modèle d'infection parasitaire par *Leishmania major*, qu'au cours du processus infectieux, les Treg s'accumulent au niveau du derme des souris infectées et inhibent, via des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de l'IL-10, les réponses effectrices des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> conventionnels visant à éliminer le parasite (Belkaid *et al.* 2002). Il a été montré que c'était la chimiokine CCL5, ligand du CCR5 exprimé par les Treg, qui était responsable du recrutement des Treg au niveau du derme infectieux (Yurchenko *et al.* 2006), et que la majorité des Treg recrutés au niveau du derme de souris infectées par *L. major* étaient spécifiques des antigènes du parasite (Suffia *et al.* 2006). D'autres modèles infectieux où l'on observe l'action suppressive des Treg dans le contrôle de la réponse inflammatoire ont depuis été décrits, c'est le cas des infections par *Pneumocystis carinii*, par *Candida albicans*, par *Plasmodium vivax* (Bueno *et al.* 2010), par le virus de l'hépatite C (voir Introduction - Chapitre Lymphocytes T Régulateurs et Hépatocarcinome - C), le virus de l'hépatite B, le virus de l'herpès simplex (Belkaid and Rouse 2005), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Bernardes *et al.* 2010), ...

Une autre conséquence de la modulation des réponses anti-infectieuses par les Treg va être d'augmenter la survie de l'agent infectieux dans l'organisme et dans certains cas, cela va même favoriser une persistance à long terme de l'agent pathogène. Cette persistance à long terme va créer un nouvel état d'homéostasie pour l'organisme, ce qui est illustré par le modèle murin d'infection par *Leishmania major*. En effet, la persistance de *L. major* au niveau de la peau de souris C57BL/6, après résolution de la phase aiguë de

l'infection, est due à l'action endogène des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Belkaid, *et al.* 2002). Plus récemment, Ozeki *et al.* ont montré chez la souris, que la déplétion des cellules T régulatrices conduisait à une diminution de la charge bactérienne et des atteintes tissulaires, mais uniquement lors des phases précoces de l'infection par différentes souches de mycobactéries, ce qui suggère que les Treg ont peu d'impact dans l'évolution générale de l'infection par les mycobactéries (Ozeki *et al.* 2010).

L'activité suppressive des Treg ne se fait pas que pour assurer la survie du pathogène, cela permet également au système immunitaire (du fait de la persistance des antigènes parasitaires en périphérie) de mettre en place une mémoire immunitaire efficace en cas de réinfection par le même pathogène. En effet, des souris IL-10<sup>-/-</sup> infectées par *L. major* développent une réponse immunitaire permettant l'élimination de la totalité de la charge parasitaire mais ne permettant pas la mise en place d'une mémoire immunitaire capable de protéger l'animal en cas de réinfection (Belkaid, *et al.* 2002).

Les Treg sont donc capables de réguler l'amplitude des réponses immunitaires effectrices, évitant ainsi l'apparition de lésions tissulaires immunopathologiques au dépend toutefois d'un contrôle total de l'infection. La question qui reste encore ouverte est de savoir si au cours de l'évolution, les agents infectieux ont développé des moyens leur permettant de manipuler les populations de Treg endogènes favorisant ainsi leur survie dans l'organisme (Belkaid and Rouse 2005) (Chapitre Lymphocytes T régulateurs et Hépatocarcinome - C). Le fait que l'augmentation de la fréquence des Treg est associée à l'augmentation de la charge parasitaire du *Plasmodium vivax* est en faveur de cette hypothèse (Bueno, *et al.* 2010). Kao *et al.* ont également montré que l'infection par *Helicobacter pylori* altère la polarisation des DC et conduit ainsi au développement d'une réponse T régulatrice inhibitrice de la réponse Th17 spécifique (Kao *et al.* 2010). Cet effet indirect des agents infectieux sur les Treg avait déjà été documenté en 2008 par Hisaeda *et al.* En effet, l'infection de souris par *Plasmodium yoelii* conduit à une activation des Treg qui nécessite l'interaction préalable du TLR9 (*Toll Like Receptor*) des DC avec le parasite. Des souris TLR9<sup>-/-</sup> infectée par *P. yoelii* ont une diminution de l'activation des Treg associée au développement d'une réponse T effectrice (Hisaeda *et al.* 2008).

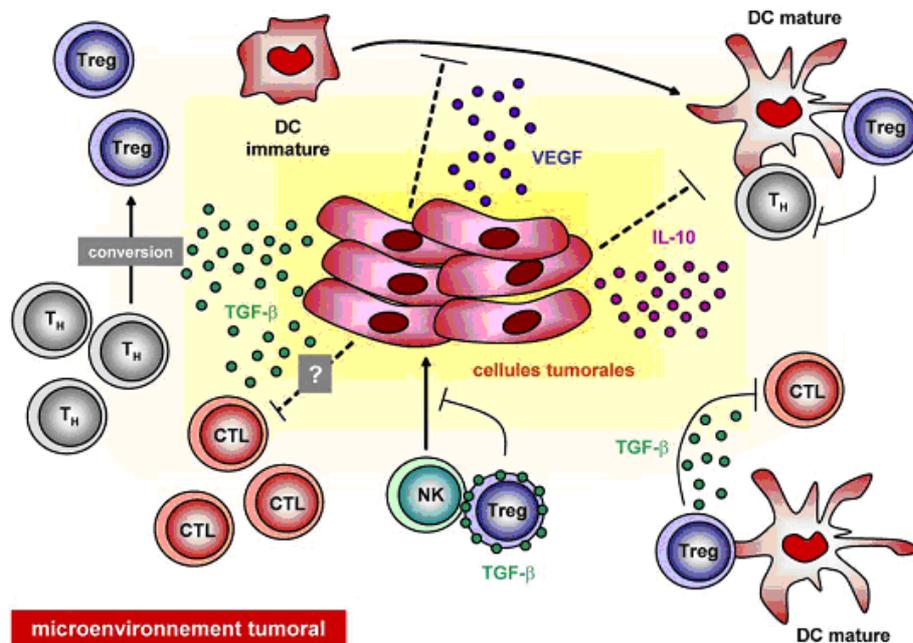
## 5. T régulateurs et Cancer

Du fait de l'origine endogène des tumeurs, générer une immunité anti-tumorale efficace est un processus délicat qui pourrait conduire à la mise en place d'une réponse auto-immune. Heureusement, les antigènes tumoraux sont des antigènes du soi modifié, embryonnaires ou viraux qui possèdent des caractéristiques propres (par exemple, des antigènes d'EBV (*Epstein Barr Virus*) dans certains lymphomes, des formes mutées de p53 dans certains carcinomes épithéliaux, des antigènes embryonnaires, etc).

Malgré les efforts du système immunitaire pour mettre en place une réponse immunitaire anti-tumorale, la régression spontanée d'une tumeur établie est un évènement très rare. En effet, les tumeurs ont développé de nombreux mécanismes d'évasion au système immunitaire notamment en générant un micro-environnement supprimeur grâce à la production de cytokines aux propriétés immunosuppressives : l'IL-10 (Curiel 2007) (revue) et le TGF- $\beta$  (Li *et al.* 2006; Liu *et al.* 2007) (Figure 14). Les tumeurs sont également capables de sécréter des facteurs de croissance endothéliaux comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui permet d'induire des processus de néoangiogenèse favorisant ainsi la croissance tumorale. D'autre part, le VEGF sécrété localement par les cellules tumorales inhibe la maturation des DC affectant ainsi l'activation locale des lymphocytes T (Gabrilovich *et al.* 1996) et plus récemment, il a été montré que ce facteur de croissance est impliqué dans l'induction et / ou le maintien en périphérie des Treg (Wada *et al.* 2009). Des travaux récents semblent montrer que l'obstacle majeur à l'immunosurveillance anti-tumorale est en partie dû à l'immunosuppression réalisée par les Treg (Zou 2006) (revue) (Figure 14).

Le rôle des Treg dans l'immunité anti-tumorale a été pour la première fois mis en évidence dans une expérience où l'inoculation d'une tumeur à des souris en présence d'anticorps anti-CD25 conduit à l'éradication de la tumeur (Onizuka *et al.* 1999; Shimizu *et al.* 1999). Par la suite, des travaux ont montré que la déplétion intra-tumorale des Treg, ou l'inhibition de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , induisent la régression d'une tumeur déjà établie, accompagnée de la mise en place d'une mémoire immunitaire et du changement de l'environnement cytokinique de la tumeur (Yu *et al.* 2005). De nombreux travaux ont à ce

jour démontré *in vivo*, dans des modèles murins, le rôle délétère des Treg dans l'immunité anti-tumorale (Yamaguchi, *et al.* 2007; Zou 2006).



**Figure 14 : Les Treg - obstacle majeur à l'immunosurveillance anti-tumorale.** Les lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3+ régulateurs (Treg) constituent un rempart majeur à la mise en place des réponses immunitaires anti-tumorales, qui pourraient permettre l'élimination des tumeurs notamment grâce à l'action cytotoxique des cellules NK et des CTL. Au niveau du micro-environnement tumoral, la source de TGF-β va être double. Il est produit par les Treg avec comme conséquence : l'induction d'un effet suppresseur sur les fonctions cytolytiques des NK et des CTL. Il peut-être également produit directement par la tumeur elle-même, aboutissant ainsi à la conversion de lymphocytes T CD4+CD25-Foxp3- en Treg. Parallèlement, la production de VEGF par les cellules tumorales va bloquer le processus de maturation des DC.

Les Treg infiltrent massivement les tumeurs solides et leur nombre est considérablement augmenté au niveau des ganglions lymphatiques drainant ces sites tumoraux. Différents mécanismes de recrutement des Treg au site tumoral ont été mis en avant. Une des possibilités est que la prolifération et la mort des cellules tumorales fournissent de grandes quantités d'auto-antigènes possiblement reconnus par les Treg. Par ailleurs, l'environnement inflammatoire au site tumoral est aussi une des conditions du recrutement des Treg (Nishikawa and Sakaguchi 2010) (revue). Il a été proposé que les cellules tumorales et les macrophages infiltrant la tumeur sécrètent la chemokine CCL22 permettant ainsi le recrutement de Treg CCR4+, dans les tumeurs ovariennes (Curiel *et al.* 2004) et le lymphome de Hodgkin (Ishida *et al.* 2006). L'expansion périphérique du pool de Treg se ferait indépendamment du thymus au niveau des organes lymphoïdes secondaires et ne requiererait pas de prolifération cellulaire. Il s'agirait majoritairement d'une conversion de lymphocytes T CD4+CD25-Foxp3- en Treg CD4+CD25+Foxp3+, induits

de manière active par la tumeur (Valzasina *et al.* 2006). Toujours chez la souris, en 2007 Liu *et al.* ont montré que c'était le TGF- $\beta$  produit par les cellules tumorales qui induisait cette conversion. Ils ont de plus montré que le traitement des souris avec un anticorps bloquant anti-TGF- $\beta$  permettait d'inhiber ce processus de conversion et d'induire une immunité anti-tumorale efficace (Liu, *et al.* 2007).

En plus de la fonction jouée par le TGF- $\beta$  dans l'induction des Treg, le groupe de Zitvogel *et al.* a montré que lors d'une réponse immunitaire anti-tumorale, le TGF- $\beta$  produit par les Treg et fixé à leur surface permettait d'inhiber les fonctions effectrices et cytotoxiques des cellules NK sur les cellules tumorales (Ghiringhelli, *et al.* 2005). Parallèlement, le groupe de Von Boehmer a montré que les Treg inhibent *in vivo* l'activité cytotoxique des CTL via la production de TGF- $\beta$  (Figure 14). En effet, les CTL exprimant un dnTGF- $\beta$ RII, et donc insensibles à la signalisation induite par le TGF- $\beta$ , résistent à la suppression réalisée par les Treg. Le rétablissement de la cytotoxicité est associé dans ce modèle à un rejet de la tumeur (Chen, *et al.* 2005). Les Treg sont donc apparemment capables d'inhiber spécifiquement un grand nombre de réponses immunitaires anti-tumorales, telles que les réponses des cellules T CD4+, T CD8+, NK, et NKT.

En plus des travaux réalisés avec des modèles tumoraux murins, l'impact des Treg sur l'immunité anti-tumorale chez des patients atteints de cancer est maintenant bien documenté (Curiel 2007; Zou 2006) (revues). En 2001, Woo *et al.* ont observé pour la première fois que des patients atteints de cancers du poumon et de cancers ovariens présentaient un nombre supérieur de Treg par rapport à celui observé chez des patients sains (Woo *et al.* 2001). Depuis, de nombreux types de cancers présentant une fréquence en Treg dans le sang périphérique plus élevée que celle observée chez un donneur sain ont été référencés : cancer de la tête et du cou (Schaefer *et al.* 2005), cancer du sein et du pancréas (Liyanaage *et al.* 2002), cancer ovarien (Curiel, *et al.* 2004), cancer colorectal (Somasundaram *et al.* 2002), cancer gastrique (Sasada *et al.* 2003), mélanomes, hépatocarcinome (Ormandy *et al.* 2005) (voir Introduction - Chapitre Lymphocytes T Régulateurs et Hépatocarcinome - C), .... Cette liste continue de s'agrandir au fil des différentes investigations cliniques qui semblent toutes indiquer que les Treg sont un obstacle majeur à une réponse immunitaire anti-tumorale efficace (Zou 2006) (revue). De

plus, l'augmentation du nombre de Treg et plus particulièrement la diminution du ratio CD8+/Treg au sein de la tumeur sont corrélés à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du sein ou de cancer des ovaires (Bates *et al.* 2006). La localisation des Treg (péri-tumorale vs ganglions lymphatiques péri-tumoraux) semble être plus importante que leur nombre dans l'influence du pronostic vital. En effet, l'infiltration intra-tumorale des Treg peut être bénéfique pour certains types de tumeurs (Wilke *et al.* 2010) (revue). C'est le cas pour les cancers gastriques, colorectaux et anaux, cancers connus pour être associés à une inflammation chronique. Il est probable que les Treg puissent préférentiellement inhiber l'inflammation, et ainsi prévenir l'angiogenèse, plutôt que d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale (Mantovani *et al.* 2008) (revue). Parallèlement, comme les Treg constituent 25% des cellules T CD4+ au sein de la moelle épinière, ceci expliquerait que la moelle épinière soit le site métastatique préférentiel de nombreux cancers (sein, poumon, prostate) (Wilke, *et al.* 2010) (revue).

Il est donc maintenant bien établi que les Treg sont préférentiellement recrutés sur les sites tumoraux et notamment dans les carcinomes hépatocellulaires dont on sait qu'ils sont très souvent consécutifs à des infections par le VHB ou le VHC. D'ailleurs, on estime actuellement que le Virus de l'Hépatite C (VHC) est responsable de 25% des cancers du foie (Alter 2007; Perz *et al.* 2006). Ainsi, dans la mesure où, individuellement, à la fois les virus et les cancers peuvent favoriser le recrutement des lymphocytes T régulateurs, on peut imaginer que l'implication des Treg dans le développement tumoral doit être encore plus importante dans les cas particuliers de cancers viro-induits. En ce sens, nous avons d'ailleurs montré au sein du laboratoire que le recrutement intra-hépatique des Treg était corrélé à la progression du carcinome hépatocellulaire associé à une infection virale C (Article 1 p111 et Article 2 p113) (Miroux *et al.* 2010).

## **LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET HEPATOCARCINOME : INFECTION PAR LE VHC**

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur maligne primitive du foie la plus fréquente. Elle est la 5<sup>ème</sup> tumeur par ordre de fréquence chez l'homme et la 8<sup>ème</sup> chez la femme, avec une incidence de 564 000 nouveaux cas par an dans le monde (Decaens *et al.* 2009) (revue), elle est aussi la troisième cause de mortalité liée au cancer. La carcinogenèse hépatique est un processus multi-étapes qui fait intervenir des facteurs étiologiques variables d'une région à l'autre. Dans les pays occidentaux, la cirrhose est le facteur de risque majeur, en effet, le CHC survient le plus souvent (85%) sur un foie cirrhotique quelle qu'en soit l'étiologie. De nombreuses études suggèrent que la nature et la cause de l'hépatopathie chronique influencent l'incidence de survenue du CHC (Trinchet *et al.* 2009) (revue). En cas d'infection chronique par le VHC ou de consommation excessive d'alcool, le CHC survient quasi exclusivement au stade de la cirrhose. Par contre, 20 à 40 % des cas de CHC associés au portage chronique du Virus de l'Hépatite B (VHB) surviennent sur foie non cirrhotique. En France, les facteurs étiologiques de développement d'un CHC sont l'alcool (65%) et les virus des hépatites, notamment VHB et VHC, (20-25% dont 70% pour le VHC), plus rarement les maladies métaboliques et les maladies génétiques telles que l'hémochromatose. Dans le monde, l'infection par le VHB ou le VHC est le facteur de risque le plus important de développement d'un CHC, puisqu'il représente 70% des cas de CHC (Castello *et al.* 2010) (revue). En cas de cirrhose, l'incidence de survenue du CHC paraît plus élevée pour le VHC que pour le VHB, l'alcool ayant une situation intermédiaire (Castello, *et al.* 2010; Fattovich *et al.* 2004), traduisant probablement des mécanismes de carcinogenèse différents (Zucman-Rossi and Laurent-Puig 2007), même si la fonction hépatique apparaît souvent plus altérée en cas de cirrhose alcoolique qu'en cas de cirrhose virale. Cependant, certains facteurs aggravants restent communs à toutes les étiologies (âge élevé, sexe masculin, hépatopathie évoluée, diabète et obésité), alors que d'autres sont spécifiques (charge virale, génotype, mutations, ...) (Fattovich, *et al.* 2004).

Dans les pays occidentaux, l'incidence du CHC a fortement augmentée entre 1980 et 2000, conséquence du pic de contamination par le VHC survenue entre les années 1960 et 1980 (Oikawa *et al.* 2005; Sasaki *et al.* 2006). La mortalité liée au CHC est plus élevée

dans les pays de forte endémie pour le VHB (Asie du Sud-Est et Afrique équatoriale). Au Japon et aux USA, elle a fortement augmentée entre 1975 et 2005, puis semble se stabiliser voire diminuer (Sasaki, *et al.* 2006; Umemura *et al.* 2009). Le nombre de nouveaux cas en France se situe actuellement entre 5000 et 5500 et pourrait atteindre un pic aux alentours de 6500 et 7000 à l'horizon 2020, en l'absence de prise en charge diagnostique et thérapeutique plus efficace des hépatopathies chroniques prédisposant au CHC. Une modélisation de la mortalité attribuable au VHC conclut à une augmentation de la mortalité liée au CHC au moins jusqu'en 2010 voire 2020 (en l'absence de traitement efficace) (Deuffic-Burban *et al.* 2008).

### A - L'Hépatite C

L'hépatite C constitue un problème majeur de santé publique. En effet, l'infection par le VHC constitue actuellement dans les pays occidentaux la principale cause de maladie chronique du foie, de cirrhose, de cancer du foie et de transplantation hépatique. On estime actuellement que l'infection par le VHC est responsable au niveau planétaire, de 27% des cirrhoses et de 25% des cancers du foie (Alter 2007; Perz, *et al.* 2006).

#### 1. Le Virus de l'hépatite C

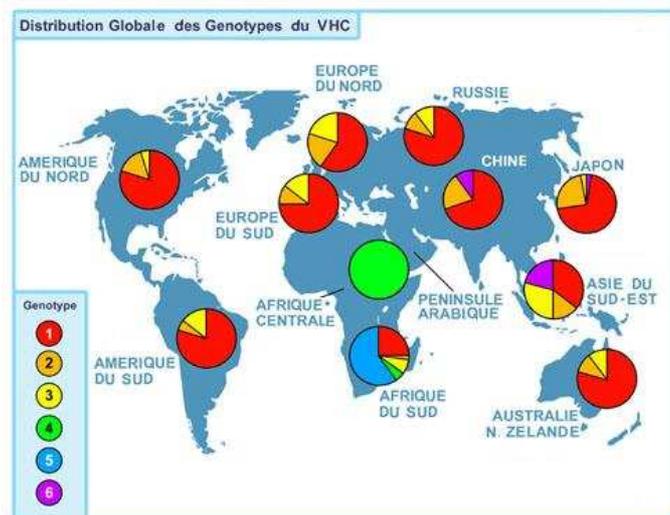
Le Virus de l'Hépatite C, initialement décrit comme l'agent responsable de la majorité des hépatites post-transfusionnelles dites « non-A, non-B » (Feinstone *et al.* 1975), représente le premier virus de l'histoire de la virologie moderne à avoir été identifié par les techniques de biologie moléculaire (Choo *et al.* 1989). Il est le seul virus du genre Hépacivirus au sein de la famille des Flaviviridae (Chang *et al.* 2003).

##### a. Variabilité génétique et quasi-espèces

Les différents isolats du VHC se caractérisent par une très forte diversité génétique. Il a ainsi été décrit 6 génotypes majeurs (1 à 6) selon la classification de Simmonds (Simmonds *et al.* 1993; Simmonds *et al.* 2005), liste à laquelle se rajoute le génotype 7, originaire d'Afrique centrale et découvert récemment (Murphy *et al.* 2007). Les variations génomiques intergénotypes sont de 30 à 33% (Bukh *et al.* 1995). De plus, dans chaque génome sont décrits différents sous-types, notés a, b, et c, présentant des différences nucléotidiques de 20 à 25%. Enfin, le terme de quasi-espèces désigne les différents

génomés viraux circulant à l'instant t dans le sang d'un même patient (Martell *et al.* 1992) et présentant moins de quelques pourcents de différence de séquence (Bukh, *et al.* 1995). Cette hétérogénéité virale, sous forme de quasi-espèces, prédomine dans les régions 5' non codante, E2, Core (protéine de capsid) et NS5A. Cette variabilité génétique n'est pas anodine, elle s'associe à une compartimentalisation des différentes quasi-espèces. Elle a un impact direct sur la persistance virale et de nombreux aspects de la pathogénie de la maladie (Sheridan *et al.* 2004), tels que la résistance au traitement anti-viral, la récurrence sur le greffon (Ramirez *et al.* 2009) ou la carcinogénèse hépatique (Pavio *et al.* 2005).

La répartition géographique des différents génotypes du virus est variable (Figure 15). En Occident et au Japon, on retrouve ainsi principalement le VHC de génotype 1, puis les génotypes 2 et 3, ce dernier étant plus fréquent en Europe qu'en Amérique. Les génotypes 4, 5 et 6 sont plutôt présents dans des lieux de forte prévalence ou d'endémisme, telle que l'Égypte pour le génotype 4 (Kamel *et al.* 1992) ou l'Asie du sud-est pour le génotype 6. En France, le génotype 1 représente 70 % des cas d'infection par le VHC (2/3 de 1b et 1/3 de 1a), le sous type 3a 20 % et enfin les sous-types 2a, 2c, 4 et 5 environ 10 % (Figure 15).

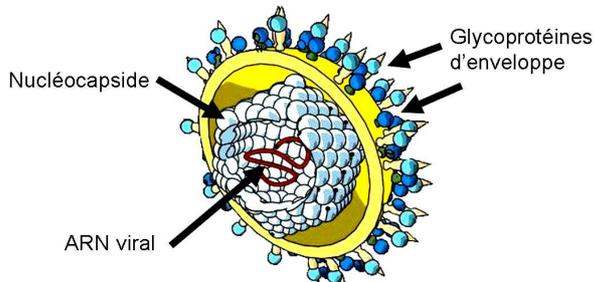


**Figure 15 : Distribution mondiale des génotypes du VHC.** On retrouve une prédominance mondiale du génotype 1 du VHC, hormis pour l'Afrique où les génotypes 4 et 5 sont majoritaires. Source : World Health Organization

### b. Structure du VHC

Le génome du virus de l'hépatite C a été caractérisé en 1989 comme étant une molécule d'ARN simple brin de polarité positive (Choo, *et al.* 1989). L'ARN viral est composé d'environ 9600 nucléotides (nt), constitué d'un unique cadre de lecture ouvert

(partie codante) d'environ 9000 nt encadré par deux régions 5' et 3' non codantes. Il code pour une unique polyprotéine de 3010 acides aminés (aa), ultérieurement clivée par des protéases cellulaires et virales pour former les 10 protéines virales, structurales (C, E1, E2 et p7) et non structurales (NS2, NS3, NS4A et B, NS5A et B).

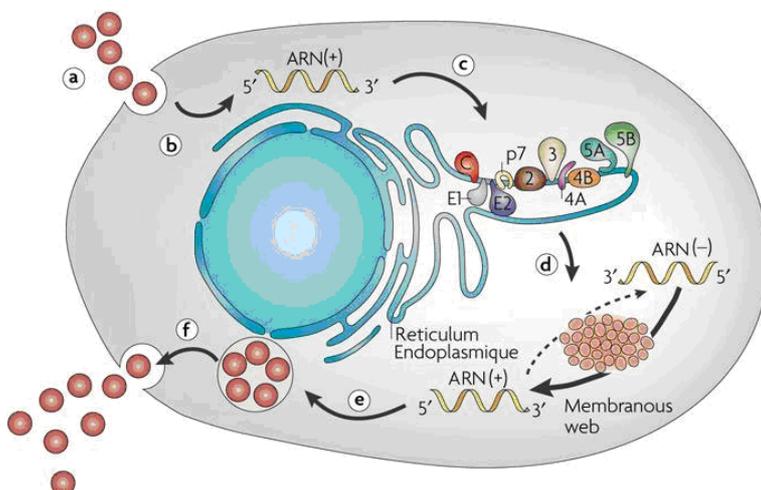


**Figure 16 : Structure du VHC.** La molécule d'ARN viral est contenue dans une capsidie protéique icosaoédrique entourée d'une double couche phospholipidique portant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Le génome du VHC est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive, d'une longueur approximative de 9600 nucléotides (nt). Source : med-ars.it

La nucléocapside du VHC est une structure protéique de géométrie icosaoédrique de 30-35 nm de diamètre, formée par la polymérisation de monomères de la protéine Core. Cette protéine, dite protéine C, est une petite protéine de 174 aa et de 21kDa (*kiloDalton*) (Nielsen *et al.* 2004). La nucléocapside est entourée d'une double couche phospholipidique dans laquelle sont ancrées les deux glycoprotéines d'enveloppe du VHC, appelées E1 et E2, associées en hétérodimères (Deleersnyder *et al.* 1997) (Figure 16). Ces protéines d'enveloppe jouent un rôle crucial dans la reconnaissance et l'entrée du virus.

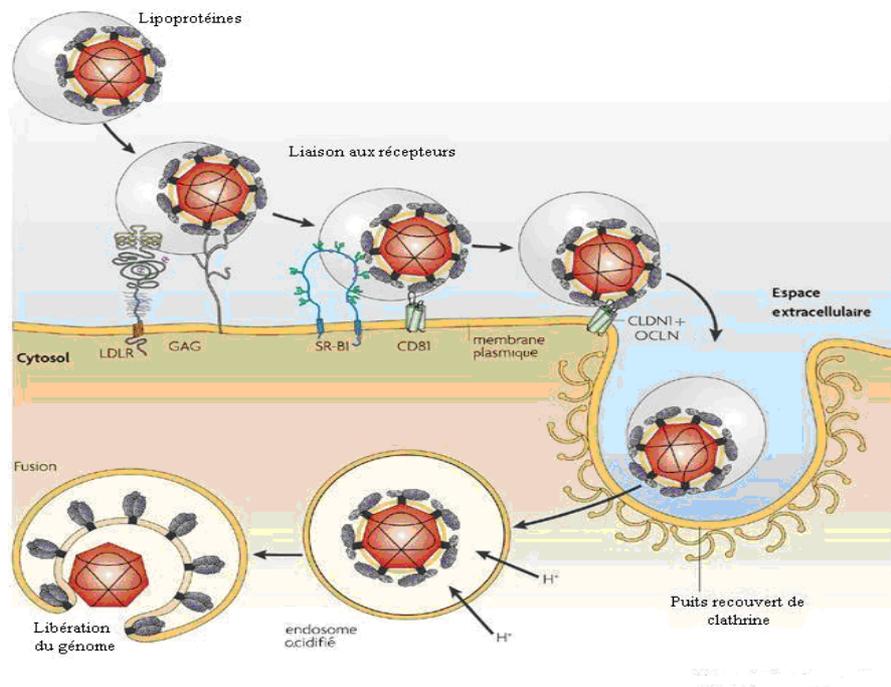
### c. Le cycle viral

Le cycle viral du VHC se découpe en plusieurs grandes étapes (Figure 17). Le virus s'attache sur la cellule hôte puis entre par endocytose, arrive ensuite une étape de décapsidation de l'ARN viral qui est alors traduit par la machinerie cellulaire. Le génome viral est alors répliqué et assemblé avec les protéines virales maturées pour former de nouveaux virions qui seront sécrétés dans le milieu extracellulaire.



**Figure 17 : Cycle viral du VHC .** Aux vues des découvertes récentes et par analogie avec les autres flavivirus, les grandes étapes du cycle viral sont supposées être les suivantes : (a) Entrée virale (b) Décapsidation (c) Traduction et maturation des protéines virales (d) Réplication du génome viral (e) Assemblage (f) Maturation et sécrétion des virions (Moradpour *et al.* 2007)

L'entrée du virus est un processus lent incluant plusieurs étapes successives (Cocquerel *et al.* 2006) (revue) (Figure 18). Dans le modèle actuellement proposé, le VHC, associé à des lipoprotéines, pourrait tout d'abord adhérer à la surface cellulaire via des interactions avec les glycosaminoglycanes (GAG) ou le récepteur du LDL cholestérol (*Low Density Lipoprotein Receptor, LDL-R*) (Germi *et al.* 2002). Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du virus se lieraient ensuite plus spécifiquement à un ensemble de récepteurs membranaires : CD81, SR-B1 (*Scavenger Receptor Class B type I*; récepteur des HDL (*High Density Lipoprotein*)), et des molécules des jonctions serrées : la claudine-1 (CLDN1) et l'occludine (OCLN). La tétraspanine CD81, est une molécule ubiquitaire également exprimée sur les cellules de l'immunité (lymphocytes B, T et NK), avec un rôle positif dans l'activation cellulaire T (Maecker 2003) et négatif dans l'activation des lymphocytes B (Sanyal *et al.* 2009). La co-expression des molécules CD81, SR-B1, CLDN1 et OCLN permet de rendre permissive à l'infection par le VHC différentes lignées cellulaires humaines, murines ou de hamster.

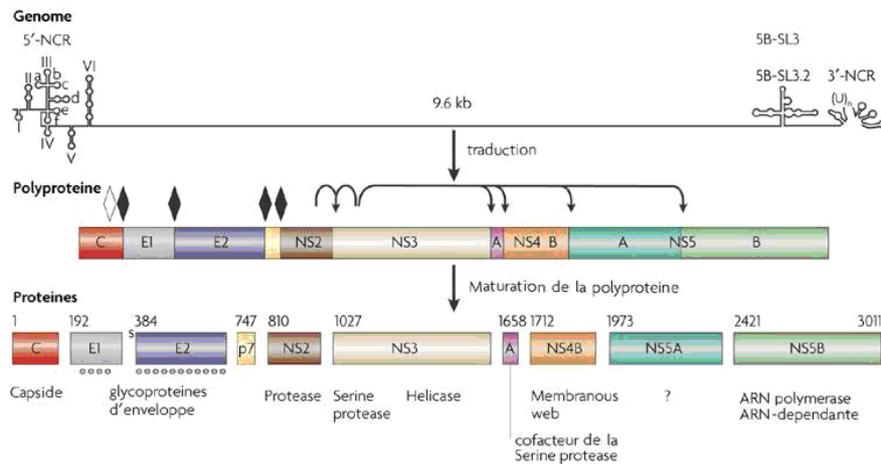


**Figure 18 : Modèle actuel de l'entrée du VHC.** L'entrée du VHC serait un processus incluant plusieurs étapes successives et faisant intervenir des récepteurs spécifiques. (Moradpour, *et al.* 2007)

Par ailleurs, deux lectines de type C ont été proposées comme récepteur potentiel du VHC : DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*) exprimée à la surface des cellules dendritiques et L-SIGN (*liver/ lymph node-*

*specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*) retrouvée au niveau des ganglions lymphatiques et du foie. La forme soluble de E2 est capable de se fixer spécifiquement aux molécules L-SIGN et DC-SIGN (Gardner *et al.* 2003; Lozach *et al.* 2003; Pohlmann *et al.* 2003). Ces molécules ne sont cependant pas exprimées à la surface des hépatocytes. Mais elles pourraient faciliter l'infection d'autres types cellulaires et notamment des cellules de l'immunité.

Après décapsidation, l'ARN viral, de polarité positive, est directement traduit par la machinerie cellulaire. La traduction est ensuite déclenchée, entraînant la synthèse d'une polyprotéine de 3010 acides aminés. La maturation de la polyprotéine virale est réalisée par l'action successive de deux protéases cellulaires puis de deux protéases virales (Figure 19).



**Figure 19 : Traduction et maturation de la polyprotéine virale.** Les protéines virales sont classées en deux groupes, les protéines structurales et non structurales (NS), en fonction de leur rôle majeur, respectivement dans la composition des particules virales ou du complexe de réplication du virus. *Losange noir* : Signal peptidase ; *losange blanc* : signal signal peptidase. (Moradpour, *et al.* 2007)

La réplication du génome viral est réalisée grâce à l'activité ARN polymérase ARN dépendante de NS5B (Moradpour *et al.* 2004). Elle semble également faire intervenir de nombreuses protéines cellulaires, tels certains membres de la famille des cyclophilines (Cyp), en particulier les CypA et/ou B en interagissant avec NS5B (Heck *et al.* 2009; Kaul *et al.* 2009; Watashi *et al.* 2005). Cette propriété pourrait expliquer l'effet anti-viral de la cyclosporine A (CsA) (Watashi *et al.* 2003), qui est capable de séquestrer les cyclophilines cellulaires.

Les voies de transmission inter-cellulaire du VHC sont encore mal définies. Bien que l'on sache que les cellules infectées sécrètent dans le milieu des quantités croissantes

de virions infectieux, on ne peut exclure une transmission de proche en proche (Timpe et al. 2008). *In vivo*, ce mode de transmission permettrait au virus d'échapper à la réponse immunitaire en diminuant le risque de rencontre avec des anticorps.

#### d. Tropisme cellulaire du VHC

Il est supposé que le tropisme du virus de l'hépatite C ne se limite pas à l'hépatocyte. Bien que les hépatocytes soient considérés comme la cible principale du VHC, des études cliniques et expérimentales indiquent que le virus infecte et se réplique dans d'autres types cellulaires, par exemple dans le système nerveux central (Radkowski et al. 2002), ou dans les cellules du système immunitaire (Pham and Michalak 2008) (revue).

Dès 1995, une étude a montré la présence de brin négatif et de brin positif d'ARN du VHC, à la fois en périphérie dans les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) et dans les cellules T infiltrant le foie, suggérant une répllication du virus dans les cellules immunitaires (Artini et al. 1995). Muratori et al. ont par ailleurs montré que les patients ayant subi une transplantation hépatique avaient 100% de leurs PBMCs positifs pour le génome du VHC (Muratori et al. 1996). La même année, il a été observé par immunofluorescence, une expression des protéines virales NS3/NS4 et Core, à la fois, dans les monocytes et les cellules B de la moelle osseuse et du sang périphérique, de patients chroniquement infectés par le VHC (Sansonno et al. 1996). En 2005, une équipe a également montré que le VHC pouvait se fixer aux DC mais que le taux de répllication y était très faible (Pachiadakis et al. 2005).

Cette notion de lymphotropisme du VHC est confortée par la présence de désordres du système lymphatique chez des patients présentant un CHC. Pham et al. ont récemment montré que l'ARN du VHC était détecté par PCR (*Polymerase Chain reaction*) et hybridation *in situ*, dans 30% des cas, dans les PBMC de patients ayant résolu l'hépatite C (spontanément ou après thérapie anti-virale) et ayant un taux d'enzymes hépatiques normal depuis 72 mois. Cet ARN viral est retrouvé à un taux de 100 à 1 000 copies pour  $10^7$  cellules, et 10% des PBMC de ces patients présentent un niveau d'ARN viral typiquement présent chez les patients présentant un CHC ( $> 10^4$  copies du virus pour  $10^7$  cellules) (Pham and Michalak 2008) (revue). Par ailleurs, il a été montré que la stimulation mitogénique de cellules T, B et de monocytes, issues de PBMC apparemment négatifs



Avec environ 650 000 porteurs du virus, soit environ 1,3% de sa population, la France se situe dans la moyenne des pays industrialisés (Desenclos 2000). On estime actuellement à environ 5000 le nombre de nouveaux cas par an en France. En dépit d'une forte diminution de l'incidence depuis 1989 (Alter 1997), le problème actuel est représenté par l'émergence du CHC chez les personnes contaminées avant 1980 (Deuffic *et al.* 1999).

### 3. Mode de transmission du VHC

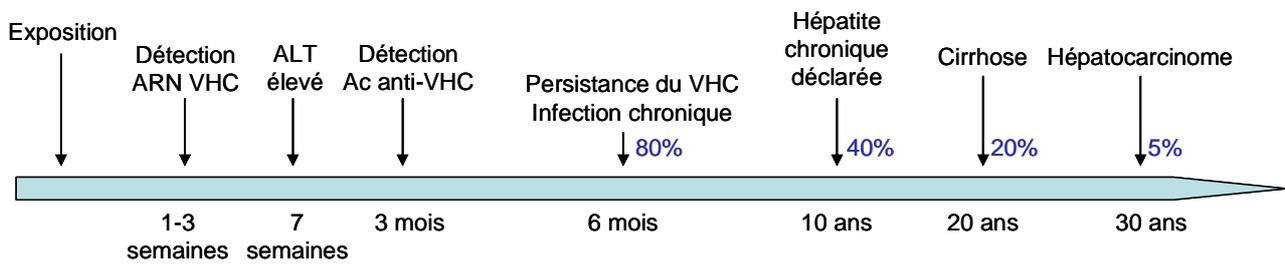
Le VHC est un virus hépatotrope doué d'une forte spécificité d'espèce et de type cellulaire, transmissible par le sang ou les produits dérivés ou tout support associé à une effraction de la barrière cutanée. En l'absence de réservoir animal, l'infection se transmet de manière inter-humaine directe. Les principaux facteurs de risque sont représentés par les transfusions sanguines surtout avant 1992 (date de mise en place d'un dépistage sérologique systématique des donneurs de sang), l'usage de drogues injectables et plus accessoirement par acupuncture, tatouage ou piercing. L'usage de drogues injectables par l'échange de seringues et des autres matériels nécessaires à l'injection est actuellement le principal facteur de dissémination du VHC (Alter 2007). Ainsi en France comme dans de nombreux pays européens, et en dépit d'une politique de réduction des risques, la prévalence du VHC continue d'augmenter (Rantala and van de Laar 2008) (revue).

### 4. Histoire naturelle de la maladie

L'histoire naturelle de l'infection par le VHC se caractérise par trois points importants (Pawlotsky 2004) (revue) (Figure 21):

- L'infection aiguë par le VHC est dans la très grande majorité des cas parfaitement asymptomatique, et fait suite à une période d'incubation d'environ 6 semaines également asymptomatique.
- Au terme de la phase aiguë, en dépit d'une réponse immunitaire, l'infection virale évolue vers la chronicité dans 50 à 80% des cas.
- Les études rétrospectives montrent qu'entre 8 et 20% des porteurs chroniques du VHC vont évoluer vers la cirrhose 20 à 25 ans après la contamination (Seeff *et al.*

2001). En cas de cirrhose, l'incidence annuelle du CHC est de l'ordre de 3 à 5% par an (Saito *et al.* 1990).



**Figure 21 : Chronologie de l'évolution de l'hépatite C et ses complications.** L'hépatite C est caractérisée par sa chronicité et son évolution en 20 à 25 ans vers des lésions hépatiques : cirrhoses, CHC. Adapté de l'Agence de la santé publique du Canada

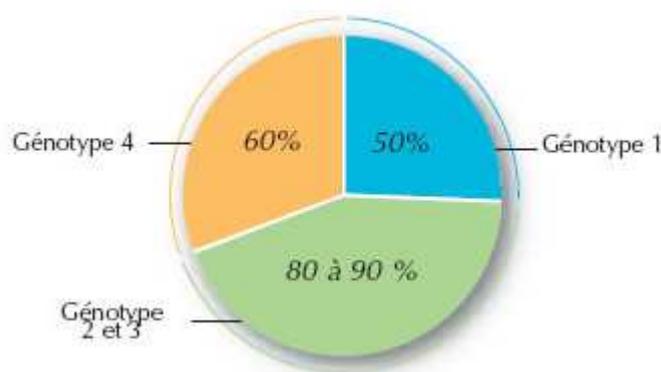
L'évolution de la pathologie vers la cirrhose se fait en plusieurs étapes, avec tout d'abord le développement d'une hépatite chronique symptomatique, qui se traduit par une inflammation du foie accompagnée de fièvre et d'ictère. Cette hépatite chronique devient active dans 30% des cas, pour lesquels l'inflammation hépatique conduit au développement d'une fibrose (durcissement du tissu hépatique) s'accompagnant d'une hépatomégalie et d'une splénomégalie. Enfin, 5 à 10% des patients verront leur cirrhose évoluer vers des lésions néoplasiques, qui représentent le stade ultime de la pathologie.

Différentes études cliniques ont permis de mettre en lumière le fait que cette disparité de risques au cours de l'histoire naturelle de l'infection virale est liée à différents facteurs de risques extérieurs, en particulier à une consommation excessive d'alcool, une co-infection par le VIH ou le VHB, le traitement immunosuppresseur. Dans une moindre mesure, un âge supérieur à 40 ans lors de la contamination et le sexe masculin sont également des facteurs péjoratifs.

### 5. Traitement de l'hépatite C

Le traitement de l'hépatite C chronique, actuellement recommandé, repose sur l'association d'un IFN- $\alpha$  humain recombinant (2a ou 2b) pégylé et de Ribavirine (Lang 2002). Cette association thérapeutique combine des effets anti-viraux et immunostimulants. La pégylation correspond à l'ajout d'une molécule de polyéthylène glycol, sous forme linéaire (Interféron- $\alpha$ 2b, ViraféronPEG®) ou ramifiée (Interféron- $\alpha$ 2a, PEGASYS®) sur les résidus lysine ou le groupe NH<sub>2</sub> terminal. Cette pégylation permet d'augmenter la demi-vie biologique de l'IFN de 24 à 120h, en diminuant sa cinétique

d'élimination. La pégylation pourrait également permettre de diminuer l'apparition d'anticorps neutralisants. En conséquence, la bithérapie pégylée permet une réponse virologique prolongée ou une éradication virale dans 51 à 54% des cas en moyenne tous génotypes confondus (Manns *et al.* 2001; Zeuzem *et al.* 2000), contre seulement 38-41 % pour la bithérapie non pégylée (McHutchison *et al.* 1998; Poynard *et al.* 1998) et 10% pour la monothérapie IFN- $\alpha$  de 12 mois. Il a également été montré que la monothérapie Ribavirine était inefficace (Brok *et al.* 2009). Les facteurs virologiques ont un impact important sur le traitement. Alors que les patients infectés par les virus de génotypes 2 et 3 répondent au traitement dans 80 à 90% des cas, moins de la moitié des patients infectés par le VHC de génotype 1 vont développer une réponse anti-virale soutenue (SVR, *Sustained Viral Response*) (Figure 22). Par ailleurs, la faible proportion de patients répondants au traitement est attribuée à des mécanismes de tolérance qui nécessitent des ajustements fréquents des dosages médicamenteux.



**Figure 22: Réponses à la bithérapie IFN $\alpha$  / Ribavirine, selon le génotype viral.** Les génotypes 2 et 3 sont les plus répondeurs au traitement et le génotype 1, le moins répondeur. Source: [www.ccr.fr/sites/hepatite\\_C/site/index.htm](http://www.ccr.fr/sites/hepatite_C/site/index.htm)

Devant les faibles résultats obtenus avec la thérapie anti-virale, de nouvelles pistes sont actuellement explorées pour le développement de nouveaux traitements anti-viraux ciblés (Birerdinc and Younossi 2010; Pawlotsky *et al.* 2007; Webster *et al.* 2009\*). Parmi eux, des inhibiteurs de l'ARN polymérase virale ou des analogues de la ribavirine sont en cours de développement. Par ailleurs, les cyclophilines sont connues pour leur rôle essentiel dans la réplication du VHC dans les hépatocytes : l'interaction de NS5B avec la CyP B favorise le rapprochement de NS5B de l'ARN viral et ainsi sa transcription (Heck, *et al.* 2009). Il a été suggéré que les CyP pouvaient être de nouvelles cibles anti-virales. Ainsi, la cyclosporine A, immunosuppresseur couramment utilisé après la transplantation hépatique, et ses deux analogues non immunosuppresseurs DEBIO-25

(Alisporivir) et NIM811, ont montré une activité anti-virale contre différents réplicons du VHC de génotype 1a, 1b et 2a (Ma *et al.* 2006; Paeshuyse *et al.* 2006; Watashi 2010), grâce à leur capacité à inhiber les cyclophilines (propyl-peptidyl isomérase). En effet, la CsA empêche l'interaction entre la polymérase virale NS5B et la CyP B (Watashi, *et al.* 2005). Cependant, plus récemment Fernandes *et al.* ont montré le développement de mutants résistants aux effets anti-viraux de la CsA (Fernandes *et al.* 2010). Ces mutants présentent une capacité accrue de fixation de NS5A sur la CyP B, qui n'est pas inhibée par la CsA (Fernandes, *et al.* 2010).

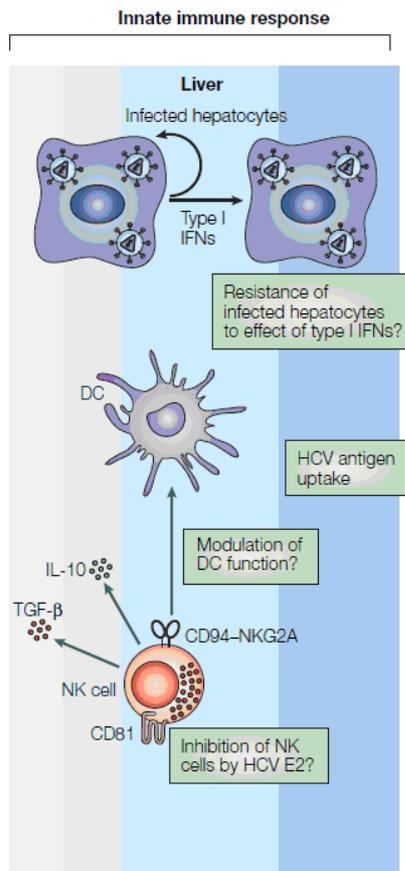
## **B - Réponse immunitaire effectrice et Hépatite C**

Le foie est un organe particulièrement riche en cellules du système immunitaire inné, telles que les macrophages (cellules de Kupffer dans le foie), les cellules NK et NKT. L'interaction entre les cellules immunitaires et les cellules épithéliales du foie détermine l'issue de l'infection par le VHC (Castello, *et al.* 2010) (revue). Cependant, malgré une réponse immunitaire importante, l'infection virale persiste, suggérant une altération du système immunitaire au cours de la pathologie.

### *1. La Réponse immunitaire innée*

Précocément après l'infection par le VHC, le système immunitaire inné répond à la présence d'ARN viraux par l'activation de cascades intracellulaires conduisant à la production d'IFN de type I (IFN- $\alpha$ ). Les IFN de type I sont connus pour avoir un effet anti-viral direct. Cependant, il semble que, *in vivo*, le VHC soit insensible à la réponse IFN (Rehermann 2009) (revue) (Figure 23). Les IFN de type I ont la capacité d'augmenter la présentation antigénique et la prolifération des cellules T mémoires, la maturation des DC, de prévenir l'apoptose des cellules T et de promouvoir l'activation des cellules NK (Tilg 1997) (revue). Les cellules NK représentent 40% des lymphocytes totaux dans le foie sain, mais cette proportion passe à 90% chez les patients ayant une tumeur hépatique (Canning *et al.* 2006) (revue). Cependant, il semblerait que le VHC pourrait interférer avec l'activation des cellules NK, via une interaction directe entre la glycoprotéine d'enveloppe E2 et la molécule CD81 exprimée par les cellules NK (Tseng and Klimpel 2002) (Figure 23). Plus récemment, il a été montré que l'infection chronique par le VHC affecte les fonctions des cellules NK et notamment leur sécrétion d'IFN- $\gamma$ , mais pas leur cytotoxicité (cellules

CD107a positives). Cet effet du virus est réversé par la prise de traitement anti-viral (Dessouki *et al.* 2010). Il semblerait que ce soit la protéine NS5A du virus qui réduirait indirectement, via une action sur les monocytes, l'expression du récepteur NKG2D sur les cellules NK, inhibant ainsi leur fonction *in vitro* (Sene *et al.* 2010). Ainsi, une production insuffisante d'IFN par les cellules NK va résulter en une altération du développement des cellules Th1 en faveur d'une réponse Th2, permettant ainsi la persistance virale et la chronicité de la pathologie (Tseng and Klimpel 2002).



**Figure 23 : Echappement du VHC au système immunitaire innée.** Au cours de la réponse immunitaire innée chez le chimpanzé, il a été montré que le VHC n'était pas sensible à l'action anti-virale des IFN de type I. *In vitro*, de fortes doses de la protéine d'enveloppe E2 du VHC seraient capables d'inhiber les cellules NK issues de donneurs sains. Par ailleurs, les cellules NK de patients infectés par le VHC présentent un défaut de leur production cytokinique et de leur capacité à activer les DC. (Rehermann and Nascimbeni 2005)

Le VHC atténue également les réponses IFN à d'autres niveaux. Il semble ainsi pouvoir diminuer la production d'IFN de type I par les hépatocytes, directement au cours de l'infection (Rehermann 2009) (revue). Les IFN de type I sont également produits par des cellules non parenchymateuses, particulièrement les pDC dans les tissus inflammatoires. Au cours de l'infection par le VHC, la fréquence des pDC dans le sang et leur capacité à produire des IFN de type I est réduite. Il semblerait qu'un contact direct entre la cellule et le virus soit suffisant pour induire cet effet (Dolganiuc *et al.* 2006) (Figure 23).

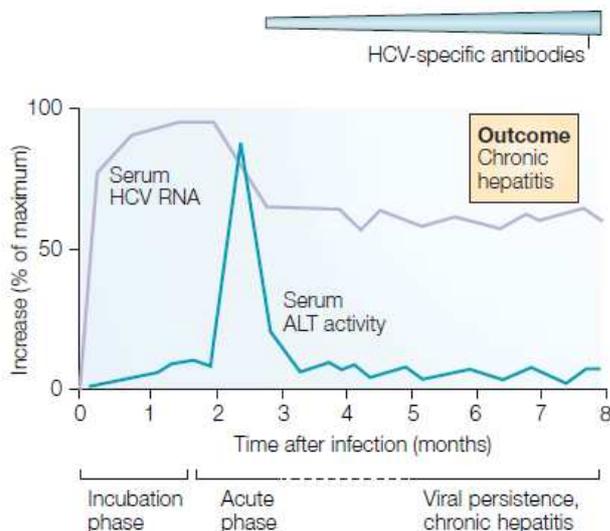
Le VHC est également capable d'altérer la fonction des cellules dendritiques conventionnelles (cDC). En effet, Krishnadas *et al.* ont récemment montré que les protéines virales Core, NS3, NS4 et NS5 étaient capables d'affecter les fonctions des DC immatures et matures, en inhibant l'expression des molécules de costimulation et des CMH, en diminuant la sécrétion d'IL-12 et en induisant l'expression de molécules apoptotiques (Krishnadas *et al.* 2010) (Figure 23). A la fois la maturation et la fonction des cDC sont altérées au cours de l'infection par le VHC, ce qui peut conduire à une activation insuffisante des cellules T spécifiques du VHC et donc un retard dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (Dolganiuc *et al.* 2003).

L'altération de différents types cellulaire du système immunitaire inné semble conduire à la persistance du VHC. Cependant, bien que ces cellules immunitaires innées ne peuvent pas contrôler la répllication et la dissémination virales ; elles permettent le développement des réponses T CD4+ helper et T CD8+ cytotoxiques spécifiques du virus.

## 2. La Réponse immunitaire adaptative

### a. La réponse humorale

L'hépatite C n'est en général pas diagnostiquée tant que les taux d'alanine aminotransférases (ALAT) n'augmentent pas, en général 8 à 12 semaines suivant l'infection initiale. C'est à ce moment que des anticorps spécifiques du VHC deviennent détectables (Figure 24) et que l'on constate l'apparition de cellules T spécifiques des antigènes viraux. Cette apparition d'une immunologie adaptative anti-virale coïncide d'ailleurs avec la diminution du titre du VHC (Shin *et al.* 2006).



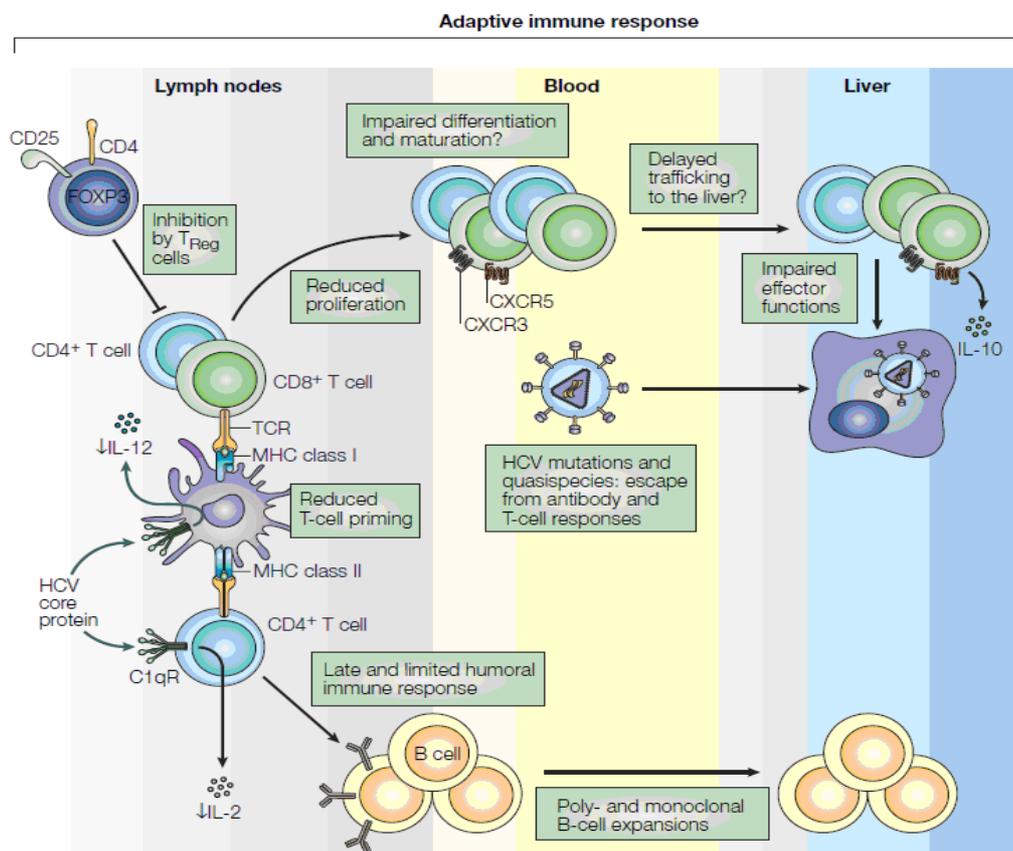
**Figure 24 : Schématisation de la réponse immunitaire humorale au cours des phases aiguë et chronique de l'infection par le VHC.** Le taux d'ARN sérique du VHC atteint un pic durant la phase d'incubation (phase où les enzymes hépatiques ALAT sont normales), puis commence à décroître au cours de la phase aiguë de l'infection (moment où les ALAT sont à leur plus haut niveau). Le taux d'ARN du VHC reste élevé au cours de la phase chronique de l'hépatite, alors qu'il retourne à un niveau basal en cas de guérison (non représenté). Le développement d'anticorps spécifiques du VHC est variable. La clairance virale apparaît avant la détection d'une réponse humorale spécifique ou même en absence de développement de cette réponse. (Rehermann and Nascimbeni 2005)

b. La réponse cellulaire

Bien que les anticorps anti-VHC ne permettent pas, au stade de l'infection aiguë, d'éradiquer le virus, ils continuent d'exercer une pression de sélection sur les variants viraux et contribuent ainsi à l'évolution des séquences des protéines d'enveloppe du VHC, tout au long de l'infection (Shimizu *et al.* 1994). Ainsi, une réponse efficace contre le VHC est difficile à obtenir, compte tenu des constantes modifications du génome du VHC. En effet, le haut niveau de réplication du VHC lui permet d'échapper à la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Cette pression de sélection est plus forte durant la phase aiguë de l'infection et diminue lors de la phase chronique (Rehermann 2009) (revue). Le turn over des virions du VHC est rapide, avec une  $\frac{1}{2}$  vie d'environ 3h et approximativement  $10^{12}$  virus produits par jour chez une personne infectée. A l'heure actuelle, on estime que plus de 100 quasi-espèces du VHC existent. Une telle variabilité requiert donc une surveillance immunitaire efficace de la part de l'hôte, afin de permettre le développement d'une réponse anti-virale contre ces nouveaux variants émergents (Castello, *et al.* 2010) (revue). Plus récemment, Wang *et al.* ont montré que des mutations épitopiques de la protéine NS3 du VHC coïncident avec la diminution de la réponse cytotoxique (CTL) des cellules CD8<sup>+</sup> ; et que ces mutations affectent la reconnaissance des épitopes par les cellules T et non la présentation peptidique par les molécules du CMH (Wang *et al.* 2010). Ainsi, une mauvaise activation des cellules B et T semble être à l'origine du retard dans la réponse immune observé au cours de l'infection.

**Au cours de l'infection aiguë**, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle central dans le contrôle précoce de la réplication virale. La diminution du titre viral coïncide avec l'apparition de cellules T spécifiques du VHC et avec la sécrétion d'IFN- $\gamma$  dans le foie. Cependant, il n'est pas encore déterminé si l'IFN- $\gamma$  est directement impliqué dans la clairance virale ou s'il est juste nécessaire à la fonction des autres cellules T spécifiques (Cheney *et al.* 2002). Ciuffreda *et al.* ont récemment montré une augmentation des cellules T effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>FoxP3<sup>-</sup> au cours du traitement anti-viral. Il semble d'ailleurs que cette population de cellules T effectrices soit amplifiée au cours de la récurrence du CHC, d'origine virale ou non, mais que la présence d'une infection sous-jacente par le VHC influence négativement l'expansion de cette population (Ciuffreda *et al.* 2010). On sait que la perte d'une réponse CD4<sup>+</sup> précoce a été associée à une

réapparition de la virémie, même après un contrôle apparent de celle-ci durant plusieurs mois (Gerlach *et al.* 1999). En effet, les phénomènes de guérison spontanée sont associés à la présence d'une forte activité Th1 dirigée contre les protéines virales Core, NS3, NS4 et NS5 ; et au contraire, une réponse CD4 inexistante ou de faible amplitude est associée à un mauvais pronostic d'évolution de la pathologie, c'est ce qui est retrouvé chez les patients qui avait contrôlé l'infection mais dont la virémie réapparaissait (Gerlach, *et al.* 1999). Dans ce sens, il a été montré récemment que les protéines virales Core, NS3, NS4 et NS5 inhibent la fonction des lymphocytes T indirectement, en altérant les DC matures et immatures, ce qui résulte en une réponse immunitaire affaiblie (Krishnadas, *et al.* 2010) (Figure 25).



**Figure 25 : Echappement du VHC à la réponse immunitaire adaptative.** Dans le sang, le VHC échappe à la réponse immunitaire adaptative (reconnaissance par le TCR ou les anticorps), par la présence de nombreuses quasi-espèces et ses grandes capacités mutagène. Il semble par ailleurs que les cellules T spécifiques du VHC présentent un défaut de leur maturation, de leurs fonctions effectrices et de leur migration au foie, causé par le VHC lui-même ou du fait de l'altération de la fonction des DC. De plus, les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> périphériques semblent jouer un rôle dans l'altération de la réponse immunitaire effectrice, depuis que leur fréquence a été retrouvée augmentée chez les patients chroniquement infectés. (Rehermann and Nascimbeni 2005)

Contrairement aux cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du VHC, des cellules T CD8<sup>+</sup> sont détectées dans le sang des patients en infection aiguë (virémie élevée). Durant l'infection

aiguë, les cellules T CD8+ semblent être inefficaces, avec une diminution de leur prolifération, de leur production d'IFN- $\gamma$  et de leur cytotoxicité (Rehermann 2009) (revue). En effet, l'impact de la protéine NS3 du VHC sur la fonction des DC, a pour conséquence une perte de la polyfonctionnalité des cellules CD8+ : production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF- $\alpha$  (Rodrigue-Gervais *et al.* 2010). Par ailleurs, la déplétion des cellules T CD4+ *in vivo* inhibe complètement la réponse T CD8+ protectrice, ce qui confirme que les cellules T CD4+ sont nécessaires à la génération et au maintien de ces cellules CD8+ (Thimme *et al.* 2002).

**Lors de l'infection chronique** par le VHC, la réponse T spécifique s'épuise. Ainsi, chez les patients qui développent une infection chronique, il est observé une réponse immunitaire spécifique du VHC absente ou faible (Cox *et al.* 2005). Il semblerait que le VHC puisse affecter le développement de la réponse immunitaire au long terme en interférant avec la maturation des épitopes viraux, leur liaison au CMH et leur reconnaissance par les T CD4+ et CD8+ (Rehermann 2009) (revue) (Figure 25). Par ailleurs, Serra *et al.* ont suggéré que l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe virale E2 avec la molécule CD81 des lymphocytes T, conduisait au développement d'une réponse cellulaire Th2, aux dépens de la réponse Th1. Ceci pouvant expliquer l'inflammation hépatique et la persistance virale observée chez les patients chroniquement infectés par le VHC (Serra *et al.* 2008).

Il est suggéré que la **progression de la pathologie** hépatique et l'apparition des lésions hépatiques sont médiées par le système immunitaire. Cette hypothèse est basée sur le fait que l'apparition des lésions hépatiques durant la phase aiguë de l'infection, est corrélée à l'infiltration de cellules T dans le foie. En effet, les cellules T spécifiques du VHC ont une fréquence plus importante dans le foie que dans le sang des patients présentant des lésions hépatiques (He *et al.* 1999). Le recrutement continu de ces lymphocytes T et la lyse de nombreux hépatocytes infectés par le VHC conduit à la sécrétion de cytokines inflammatoires et pro-fibrotiques, telles que le TGF- $\beta$ , qui activent les cellules étoilées, sources primaires de matrice extra-cellulaire (MEC). Cette MEC conduit à la formation de fibres de collagène entre les couches d'hépatocytes et ainsi à la cirrhose (Rehermann 2009) (revue).

Par ailleurs, la persistance de la réplication du VHC dans les hépatocytes et potentiellement dans les cellules immunitaires conduit à la stimulation antigénique continue du système immunitaire, ce qui permet à l'hôte de relativement bien contrôler l'infection. En contrepartie, la présentation chronique des antigènes du VHC par les cellules B et les monocytes infectés semble contribuer à la tolérance immunitaire du VHC et ainsi à sa persistance (Castello, *et al.* 2010) (revue). En effet, la quantité d'IL-10, cytokine immunosuppressive, est typiquement augmentée lors de l'infection chronique par le VHC (Piazzolla *et al.* 2000). Les cellules T produisant cette cytokine sont préférentiellement localisées dans des régions hépatiques présentant un faible taux d'apoptose des cellules hépatiques ; contrairement aux cellules T productrices d'IFN- $\gamma$ . L'IL-10 peut également être sécrétée par les monocytes en réponse à la protéine Core du VHC ; ainsi que par les cellules NK. Cette cytokine inhibe la production d'IFN- $\gamma$ , favorise l'apoptose des pDC et down-régule la réponse cellulaire T effectrice. L'IL-10 atténue ainsi la réponse inflammatoire dans le foie, au prix d'une altération de la réponse immunitaire anti-virale (Rehermann 2009) (revue).

### **C - Réponse immunitaire régulatrice et Infection chronique du VHC**

Il est admis que l'infection par le virus de l'hépatite C se caractérise par sa persistance malgré une réponse immunitaire importante, à la fois humorale et cellulaire. Les mécanismes responsables du dysfonctionnement des cellules T spécifiques du VHC chez les patients chroniquement infectés commencent à être connus, et des études ont suggéré une contribution majeure des cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Aandahl *et al.* 2004; Accapezzato *et al.* 2004; Dittmer *et al.* 2004; Sugimoto *et al.* 2003).

Suite à l'observation *in vitro*, que la déplétion en cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> conduisait à une augmentation de la réactivité des cellules T spécifiques du VHC, il a été suggéré que l'induction des Treg devait jouer un rôle important dans l'établissement de l'infection chronique par le VHC (Sugimoto, *et al.* 2003). La persistance de l'infection par le VHC pourrait être expliquée par l'altération du ratio Treg/PBMC, chez les patients présentant une hépatite C chronique au cours de la thérapie virale IFN- $\alpha$ /Ribavirine, par rapport au ratio Treg/PBMC observé avant traitement. L'évaluation des Treg, dans les lymphocytes infiltrant le foie avant traitement et dans les PBMC durant le traitement, semble être un

facteur significatif de la persistance de l'infection par le VHC et peut prédire le résultat de la thérapie anti-virale (Akiyama *et al.* 2010) (Article 8 p130). Les cellules T régulatrices CD4+CD25+ (Treg) semblent jouer un rôle dans l'infection chronique, en supprimant notamment la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T CD4+ (Bolacchi *et al.* 2006).

Les T CD4+CD25+ représentent 13,5% (+/-1,8) des cellules T CD4+ périphériques dans la circulation sanguine des patients chroniquement infectés par le VHC, ce qui est significativement plus élevé que ce qui est observé chez les contrôles sains (5,3% +/-0,8). Cependant, les niveaux d'expression de FoxP3 et la suppression médiée par les Treg au cours de la phase aiguë de l'infection, ne sont pas différents entre les patients qui ont éliminé le virus et ceux qui développent une chronicité ; ceci suggèrent donc que les Treg sont induits suite à l'inflammation aiguë (Smyk-Pearson *et al.* 2008).

Les lymphocytes T CD4+CD25+ périphériques chez des porteurs chroniques du VHC qui présentent des taux d'ALAT normaux et anormaux, ont été analysés pour leur spécificité d'action et leur effet sur la réactivité des cellules T CD4+ spécifiques du VHC (Bolacchi, *et al.* 2006; Itose *et al.* 2009). Il a ainsi été montré que les cellules T CD4+CD25+/high spécifiques du VHC produisent des quantités importantes de TGF- $\beta$  mais seulement des quantités limitées d'IL-10 et pas d'IL-2, ni d'IFN- $\gamma$ . Par ailleurs, la production de TGF- $\beta$  par les CD4+CD25+/high spécifiques du VHC est sensiblement plus grande chez les patients avec des ALAT normaux comparativement aux patients avec des ALAT élevées (Bolacchi, *et al.* 2006). Il a également été montré que parmi les PBMC la prolifération des lymphocytes T CD4+ spécifiques du virus est plus importante chez les patients présentant des ALAT élevées en comparaison aux patients avec des ALAT normaux (Itose, *et al.* 2009). Par ailleurs, la déplétion des CD4+CD25+ dans la fraction de PBMC a pour conséquence une augmentation de la prolifération des T CD4+ spécifiques du VHC chez les patients présentant les niveaux normaux en ALAT (Bolacchi, *et al.* 2006; Itose, *et al.* 2009). En outre, les cellules CD4+CD25+ de ces patients se sont avérés être sensiblement plus efficaces pour supprimer l'activité des cellules T CD4+. Ces données soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle les cellules régulatrices CD4+CD25+ pourraient jouer un rôle en contrôlant la réponse inflammatoire chronique et les lésions hépatiques chez les porteurs chroniques du VHC (Bolacchi, *et al.* 2006; Itose, *et al.* 2009).

Au laboratoire, nous avons observé une augmentation significative des marqueurs des cellules T régulatrices CD4+CD25+ et Tr1, proportionnellement à la fibrose hépatique, chez les patients présentant une cirrhose ou un CHC par rapport aux patients sans lésions hépatiques (Delhem *et al.* 2008) (Article 3 p118). Ce recrutement intra-hépatique de cellules T régulatrices est spécifique de l'infection par le VHC, du fait de l'absence de cellules régulatrices dans les biopsies hépatiques de patients présentant un CHC lié à l'alcool (Carpentier *et al.* 2009\*) (Article 7 p128).

Ward *et al.* ont montré qu'il existe une forte proportion de Treg FoxP3+ au sein des CD4+ infiltrant le foie, mais sans réelle différence selon le degré de sévérité de la fibrose hépatique, avec un ratio CD4+:FoxP3+ (Teff:Treg) de 2:1 chez les patients chroniquement infectés par le VHC par rapport à 10:1 chez une personne non infectée (Ward *et al.* 2007). Yoshizawa *et al.* ont également montré une augmentation significative des cellules T régulatrices dans les maladies chroniques du foie liées au VHC (5,88%), particulièrement dans le CHC (6,8%), en comparaison à des donneurs sains (5,13%) (Yoshizawa *et al.* 2010). Ces résultats ont été récemment confirmés par l'équipe de Wang *et al.*, qui ont observé une augmentation significative du nombre de Treg chez les patients chroniquement infectés par le VHC, et que cette augmentation était associée au génotype viral 1b (Wang *et al.* 2010\*). Un grand nombre de Treg CD4+FoxP3+, hautement activés et différenciés, se trouve parmi les lymphocytes infiltrant le foie chroniquement infecté, ce qui doit limiter l'évolution de la fibrose (Claassen *et al.* 2010). Ces Treg CD4+FoxP3+ seraient localisés dans les régions nécro-inflammatoires du foie, au contact direct des cellules effectrices CD8+ (Sturm *et al.* 2010). Ceci suggère que les Treg CD4+FoxP3+ jouent bien un rôle central dans la limitation des lésions hépatiques, en supprimant l'activation immunitaire excessive liée au VHC. Il semblerait, par ailleurs, que ce soit les hépatocytes infectés qui seraient capables d'induire directement le développement de Treg, via la sécrétion de TGF- $\beta$ . En effet, il a été montré que la coculture de T CD4+ avec des Huh7.5 infectés par le VHC 1a conduisait à l'expression de marqueurs de Treg (CD25, FoxP3, CTLA-4 et LAP) et à une activité suppressive (Hall *et al.* 2010).

Par ailleurs, le VHC pourrait être directement responsable du recrutement des Treg au site tumoral. En effet, l'expression des chemokines CCL17 et CCL22 est retrouvée augmentée dans le foie de patients chroniquement infectés par le VHC et présentant un CHC. Ces chemokines induisent la migration des Treg *in vitro*. Il a, de plus, été montré que la culture de DC avec des Huh7 infectés par le JFH-1 induisait une sécrétion de CCL17 et CCL22 (Riezu-Boj *et al.* 2010).

En 2008, Godkin *et al.* ont suggéré que des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> spécifiques d'épitopes protéiques du VHC permettaient la clairance virale. En effet, les Treg isolés du sang de patients en clairance virale sont capables de supprimer la réponse de clones T spécifiques du VHC, contrairement aux Treg isolés de patients présentant encore une virémie (Godkin *et al.* 2008). De nombreuses études semblent ainsi indiquer que les patients avec une infection aiguë et qui développent une chronicité de la pathologie, présentent des modifications de la fonction régulatrice des Treg. Il est possible qu'une stimulation antigénique répétée inhibe la fonction des Treg dans le temps (Smyk-Pearson, *et al.* 2008). Li *et al.* ont, quant à eux, montré que la culture de PBMC, issus de patients VHC positifs, en présence de peptides dérivés de protéines virales permettait l'induction rapide de cellules T régulatrices CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>high</sup> IFN $\gamma$ <sup>-</sup>, ce qui confirme que les Treg naturels spécifiques de protéines du VHC sont abondants chez les patients infectés. Par ailleurs, le type de peptide qui est capable d'activer les Treg est différent selon les patients, ce qui suggère l'existence de peptides immunodominants (Li *et al.* 2007). En effet, il a été montré que les protéines du VHC activaient différemment les cellules effectrices et régulatrices. Ainsi, l'activation *in vitro*, de cellules T issues de souris, avec la protéine virale Core conduit au développement d'une réponse régulatrice à la fois CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et donc à la persistance virale; alors que la stimulation avec la protéine NS3 conduit au développement d'une réponse effectrice permettant la clairance (Krishnadas *et al.* 2010\*). Langhans *et al.* ont confirmé la fréquence plus importante de Treg spécifiques de deux épitopes de la protéine virale Core, chez les patients chroniquement infectés par le VHC. Ces épitopes seraient également reconnus par les T effecteurs. Cependant, contrairement à l'étude de Godkin en 2008, seuls les Treg issus de patients chroniquement infectés par le VHC, sont capables d'inhiber la prolifération des cellules effectrices, via la sécrétion d'IL-10 plutôt que par contact cellulaire. De plus, le maintien des capacités suppressives

de ces Treg Core-spécifiques nécessite la stimulation continue par l'antigène Core (Langhans *et al.* 2010).

D'autres populations de cellules T régulatrices sont décrites dans l'infection par le VHC. Ainsi, des cellules T CD8+ intra-hépatiques, issues de patients chroniquement infectés, sont capables de supprimer *in vitro* la prolifération de lymphocytes dérivés du foie, de façon VHC spécifique et dépendante de l'IL-10. Les Treg CD8+CCR7- présents dans le foie infecté, sont capables de supprimer via l'IL-10 les cellules T CD8+ spécifiques du VHC, ce qui favorise la persistance virale (Rehermann 2009) (revue).

De nombreuses études insistent sur le rôle crucial joué par les Treg dans l'évolution de l'infection par le VHC. En effet, la présence des cellules T régulatrices dans le foie des patients chroniquement infectés par le VHC et l'augmentation de leur fréquence (avec une corrélation positive avec le titre en ARN du VHC) durant la cirrhose ou dans le micro-environnement tumoral des patients présentant un CHC, suggère le rôle central joué par ces cellules dans l'aggravation de la pathologie hépatique (Rehermann 2009) (revue). Cependant, à ce jour, l'implication directe des T CD4+CD25+ dans la malignité et dans le contrôle de la progression du carcinome hépatocellulaire n'a pas été clairement démontrée.

### **D - Transplantation hépatique et Récidive de la pathologie virale C**

Différents traitements locaux du CHC sont actuellement utilisés tels que, l'injection transcutanée d'éthanol, l'ablation thermique, la chemo-embolisation intra-artérielle ou la radiofréquence, mais ces traitements ne sont efficaces que sur les tumeurs localisées (Dick *et al.* 2002) et moins de 10% des patients ayant une maladie modérée (Okuda stade 2) survivent à 3 ans (Levy and Sherman 2002). Dans tous les cas, la résection chirurgicale, lorsqu'elle s'adresse à des patients cirrhotiques bien sélectionnés sur la base de la taille et du nombre de tumeur, donne des résultats satisfaisants à long terme. Cependant, du fait de l'existence, dans la majorité des cas, d'une cirrhose sous-jacente, la résection chirurgicale du CHC ne peut être proposée qu'à une minorité de malades. En effet, la principale cause de décès chez les patients réséqués est la récurrence hépatocarcinomateuse *de novo*, à distance du site de résection, du fait de l'hépatopathie sous-jacente.

### 1. Traitement du CHC : La Transplantation Hépatique

L'utilisation de la transplantation hépatique (TH) dans le traitement des cancers du foie a paru d'emblée prometteuse car le foie est un organe hautement tolérogène. En effet, le foie représente la première ligne de défense de l'organisme, de par ses fonctions de détoxification. Cependant, un développement exagéré de ces mécanismes de défense conduirait à une réaction inflammatoire avec destruction hépatocytaire. Ainsi, des mécanismes de tolérance locaux sont mis en place, notamment grâce aux CPA hépatiques (Cellules Endothéliales des Sinusoïdes Hépatiques, cellules de Kupffer). La TH semble d'autant plus prometteuse qu'elle permettrait à la fois de traiter le cancer et la cirrhose, qui doit être considérée comme une lésion prénéoplasique. Ainsi, depuis les années 1990, plusieurs études ont montré que la transplantation hépatique offrait une meilleure survie globale que la résection pour un hépatocarcinome limité et sans invasion vasculaire sur foie cirrhotique (Martin *et al.* 2006).

En Europe, le CHC présente aujourd'hui 15% des indications de TH. Cependant, différents critères, appelés critères de Milan (Mazzaferro *et al.* 1996), sont à prendre en compte dans la nécessité de l'utilisation de la TH ; notamment l'âge, la présence d'une tumeur unique < 5cm ou d'au maximum 3 nodules tumoraux < 3cm, le type de tumeur et l'envahissement veineux. Une étude réalisée entre 2003 et 2005 a montré que la survie du greffon après la transplantation hépatique, quelle qu'en soit l'étiologie, était de 47 mois, avec un taux de survie de 75% en l'absence du VHC et 65% si l'agent responsable est le VHC.

La transplantation hépatique reste théoriquement le meilleur traitement du CHC sur cirrhose, car elle permet non seulement de traiter la cirrhose, mais aussi d'enlever le carcinome, les éventuels nodules tumoraux non diagnostiqués avant l'intervention et les possibles foyers pré-cancéreux. Son efficacité est cependant limitée par les risques de rejet du greffon et de récurrence hépatique de la pathologie virale C.

### 2. Complications après la TH : Le rejet du greffon et La récurrence virale C

#### a. Le rejet du greffon

Après la transplantation hépatique, le patient est confronté au problème du rejet du greffon. Nous avons vu dans le chapitre précédent que le système immunitaire est capable de réguler lui-même ces réponses contre l'hôte, par le biais des lymphocytes T

régulateurs. Cependant, la présence de ces cellules régulatrices n'est pas suffisante pour contrer tout risque de rejet. L'administration de drogues immunosuppressives est donc essentielle à la survie du greffon (voir Introduction - chapitre T régulateurs et Immunosuppresseurs).

Trois formes de rejet ont été initialement décrites. Elles se caractérisent par leur cinétique plus ou moins précoce après la greffe, par les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu et par les types de lésions constituées au niveau du greffon.

**Le rejet hyperaigu** survient dans les heures qui suivent la reperfusion de l'organe. Il est la conséquence de la présence d'allo-anticorps préformés dans le sang du patient suite à une transfusion, une greffe ou une grossesse. Ces anticorps sont majoritairement dirigés contre les molécules du CMH présents à la surface des cellules endothéliales du greffon. De nos jours, la recherche systématique d'allo-anticorps présents chez le receveur fait de ce type de rejet un évènement rare en transplantation clinique.

**Le rejet aigu** se développe chez l'homme durant le premier trimestre suivant la transplantation. Les mécanismes impliqués dans la destruction rapide de l'organe sont nombreux et font intervenir un grand nombre de cellules immunitaires spécialisées, telles que les lymphocytes T, macrophages et granulocytes (Vanrenterghem 1998). Jusqu'à la découverte des traitements immunosuppresseurs, il était la principale cause du rejet de greffe.

La découverte des drogues immunosuppressives a ainsi considérablement augmenté la survie à un an des greffons. Toutefois, malgré ces avancées, 3 à 5% des patients perdent encore leur transplant chaque année. Ce constat est lié au développement d'un processus indolent mais progressif : **le rejet chronique**. Contrairement au rejet aigu qui est la conséquence d'une réponse immunitaire exacerbée à l'encontre de l'organe étranger transplanté, le rejet chronique ne conduit pas à la destruction de l'organe mais à l'obstruction progressive de la lumière des vaisseaux sanguins, consécutive à la prolifération des cellules musculaires lisses (Shirwan 1999). Cette occlusion entraîne une mauvaise perfusion de l'organe, en altère ses fonctions et conduit à l'ischémie et, à terme, à la mort du greffon. Le développement du rejet chronique est un processus se déroulant en plusieurs étapes, qui peuvent être distinguées en fonction des types de cellules infiltrantes, de cytokines et de facteurs de

croissance impliqués dans les lésions tissulaires. L'implication du système immunitaire dans cette forme de rejet reste indispensable, du moins pour son initiation.

### b. La récurrence virale C

Comme tout cancer, le CHC traité peut récidiver. **La récurrence de l'infection** par le VHC après la transplantation hépatique est quasi universelle, avec 60 à 90% des patients qui développent des lésions d'hépatite C chronique sur le greffon (Balbi *et al.* 2009). L'évolution de la maladie hépatique est accélérée, avec un taux de cirrhose à 5 ans d'environ 10 à 30%. A l'heure actuelle, les raisons de ce développement accéléré restent encore peu connues (Balbi, *et al.* 2009). Cependant, les cellules immunitaires représentant un réservoir privilégié pour le VHC (Pham and Michalak 2008) (revue) pourraient être impliquées dans la récurrence de l'infection par le VHC après la transplantation hépatique (Castello, *et al.* 2010) (revue).

Le taux de récurrence est fonction du stade tumoral au moment du diagnostic et du type de traitement. La récurrence est liée d'une part à l'hépatopathie sous-jacente (virus B et C essentiellement) et d'autre part aux caractéristiques de la tumeur, notamment histologiques (invasion vasculaire néoplasique, nodule satellite,...). Contrairement à d'autres indications de transplantations hépatiques, telles que les maladies alcooliques ou les maladies cholestatiques du foie, la récurrence de l'infection au VHC, détectée par la présence d'ARN viral dans le sérum ou le greffon, est un phénomène universel (Rodriguez-Luna and Douglas 2004) (revue). Des observations cliniques indiquent que la progression histologique de l'hépatite C chronique est plus agressive après la transplantation hépatique, avec 10 à 25% de décès ou de re-transplantation dans les 5 ans post-TH. Tout comme la maladie primaire, la récurrence de la pathologie virale est souvent associée à une augmentation du taux des enzymes hépatiques telles que les ALAT. Cependant, 20 à 30% des patients en récurrence ont des taux normaux d'ALAT, ce qui pose le problème du diagnostic de la récurrence chez ces patients (Rodriguez-Luna and Douglas 2004) (revue).

A l'heure actuelle, aucune étude clinique ne s'est vraiment intéressée au traitement optimal à adopter pour éviter la récurrence de l'infection par le VHC après la TH. La question qui reste entière est « qui doit être traité ? » et « quand débiter le traitement ? ». Différentes approches ont été utilisées, telles que la thérapie anti-virale

(IFN- $\alpha$  pégylé/Ribavirine) avant la transplantation, pendant la transplantation et après la TH. Apparemment l'ensemble de ces approches semble donner des niveaux de clairance virale similaire (Rodriguez-Luna and Douglas 2004) (revue). Plus récemment, une étude réalisée sur 287 greffes hépatiques dont 42% pour cause de cirrhose C, a montré que le traitement anti-viral chez les patients transplantés est envisageable et ne semble pas induire d'effets sur le système immunitaire. Par ailleurs, de la même manière que dans la primo-infection, le meilleur taux de réponse sur la clairance virale a été obtenu avec la combinaison IFN- $\alpha$  pégylé/Ribavirine (38,9% de clairance) (Balbi, *et al.* 2009).

Le challenge le plus important pour les médecins est de faire la différence entre la récurrence de l'infection par le VHC et le rejet cellulaire aigu du greffon, dans le choix des traitements. La GVHD, bien que sévère et létal, n'est pas vraiment prise en compte, du fait de son incidence inférieure à 1% (Kohler *et al.* 2008). En effet, seuls 80 cas ont été reportés dans la littérature, jusqu'à ce jour. J'ai donc choisi de ne pas aborder cette complication dans ma thèse.

### 3. Les facteurs associés à la sévérité de la récurrence virale C

#### a. Rôle des T régulateurs dans la récurrence virale C

Nous avons montré une implication des cellules T régulatrices pendant la primo-infection du VHC, qui pourrait être en corrélation avec l'accélération de la récurrence virale sévère après transplantation hépatique. En effet, nous avons observé que 5 ans après la transplantation, l'expression des marqueurs associés à la sous-population CD4+CD25+, particulièrement le CD4, le CD25, OX40, GITR, et ICAM1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*) est significativement augmentée dans le foie avec récurrence hépatique ( $p < 0.05$  versus foie sain). Les marqueurs co-exprimés par les cellules Tr1 (CD49b, CD18) sont également surexprimés chez les patients présentant une récurrence sévère par rapport aux patients avec récurrence minime ou stable ( $p < 0.05$ ) (Carpentier *et al.* 2009) (Article 4 p120). Par ailleurs, la fréquence des Treg est déjà augmentée 1 an après la TH, chez les patients qui développeront une récurrence sévère de l'hépatite C. Ceci suggère que les Treg et particulièrement les Tr1 peuvent être prédictif de l'évolution de la récurrence virale C (Carpentier, *et al.* 2009) (Article 4 p120). Nous avons également montré que chez les patients infectés par le VHC, les analyses sériques de l'expression des gènes pouvaient

permettre d'évaluer l'expression des gènes hépatiques (corrélations significatives entre : le foie versus le sérum, le foie versus les PBMC, et le sérum versus les PBMC), et que donc ceci représentait une alternative non invasive pour le suivi de la progression de la pathologie hépatique au cours de l'infection chronique (Carpentier, *et al.* 2009\*) (Article 7 p128).

Jusqu'à présent, il n'avait pas été décrit d'implication des Treg dans la sévérité des récidives de l'hépatite C. En effet, il avait seulement été montré une augmentation de la fréquence des Treg dans la récidive, comme dans la primo-infection, sans faire de distinction selon le degré de sévérité de la récidive (Perrella *et al.* 2009).

Ces résultats suggèrent donc pour la première fois, que les cellules T régulatrices pourraient être impliquées dans la sévérité de la récidive de l'hépatite C suite à la transplantation hépatique. L'identification des sous-populations de cellules T régulatrices capables de moduler les lésions hépatiques, telles que les Tr1 qui sont augmentées au cours de la récidive sévère de l'hépatite C après la TH, pourrait donner des avancées significatives dans le but d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques, et pourrait être prédictif de la sévérité de la récidive. Des taux élevés d'IL-10 1 an après la transplantation peuvent aussi prédire la sévérité de la récidive (Carpentier, *et al.* 2009) (Article 4 p120).

L'ensemble de ces données est donc en faveur d'une implication spécifique des cellules T régulatrices dans l'évolution de la pathologie virale jusqu'au carcinome hépatocellulaire, les cellules T régulatrices pourraient en effet être impliquées dans le statut de chronicité de la pathologie, et dans la sévérité de la récidive après la transplantation hépatique.

#### b. Autres facteurs influençant la récidive virale C

Différents facteurs sont associés à la sévérité des récidives après la TH (Rodriguez-Luna and Douglas 2004) (revue), même si les facteurs prédictifs de survenue d'un nouveau CHC sont probablement identiques à ceux qui exposent à la survenue de la tumeur initiale (Fattovich, *et al.* 2004). Tout d'abord des facteurs liés au receveur, tels que : l'âge, le sexe féminin, la sévérité de la pathologie avant la TH, la race (Africains, Caucasiens, Américains et Asiatiques), la présence d'une co-infection (VHB ou VIH) et bien

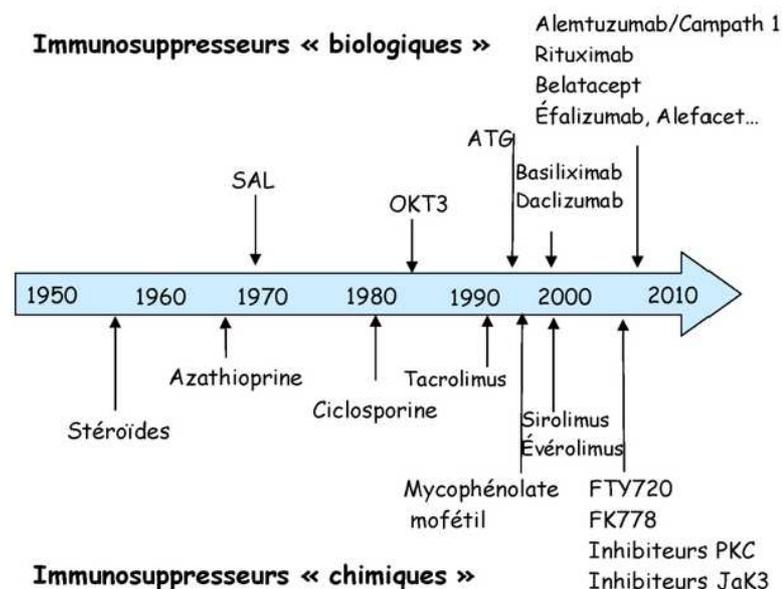
sûr le niveau de la réponse immunitaire T. L'âge du donneur peut également être un facteur aggravant de la récurrence. De manière intéressante, l'infection du donneur par le VHC n'est pas un facteur de mauvais pronostic. Par ailleurs, des facteurs viraux peuvent influencer la sévérité de la récurrence. Par exemple, il a été montré qu'un taux élevé de virus ( $>1\text{mEq/mL}$ ) au moment de la transplantation était prédictif d'un mauvais pronostic d'évolution de la pathologie. En effet, les patients avec un niveau d'ARN du VHC plus élevé avant la TH ont une mortalité et une perte du greffon 30% plus importante. Par contre, la virémie post transplantation ne semble pas être un facteur prédictif (Rodriguez-Luna and Douglas 2004) (revue). Un autre facteur potentiellement prédictif, qui reste controversé, est le génotype viral infectant le patient ; on sait que l'infection par le génotype 1b est de moins bon pronostic qu'une infection par un autre génotype. Il faut également prendre en compte le développement de mutants ou de quasi-espèces au cours du traitement anti-viral. Il a aussi été montré que la récurrence apparaissait plus précocement et était plus sévère chez les patients ayant reçu un transplant d'un donneur sain par rapport à ceux ayant reçu un greffon de donneurs cadavériques (Rodriguez-Luna and Douglas 2004) (revue).

D'autres facteurs sont également associés à la sévérité des récurrences et particulièrement l'immunosuppression administrée après la TH (voir Introduction - Chapitre T régulateurs et Immunosuppresseurs) (Rodriguez-Luna and Douglas 2004) (revue) ou la fréquence des Treg (Carpentier, *et al.* 2009\*; Carpentier, *et al.* 2009) (Article 4 p120 et Article 7 p128).

## LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET TRANSPLANTATION HEPATIQUE : ROLE DES IMMUNOSUPPESSEURS

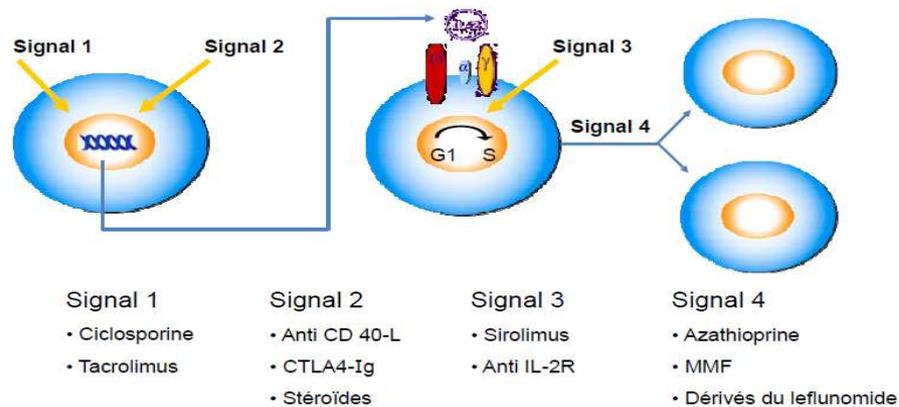
La transplantation hépatique est le traitement de choix des défaillances hépatiques aiguës et chroniques. La première tentative de transplantation d'un foie chez l'Homme a été réalisée en 1963 par Thomas Starzl, avec un taux de survie de 22 jours seulement, à cause d'embolies pulmonaires (Starzl *et al.* 1963). Aujourd'hui, la survie à court et long terme est de 85% à un an et 75% à 5 ans.

Le plus gros risque dans la transplantation d'organe est le rejet du greffon par le système immunitaire du receveur. Nous avons vu précédemment que les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ jouaient un rôle très important dans la tolérance des greffes (voir Introduction - Chapitre Lymphocytes T Régulateurs - C - 2). Cependant, leur rôle n'est pas suffisant et l'administration systématique de drogues immunosuppressives a permis d'augmenter la survie post-greffe. Dans les années 80, l'introduction de la cyclosporine A (CsA) comme immunosuppresseur a révolutionné la transplantation d'organes solides. Après la CsA, de nombreuses autres drogues ont été introduites (tacrolimus, mycophénolate mofétil, rapamycine), élargissant ainsi les possibilités d'immunosuppression (Figure 26).



**Figure 26 : Historique d'apparition des immunosuppresseurs.** L'introduction de la cyclosporine A a révolutionné la transplantation d'organes solides. L'immunosuppression classique après la transplantation hépatique est actuellement basé sur l'utilisation d'anti-calcineurines associée à des corticoïdes la première année +/- du mycophénolate mofétil (Calmus *et al.* 2009).

Le traitement immunosuppresseur doit être capable de bloquer les différentes étapes de l'allo-activation (phase de reconnaissance, de différenciation, de prolifération, d'infiltration et de destruction du greffon) qui conduisent à la cytotoxicité envers le greffon. Il comprend le plus souvent l'association de plusieurs médicaments aux mécanismes d'action différents et complémentaires ; et qui agissent à quatre niveaux de la réaction immunitaire : l'inhibition des 3 signaux d'activation lymphocytaire et de la prolifération sous jacente (Figure 27).



**Figure 27 : Schématisation des mécanismes d'action des drogues immunosuppressives.** Inhibition du signal 1 d'activation lymphocytaire (reconnaissance TCR-CMH/antigène) conduisant à la synthèse d'IL-2, par les inhibiteurs de calcineurine (Cyclosporine A et Tacrolimus). Les corticoïdes agissent sur le signal 2 d'activation donné par les molécules de costimulation. Inhibition de la voie de transduction de l'IL-2 (fixation à son récepteur et transduction en aval) par la rapamycine. La prolifération des lymphocytes est empêchée par les anti-métabolites (mycophénolate mofétil et azathioprine).

Chez la majorité des patients transplantés hépatiques, le rejet du greffon est prévenu par l'administration d'une combinaison de 2 ou 3 drogues immunosuppressives différentes. Les inhibiteurs de calcineurine, CsA et Tacrolimus (Tac) sont les principaux traitements utilisés (95%). Les corticoïdes sont également fréquemment utilisés au début de la transplantation, avec une réduction de la dose jusqu'à élimination dans les premiers mois. En plus de ces traitements conventionnels, des anti-métabolites sont fréquemment administrés : mycophénolate mofétil (MMF) et azathioprine (Aza) (Verdonk *et al.* 2007) (revue).

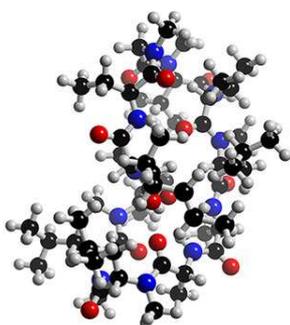
Le challenge le plus important dans l'immunosuppression après la transplantation, n'est pas de trouver des drogues plus puissantes et efficaces, mais des drogues moins nocives (effets secondaires). Dans l'avenir, le but serait de s'abstenir de leur utilisation en développant notamment des thérapies cellulaires utilisant les Treg, par exemple.

Dans ce chapitre seront détaillés les divers traitements immunosuppresseurs utilisés après la transplantation hépatique et leurs effets sur (i) la récurrence de l'infection par le VHC après la transplantation et sur (ii) la tolérance du greffon, par leur interaction avec les Treg.

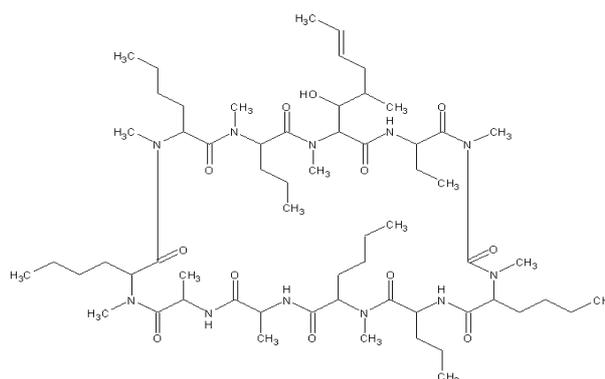
## A - La Cyclosporine A (CsA)

### 1. Découverte et utilisation de la cyclosporine A

Initialement isolée, en 1970, dans un échantillon de sol en Norvège et aux USA, la Cyclosporine A est la forme principale du médicament. Il s'agit d'un peptide cyclique de onze acides aminés (Figure 28) synthétisé par un champignon microscopique, *Tolypocladium inflatum gams*. Elle comporte des acides aminés dextrogyres, rarement rencontrés dans la nature (Borel 2002).



**Figure 28: Modélisation 3D et structure de la molécule de cyclosporine A.** Elle est composée de 11 résidus aminés disposés selon une structure cyclique fortement lipophile et très hydrophobe.



Les propriétés immunosuppressives de la cyclosporine ont été découvertes en 1972 par le laboratoire Sandoz (devenu Novartis) à Bâle, au cours d'une étude *in vitro* sur l'immunosuppression dirigée par Hartmann Stähelin. Les premiers essais cliniques en transplantation rénale ont été réalisés en 1978. L'efficacité de la cyclosporine A dans la prévention du rejet des allogreffes hépatiques a été démontrée en 1980, par Thomas Starzl, sur une patiente de 28 ans (Starzl *et al.* 1981). La Cyclosporine fut autorisée en 1983, avec enregistrement du Sandimmun en prophylaxie du rejet aiguë des greffes d'organes solides et GVHD, et en 1992, pour son utilisation dans les maladies auto-immunes.

Elle est aujourd'hui commercialisée sous forme de microémulsion (Neoral), permettant ainsi sa dissolution dans l'eau. Malgré ses propriétés immunosuppressives, la CsA n'a pas d'effet cytostatique spécifique.

La CsA est le premier immunosuppresseur découvert à avoir une activité sélective sur les lymphocytes T. Cet effet lui confère un rôle dans le traitement d'autres pathologies que les transplantations, telles que le syndrome néphrotique, les maladies de Crohn réfractaires, la colite ulcéreuse, l'arthrite rhumatoïde, ... Elle est utilisée en dermatologie pour le traitement des formes les plus sévères de psoriasis et de dermatite atopique. En rhumatologie elle est un traitement d'indication exceptionnelle de la polyarthrite rhumatoïde et de maladies apparentées. Elle est indiquée en ophtalmologie dans le traitement de certaines uvéites.

La cyclosporine A a fait l'objet d'études comme possible agent neuroprotecteur dans les traumatismes crâniens et a fait la preuve expérimentale de son efficacité pour réduire les lésions cérébrales associées à ces traumatismes, notamment par son action sur le pore de transition de perméabilité mitochondriale.

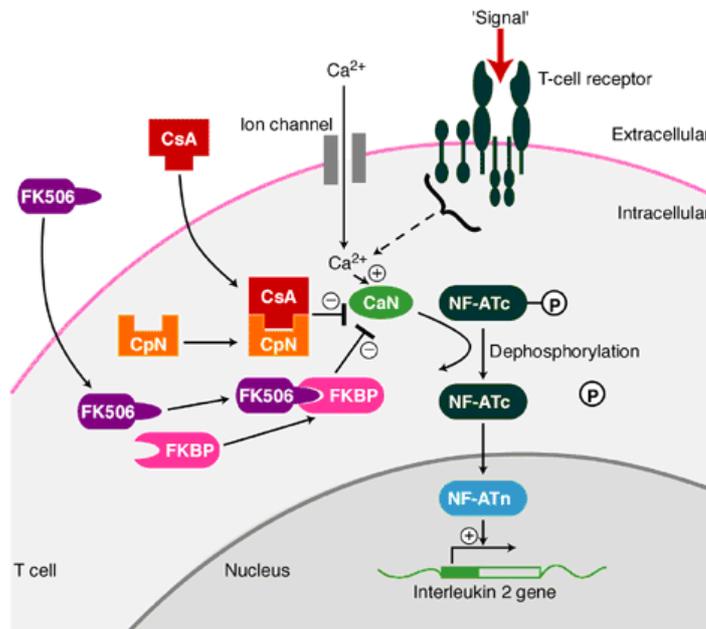
Le traitement par la cyclosporine est associé à un risque non négligeable de complications dont les plus documentées sont la néphrotoxicité, la neurotoxicité et les maladies opportunistes qui résultent de l'immunosuppression (infections, plus rarement cancers).

## 2. Mécanismes d'action de la CsA

La CsA est spécifique et sélective dans son activité immunosuppressive. Ses effets sont restreints aux cellules lymphoïdes et notamment les lymphocytes T et B. Son activité sur les lymphocytes T passe par une inactivation et une inhibition de leur prolifération à un stade précoce, en empêchant la transcription du gène de l'IL-2.

Pour cela, la CsA traverse la membrane cellulaire et se complexe dans le cytosol à une immunophiline, la cyclophiline A (CyP A). Les CyP ont une activité peptidyl propyl isomérase leur permettant de catalyser les liaisons peptidiques de la forme *trans* à la forme *cis*, au niveau des résidus de proline, facilitant ainsi la conformation des protéines. Le complexe CsA / CyP A se lie spécifiquement à la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase calcium calmoduline-dépendante, et inhibe ainsi son activité

phosphatasique (Fruman *et al.* 1992). La calcineurine devient alors incapable de déphosphoryler ses substrats d'aval tels que les protéines I $\kappa$ - $\beta$  et N-FAT, dont l'action est d'activer la transcription des gènes de cytokines telles que l'IL-2 ou l'IFN- $\gamma$ , indispensable pour une activation lymphocytaire complète. La CsA empêche ainsi le passage des LT en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Figure 29).



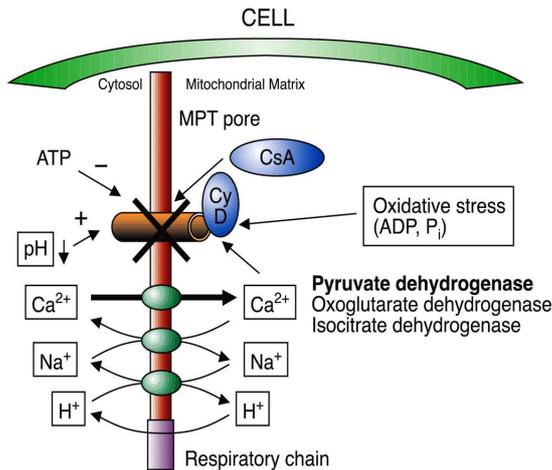
**Figure 29: Mécanisme d'action de la Cyclosporine A (CsA) et du Tacrolimus (FK506).** Dans le cytoplasme, la CsA se lie à une immunophiline, la cyclophiline A (CpN). Le complexe se lie alors à la calcineurine (CaN) et bloque son activité phosphatasique. La CaN ne peut donc pas déphosphoryler N-FAT et empêche donc sa translocation nucléaire et sa fixation sur le promoteur de l'IL-2. Le Tacrolimus (FK506) se lie, quant à lui à la FK506-binding protein (FKBP), formant un complexe qui inhibe la CaN, avec les mêmes conséquences que la CsA (Stepkowski 2000).

Certaines études ont cependant montré que la CsA n'inhibait pas complètement la sécrétion de l'IL-2, au vu des 20% d'IL-2 encore détectés dans les surnageants de culture de lymphocytes T activés. Par ailleurs, l'ajout exogène d'IL-2 dans les cultures en présence de CsA ne permet pas de restaurer la prolifération lymphocytaire, suggérant que l'inhibition de la synthèse de l'IL-2 ne doit pas être le seul mode d'action employé par la CsA pour inhiber les lymphocytes (Di Padova 1990).

Un autre mécanisme d'action a été proposé : la cyclosporine augmenterait la synthèse de TGF- $\beta$  qui a des propriétés immunosuppressives (Hojo *et al.* 1999).

La CsA a également un rôle de cytoprotection dans de nombreux types cellulaires et modèles animaux. Cette protection résulte de son action sur la mitochondrie, en empêchant l'ouverture du pore de transition mitochondriale, via une interaction avec la CyP D (Serkova *et al.* 2004). Ceci conduit à une inhibition du relargage du facteur pro-

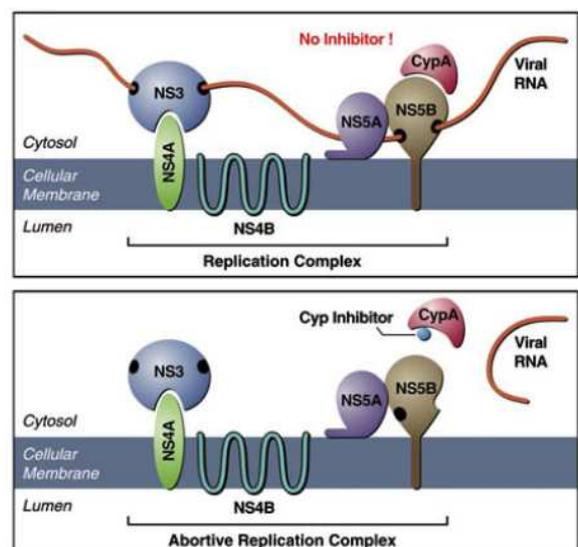
apoptotique, le cytochrome c, dans le cytoplasme. L'inhibition de l'ouverture du pore empêche également l'influx de molécules cytosoliques dans la matrice mitochondriale et ainsi la désorganisation de la membrane mitochondriale (Figure 30). L'effet cytoprotecteur de la CsA est également du à l'inhibition de la déphosphorylation de la protéine Bad médiée par la calcineurine (Waldmeier *et al.* 2003).



**Figure 30 : Inhibition de l'ouverture du pore de transition mitochondrial par la CsA.** La cyclophiline D (CypD) joue un rôle actif dans l'ouverture du pore de transition mitochondriale. Son inhibition par la CsA conduit à l'inhibition du relargage mitochondrial de facteurs pro-apoptotique et de l'influx de molécules cytosoliques, diminuant ainsi la cytotoxicité mitochondriale (Serkova, *et al.* 2004).

Il a également été montré que la CsA avait une activité anti-virale contre le VHC, par son interaction avec les cyclophilines A et B. En effet, les CyP A et B ont la capacité de se lier à la polymérase virale NS5B (Gaither *et al.* 2010) et à la protéine virale NS4A (Fernandes, *et al.* 2010), via leur poche isomérase. Ces CyP facilitent ainsi la liaison des protéines NS5B et NS4A à l'ARN viral, la formation du complexe de réplication et ainsi la transcription virale (Chatterji *et al.* 2010). Les inhibiteurs de cyclophilines, tels que la CsA, peuvent donc inhiber la réplication du VHC via différents mécanismes, et notamment en diminuant l'affinité de la polymérase NS5B à l'ARN viral ou en perturbant l'interaction entre la CyPA et NS5A (Gallay 2009) (revue) (Figure 31).

**Figure 31 : Mécanisme d'action anti-viral de la CsA.** La liaison de la Cyp A à NS5A permet à NS5A d'induire des modifications de conformation de NS5B, afin de permettre son recrutement au niveau du complexe de réplication. La Cyp A se lie également à NS5B afin de favoriser sa liaison à l'ARN viral. La présence d'inhibiteurs de Cyp, tels que la CsA, empêche les Cyp de se lier à NS5 A et NS5 B et inhibe ainsi la réplication virale. (Gallay 2009)



Le pliage ou dépliage des protéines, via les cyclophilines, joue un rôle central dans la physiopathologie de nombreuses maladies graves, via l'accumulation de plaques nuisibles dans certaines maladies neurodégénératives. Ce phénomène a également son importance dans les infections car il permet à un virus d'acquérir rapidement des mutations résistantes aux médicaments. Ceci appuie le rôle thérapeutique potentiel de la CsA dans de nombreuses pathologies et son effet anti-viral sur le VHC.

### 3. Les analogues de Cyclosporine A : NIM 811, Debio 025, SCY-635

La CsA a un effet anti-viral, cependant son activité immunosuppressive l'empêche d'être utilisée comme tel. Les chercheurs ont donc développé des analogues de la CsA anti-viraux mais non immunosuppresseurs : NIM 811, Debio 025 et SCY-635 (Figure 32).

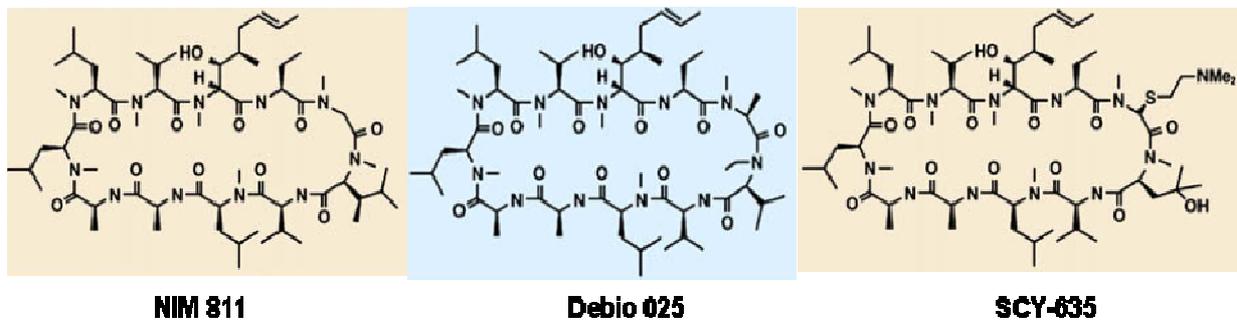


Figure 32 : Structure des analogues de CsA : NIM 811, Debio 025 et SCY-635. (Gallay 2009)

**NIM 811**, ou N-méthyl-4 isoleucine Cyclosporine, a été le premier inhibiteur de cyclophiline synthétisé à partir de la CsA et dépourvu d'activité immunosuppressive. Il se lie aux cyclophilines avec une plus forte affinité que la CsA (Gallay 2009) (revue). Comme la CsA, il a une activité anti-virale via son action sur les CyP et inhibe le pore de transition mitochondrial. Cependant, son complexe formé avec la CyP A n'inhibe pas l'activité de la calcineurine.

Le **Debio 025** a été le premier analogue de CsA à être testé dans des protocoles d'essais cliniques. Il vient de passer la phase II d'essais cliniques, en monothérapie ou en association avec l'IFN- $\alpha$ , et devrait être commercialisé par Novartis (Alisporivir) pour le traitement de l'hépatite C. Son activité anti-virale semble être plus importante que celle de la CsA (Paeshuyse, *et al.* 2006).

Plus récemment, le **SCY-635** a été développé par la société Scynexis. Il présente l'avantage de créer moins de résistances, par rapport au Debio 025. En effet, le VHC doit

subir des mutations dans deux protéines virales différentes afin de développer une résistance au SCY-635. La majorité des médicaments contre le VHC présents sur le marché et en cours de développement requièrent une seule mutation virale ciblée pour établir une résistance.

#### 4. Cyclosporine A : greffe de foie et récurrence de la cirrhose C

L'utilisation en routine de la CsA dans la transplantation hépatique a considérablement diminué l'incidence des rejets post-greffe.

La CsA a cependant de nombreux effets cytotoxiques dose-dépendants. Le plus important d'entre eux est la néphrotoxicité qui apparaît chez 20% des patients transplantés, à 5 ans post-greffe. Dans ce sens, il a récemment été montré que le remplacement de la CsA par le tacrolimus ou la rapamycine (Castroagudin *et al.* 2009) permettait d'améliorer la fonction rénale sans altérer la tolérance du greffon. Cette conversion permet également de réduire les risques cardiovasculaires observés avec la CsA (Beckebaum *et al.* 2009). Un autre effet observé est la neurotoxicité (Serkova, *et al.* 2004). Il est également retrouvé des problèmes d'hypertension, d'hyperlipidémie ou de diabète (Pillai and Levitsky 2009) (revue).

Une étude clinique réalisée chez 97 patients transplantés hépatiques a permis de montrer que la CsA était associée à un risque de rejet aigu plus fréquent, lorsqu'elle est comparée au tacrolimus (Rayhill *et al.* 2006). Plus récemment, l'administration de la CsA, en combinaison à un traitement anti-viral permettant l'éradication du virus, semble être associée au rejet chronique observé après la transplantation (Fernandez *et al.* 2009).

Au contraire, la CsA a été associée à des récurrences moins fréquentes de la fibrose C après la transplantation hépatique, lorsqu'elle est comparée au tacrolimus. En effet, une étude sur 68 patients a permis de montrer que l'évidence histologique d'une récurrence de l'hépatite C était présente chez 87% des patients sous CsA et 100% des patients sous tacrolimus. De plus, le risque de développement d'une fibrose de stade 3 ou 4, 3 ans après la transplantation, est respectivement de 46 et 80% (Villamil *et al.* 2006). Plus récemment, la CsA a été associée à des récurrences de cirrhose biliaire primaire moins fréquentes que le tacrolimus, même si ces récurrences n'ont pas d'impact sur la survie à long terme du patient (Montano-Loza *et al.* 2010). L'association de la CsA avec des récurrences moins sévères pourrait être expliquée par son effet anti-viral sur le VHC (Nakagawa *et al.* 2004).

Cependant, la CsA représente un facteur de risque indépendant dans le développement de cancer *de novo* (cancers de la peau, désordres lymphoprolifératifs, cancers gastriques et cancers pulmonaires), avec une apparition de cancers plus agressifs. L'apparition de cancer *de novo* est l'une des causes majeures de décès tardifs après la transplantation hépatique. L'incidence de l'apparition de ces cancers est de 3 % à 1 an et 33 % à 15 ans après la transplantation (Tjon *et al.* 2010).

#### 5. Cyclosporine A et T régulateurs

Dès 2005, une étude a montré, dans un modèle murin d'allogreffe cardiaque, que la CsA utilisée à forte dose (50 mg/kg), contrairement à une dose de 10 mg/kg, inhibe la génération de Treg après la transplantation (Kawai *et al.* 2005). L'effet de la CsA sur les Treg a également été analysé en dehors d'un contexte de transplantation. Ainsi, il a été observé que l'injection de CsA à des souris réduisait significativement le nombre de Treg CD4+CD25+ dans le sang périphérique, la rate et le thymus, et que l'activité suppressive de ces cellules était altérée (Wang *et al.* 2006). De même, l'administration de CsA, après une transplantation de moelle osseuse chez la souris, conduit à une inhibition de la fonction des Treg, une augmentation de la prolifération des T et de la sévérité de la GVHD ainsi qu'une diminution de la survie, en comparaison à l'administration de rapamycine ou de mycophénolate mofétil. La prolifération des Treg et l'expression de FoxP3 est également altérée en présence de CsA (Zeiser *et al.* 2006). Lim *et al.* ont confirmé, chez la souris, l'altération de l'expansion des Treg en présence de 40 ng/mL de CsA, mais n'ont pas observé de modification de leur activité suppressive à cette dose (Lim *et al.* 2007).

Chez l'Homme, il a été montré que l'administration d'inhibiteurs de calcineurine (CsA, tacrolimus), après une greffe rénale, diminuait la fréquence des Treg dans le sang, par rapport aux patients sous rapamycine (San Segundo *et al.* 2006). Cependant, même si toutes les études s'accordent sur le fait que la CsA a un effet délétère sur le nombre de Treg circulant après la transplantation (Korczak-Kowalska *et al.* 2007; San Segundo, *et al.* 2006), son effet sur l'activité suppressive des Treg humains reste controversé. En effet, certaines équipes ont observé une altération de l'activité régulatrice des Treg en présence d'inhibiteurs de calcineurine, alors que d'autres ont observé une activité similaire à celle observée chez les patients traités par la rapamycine (Lopez-Hoyos *et al.* 2009). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les marqueurs utilisés lors de la



La molécule est commercialisée par Astellas Pharma sous les noms de Prograf, Advagraf et Protopic. Le tacrolimus a été autorisé aux États-Unis par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1994, initialement pour la prévention du rejet des allogreffes hépatiques, puis son indication s'est étendue aux allogreffes de rein, de cœur, d'intestin grêle, de pancréas, de poumon, de trachée, de peau, de cornée, de moelle osseuse et de membre.

Outre ses propriétés immunosuppressives, le tacrolimus en pommade (Protopic) est indiqué dans le traitement de l'eczéma et de la dermatite atopique, où il présente l'avantage d'une meilleure tolérance locale par rapport aux stéroïdes, permettant son utilisation sur le visage, habituellement contre-indiquée. Cependant, une augmentation de la fréquence des cancers après application cutanée du tacrolimus est possible, ce qui est de nature à restreindre son utilisation dans cette indication. Le tacrolimus pourrait aussi avoir une efficacité dans le traitement de certaines formes de vitiligo chez les enfants, particulièrement sur le visage (Silverberg *et al.* 2004). Il est à l'étude pour le traitement des formes réfractaires de maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique (Benson *et al.* 2008).

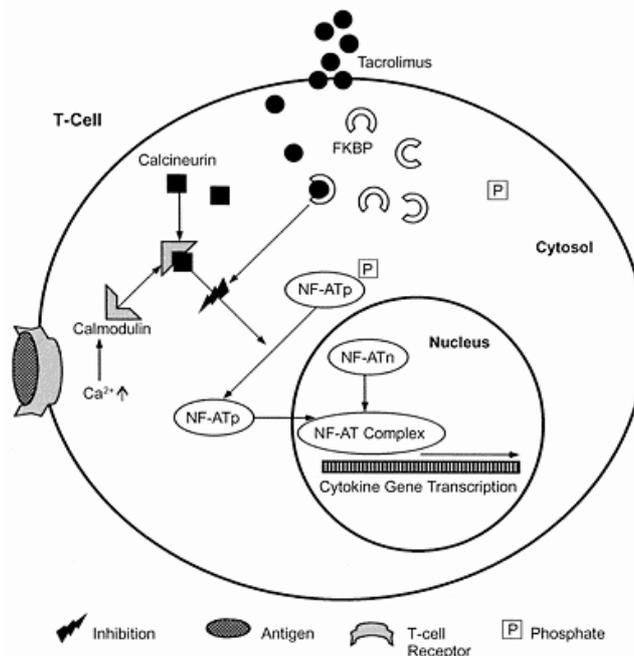
La néphrotoxicité du tacrolimus est similaire à celle de la cyclosporine. Parmi les effets secondaires importants, mentionons une neurotoxicité surtout observée en administration intraveineuse. De plus, le tacrolimus est diabétogène chez 17 à 20% des patients traités. Cette incidence est plus élevée que celle observée avec la cyclosporine (7% des cas). Contrairement à la cyclosporine, le tacrolimus ne cause pas d'hyperplasie gingivale, d'hypertrichose, et il est associé à un taux de cholestérol sanguin inférieur de 20% en moyenne à celui observé chez les patients traités avec la cyclosporine (Peters *et al.* 1993) (revue).

Le tacrolimus est très hydrophobe, lui permettant de traverser la barrière hémato-encéphalique ainsi que la barrière placentaire. Par ailleurs, tératogène chez certaines espèces animales, son utilisation pendant la grossesse est contre-indiquée.

## 2. Mécanismes d'action du Tacrolimus

Le mode d'action du tacrolimus est similaire à celui de la CsA. Dans le cytosol des lymphocytes T, il se lie à l'immunophiline FKBP-12 (*FK-506 binding protein*) pour former un complexe à 5 sous-unités (une protéine de liaison FKBP-12, le tacrolimus, la calmoduline et

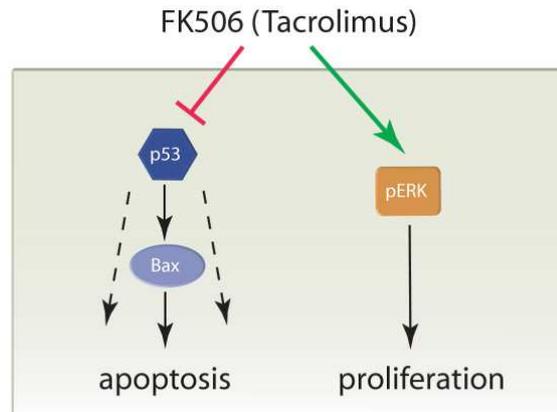
les calcineurines A et B) dont le rôle est d'inhiber l'activité phosphatase de la calcineurine (Fruman, *et al.* 1992). Cette inhibition conduit au blocage de la prolifération des cellules T et de la transcription du gène de l'IL-2, conduisant à une réduction marquée de l'activité des lymphocytes T effecteurs (Figure 29 et 34).



**Figure 34 : Mode d'action du Tacrolimus.** Le Tacrolimus se lie dans le cytosol de la cellule à une immunophiline, la FKBP (FK Binding Protein). Le complexe tacrolimus / FKBP inhibe l'activité phosphatase de la calcineurine. N-FAT ne pouvant ainsi pas être déphosphorylé, il ne peut pas activer la transcription de l'IL-2. (Lazarous and Kerdel 2002)

Outre ses capacités immunosuppressives, les effets carcinogènes du tacrolimus ont été étudiés. Dans un report de cas de carcinome squameux, il a été suggéré que le tacrolimus pourrait inhiber l'induction de P53 suite à un stimulus apoptotique et à l'inverse, il pourrait favoriser la phosphorylation de Erk et ainsi la survie cellulaire (Becker *et al.* 2006). En parallèle de cette étude sur les cellules épithéliales, il a été observé, à la fois *in vitro* et chez des patients ayant reçu une greffe cardiaque, que l'inhibition de la calcineurine par le tacrolimus ou la CsA conduisait à une inhibition de l'apoptose des lymphocytes T et B, de manière p53 dépendante (Boldt *et al.* 2006). Par ailleurs, le lien direct entre le tacrolimus et les protéines de la famille Bcl-2 est supporté par le fait que la FKBP38, immunophiline mitochondriale qui inhibe la calcineurine en présence du tacrolimus, se lie à la protéine Bcl-2 et la séquestre dans la membrane mitochondriale pour favoriser son effet anti-apoptotique (Shirane and Nakayama 2003). L'effet du tacrolimus sur les membres de la famille Bcl-2 expliquerait le rôle joué par cet

immunosuppresseur dans l'apparition de cancers *de novo* après la transplantation hépatique (Figure 35).



**Figure 35 : Hypothèse sur le mode d'action du tacrolimus dans la transformation oncogénique.** Le tacrolimus inhiberait l'induction de p53 suite à un stimulus apoptotique. p53 régule directement la transcription de Bax, facteur pro-apoptotique de la famille Bcl-2, son inhibition conduit donc à une inhibition de l'apoptose. En parallèle, le tacrolimus favoriserait la phosphorylation des protéines Erk, qui jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire. (Becker, *et al.* 2006)

### 3. Tacrolimus : greffes hépatiques et récurrence de la cirrhose C

Le tacrolimus est un immunosuppresseur de plus en plus utilisé en transplantation d'organes. Il constitue une alternative à la cyclosporine particulièrement dans les cas de rejet non contrôlé par la cyclosporine. Bien que son mode d'action soit similaire à celui de la cyclosporine A, son efficacité est supérieure dans la prévention du rejet aigu. En effet, des études multicentriques (aussi bien en greffe rénale qu'en greffe hépatique) ont démontré que le tacrolimus comparé à la cyclosporine, permet de réduire significativement les épisodes de rejet. Le traitement du rejet de première ligne fait donc appel à l'augmentation des doses de tacrolimus ou à la conversion à ce médicament chez les patients sous cyclosporine (Calmus 2009) (revue). Par ailleurs, la conversion de la CsA au tacrolimus permet de diminuer les risques cardiovasculaires et de ralentir l'apparition des problèmes rénaux après la transplantation hépatique (Beckebaum, *et al.* 2009).

Villamil *et al.* avaient montré que la CsA était associée à des récurrences de l'hépatite C moins sévères que le tacrolimus (Villamil, *et al.* 2006). Plus récemment, il a été observé que la récurrence du CHC après la transplantation était plus fréquente chez les patients sous tacrolimus que ceux sous cyclosporine (20% vs 11%). De plus, une forte dose de tacrolimus ou une administration à long terme sont des facteurs prédictifs indépendants de récurrences (Vivarelli *et al.* 2008). L'effet du tacrolimus sur la récurrence après TH a également été comparé à celui d'autres immunosuppresseurs. De la même façon, la monothérapie

tacrolimus est associée à une progression de la fibrose plus rapide que la trithérapie tac / aza / corticoïdes (Manousou *et al.* 2009). Par ailleurs, une étude chez 62 patients a permis de montrer une absence de récurrence à 3 ans chez 86% des patients sous rapamycine contre seulement 56% des patients recevant du tacrolimus (Vivarelli *et al.* 2010).

#### 4. Tacrolimus et T régulateurs

Dès 2006, une réduction du nombre de cellules T CD25+ a été observée chez des patients traités par le tacrolimus pour une dermatite atopique (Caproni *et al.* 2006). De même, après la transplantation hépatique, le nombre de Treg est significativement plus faible chez les patients recevant une bithérapie tacrolimus / mycophénolate mofétil (0,7%) que chez les patients sous rapamycine seule (1,3%) (Levitsky *et al.* 2009). L'effet du tacrolimus sur les Treg serait dépendant de la dose administrée. Il a, en effet, été observé qu'une faible dose de tacrolimus (3 à 7 ng/mL) permettait l'induction et l'expansion en périphérie de Treg CD4+CD25+FoxP3+ fonctionnels et leur accumulation au sein de l'organe greffé. *In vitro*, cette dose permet l'induction de l'expression de FoxP3 dans les MLR, au contraire d'une forte dose. Ces résultats pourraient expliquer l'effet bénéfique d'une faible dose de tacrolimus, par rapport à une concentration standard, sur la survie à long terme du greffon (Wang *et al.* 2009). Plus récemment, il a été observé que le tacrolimus augmentait la prolifération des Treg murins et humains *in vitro* (Kogina *et al.* 2009). Par ailleurs, le tacrolimus n'affecte pas l'induction, l'expansion et la fonction des Treg induites par les globulines anti-thymocytes de lapin (*rabbit anti-thymocyte globulins (rATG)*) (Sewgobind *et al.* 2010).

### C - La Rapamycine (Sirolimus)

#### 1. Découverte et utilisation de la Rapamycine

La rapamycine (Rapa), également appelée sirolimus, a été isolée en 1975 à partir d'une culture de bactéries *Streptomyces hygroscopicus* dans les sols de l'île de Pâques (Rapa Nui). Dans un premier temps, la rapamycine a été considérée comme un antibiotique de type macrolide. La Rapamycine est une molécule cyclique structurellement semblable au Tacrolimus (Figure 36).

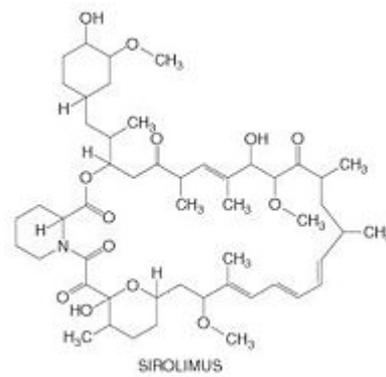


Figure 36 : Structure de la Rapamycine.

Ses effets immunosuppresseurs ont été décrits dès 1977 (Martel *et al.* 1977). L'utilisation de la Rapamycine en transplantation est autorisée en France depuis 2002 (Rapamune). Cet immunosuppresseur n'a pas d'effets secondaires vasculaires et n'est pas néphrotoxique, contrairement à la CsA.

Outre son action en tant qu'immunosuppresseur, la rapamycine semble allonger significativement la durée de vie des souris âgées. Les chercheurs ont donné de la rapamycine en complément alimentaire à des souris âgées de 20 mois (l'équivalent de 60 ans chez l'homme), et ont comparé leur durée de vie à celle de souris du même âge, nourries normalement. Le traitement a augmenté la durée de vie moyenne des mâles de 9 % et celle des femelles de 14 %, par rapport aux souris non traitées. Il semblerait que l'inhibition de mTOR retarderait l'apparition des cancers et des maladies liées à l'âge. La rapamycine serait ainsi le premier médicament capable d'allonger la durée de vie de mammifères (Harrison *et al.* 2009). Cette découverte pourrait permettre de développer des analogues de la rapamycine dépourvus d'effets secondaires et d'effets immunosuppresseurs, dans l'espoir de lutter contre les maladies liées à l'âge.

En oncologie, la rapamycine et des molécules apparentées exercent un effet anti-prolifératif *in vitro* et *in vivo* sur un très grand nombre de lignées cellulaires tumorales. Des essais de phase II ont mis en évidence une activité clinique encourageante de la rapamycine dans des cancers du sein et du rein avancés. En pathologie coronarienne, le sirolimus est utilisé dans certains stents actifs, dispositif métallique implanté dans des artères lors d'une angioplastie pour empêcher le resserrement (resténose) de celles-ci, diminuant ainsi fortement la prolifération cellulaire qui est responsable de cette resténose. Enfin, la rapamycine est en cours d'essai dans des pathologies diverses au

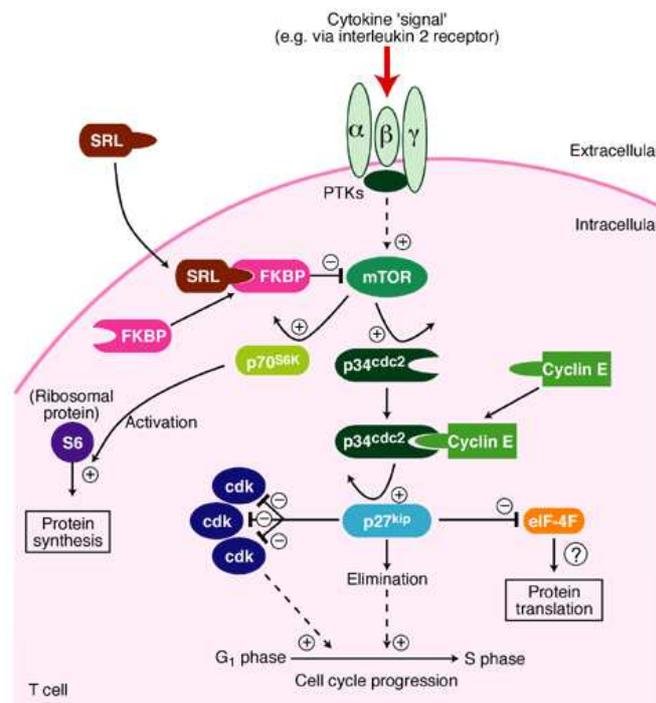
cours desquelles les anomalies de prolifération tiennent un rôle central (Pallet *et al.* 2006) (revue).

Sa grande liposolubilité lui confère des propriétés de fixation aux tissus ainsi que la possibilité de passer les barrières hémato-encéphalique et placentaire.

## 2. Mécanismes d'action de la rapamycine

Bien que le sirolimus ait un nom similaire au tacrolimus, son mode d'action est différent. En effet, tout comme le tacrolimus, la Rapa se complexe dans le cytosol à la FKBP12, mais ce complexe inhibe la sérine thréonine kinase, mTOR.

C'est l'étude des propriétés cellulaires de la rapamycine qui a conduit à la découverte du rôle fondamental de cette protéine kinase dans la prolifération cellulaire. Initialement découvert dans la levure et dénommé TOR puis retrouvée chez les mammifères (mTOR), mTOR est un contrôleur central de la croissance et de la prolifération cellulaire en réponse aux facteurs de croissance ou aux nutriments. L'activation de mTOR permet à la cellule d'entrer dans le cycle cellulaire en régulant la machinerie traductionnelle, via l'activation de la protéine kinase p70 S6 (p70S6K) et p34<sup>cdc2</sup> et l'inhibition de 4E-BP1 (séquestrant eIF-4) (Pallet, *et al.* 2006) (revue) (Figure 37).



**Figure 37 : Mécanismes d'action de la Rapamycine.** La rapamycine se lie dans le cytosol à la FK Binding Protein, et ce complexe inhibe la protéine mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*). mTOR est impliquée dans la progression des cellules dans le cycle cellulaire par son action sur la p34<sup>cdc2</sup>, qui permet de libérer les CDK de leur répresseur p27. (Stepkowski 2000)

Dans les lymphocytes, mTOR est impliquée dans la transduction du signal d'activation et de prolifération, induit par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur de haute affinité (signal 3 d'activation lymphocytaire) (Figure 37). L'inhibition de mTOR par la rapamycine conduit alors à un blocage des lymphocytes T et B en transition G1/S du cycle cellulaire. Le complexe FKBP12 / Rapa inhibe également la p70S6K qui est essentielle à la phosphorylation ribosomale et à la dissociation de p27 (inhibiteur du cycle cellulaire) du complexe cycline D / CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) (Figure 37) (Calvo *et al.* 1992).

*In vitro*, il a été montré que la rapamycine bloque la prolifération calcium-dépendante (Almawi *et al.* 1999; MacMillan and McCarron 2009), mais contrairement à la CsA et au Tac, elle n'altère pas la transcription des cytokines.

### 3. Rapamycine : greffe du foie et récurrence de la cirrhose C

La rapamycine a été utilisée pour réduire ou supprimer l'utilisation des anti-calcineurines après la transplantation hépatique. Dans ces essais, une amélioration de la fonction rénale a été constatée dans la majorité des cas. Le taux de rejet était minime, allant de 0 à 5 % et une interruption complète des anti-calcineurines a été obtenue chez 50 à 100 % des patients. Cependant, l'apparition d'effets indésirables propres aux inhibiteurs de mTOR, signes cutanés et problèmes pulmonaires, ont exclu 30 à 50% des patients de l'étude (Calmus 2009) (revue). Chez 31 patients présentant une néphrotoxicité associée aux inhibiteurs de calcineurine, le switch vers une monothérapie rapamycine (8 à 10 ng/mL) a permis de stopper les atteintes rénales, tout en préservant la survie du greffon (Di Benedetto *et al.* 2009). Cet avantage de la conversion à la rapamycine reste controversé car elle ne donnerait pas de bénéfice supplémentaire sur l'amélioration de la fonction rénale à long terme, par rapport à une diminution des doses d'anti-calcineurines (DuBay *et al.* 2008).

Une étude clinique réalisée chez 230 patients a permis de montrer que les patients sous rapamycine présentaient moins de récurrences et un meilleur taux de survie à 1 an, 3 ans et 5 ans post-transplantation, que les patients sous tacrolimus / mycophénolate mofétil (Chinnakotla *et al.* 2009). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les patients sous rapamycine présentent une diminution significative de l'ARN du VHC (Wagner *et al.* 2010). Par ailleurs, après inoculation de cellules de CHC (HepG2) dans le foie de souris, il a

été observé une diminution significative de la masse tumorale chez les souris recevant de la rapamycine (352 mg), par rapport à celles recevant du tacrolimus ou sans traitement (683 mg / 675 mg) (Zhang *et al.* 2009). Ces observations cliniques ont pu être expliquées par l'effet anti-tumoral direct de la rapamycine. En effet, une étude réalisée chez la souris a permis de montrer que la rapamycine inhibe la croissance tumorale hépatique, à la fois *in vitro* et *in vivo*, sans induction d'apoptose. Cette drogue empêche également la progression du CHC en inhibant la formation de métastases, en partie via une diminution de la synthèse du VEGF (Wang *et al.* 2009\*). Plus récemment, il a été montré que la rapamycine diminuait la prolifération et la migration de deux lignées de CHC (PLC5 et HuH7), de manière dose dépendante et ce par une inhibition de la phosphorylation d'Akt (Shirouzu *et al.* 2010).

#### 4. Rapamycine et T régulateurs

Les premières études de l'effet de la rapamycine sur les Treg ont été initiées par l'équipe de Roncarolo dès 2005. Il a été observé qu'une dose de 100 nM de rapamycine, en présence d'IL-2 à forte dose, permettait d'induire la prolifération des Treg murins, jusqu'à 3 semaines, et que ces Treg en expansion avaient une activité suppressive plus importante que les Treg non amplifiés ou fraîchement isolés (Battaglia *et al.* 2005). Cet effet prolifératif de la rapamycine sur les Treg murins a été confirmé chez l'Homme, à la fois pour les Treg issus de donneurs sains ou de patients souffrant de diabète de type 1 (Battaglia *et al.* 2006). Dans la greffe hépatique, l'effet pro-prolifératif de la rapamycine sur les Treg a été montré dans un modèle murin de greffe syngénique du foie (Lu *et al.* 2010), et comparativement à des souris traités avec du tacrolimus (6,8% de Treg vs 1,7%) (Xu *et al.* 2010). Chez l'Homme, dans un groupe de 18 patients ayant subi une greffe rénale, il a été montré que la conversion des inhibiteurs de calcineurine (CsA, Tac) à la rapamycine conduisait à une augmentation significative du nombre de Treg CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> (16 versus 32 cellules / mm<sup>3</sup>) (San Segundo *et al.* 2010). Il a cependant été suggéré que l'expansion des Treg en présence de rapamycine ne correspondait pas à une prolifération sélective des cellules FoxP3<sup>+</sup>, mais serait plutôt le résultat d'une différenciation des CD4+CD25<sup>-</sup> en iTreg (Kopf *et al.* 2007; Long and Buckner 2008). Cette conversion se ferait par ailleurs avec l'aide des cellules B, utilisées comme CPA (Chen *et al.* 2010). En effet, l'expansion des Treg ne serait pas une conséquence

directe de l'effet des inhibiteurs de mTOR sur les cellules T mais un effet sur les DC (Lopez-Hoyos, *et al.* 2009). Plus récemment, il a été montré que la Rapa et la CsA inhibaient tous les deux l'induction de Treg CD4+CD25+ *in vitro*. Cependant, contrairement à la CsA, la Rapa préserve voire augmente la fonction suppressive de ces Treg. En effet, la Rapa inhibe uniquement l'induction des Treg GITR+, où le GITR joue un rôle négatif dans leur activité suppressive (Bocian *et al.* 2010).

L'effet potentialisateur de la Rapa sur les Treg, par rapport à son effet pro-apoptotique sur les T conventionnels, a été expliqué par la voie d'activation lymphocytaire T différenciellement utilisée par les Treg. En effet, l'activation des Treg conduit à la phosphorylation de STAT5 et non de la voie Pi3K / Akt / mTOR (Zeiser *et al.* 2008). Akt serait d'ailleurs un puissant répresseur de la différenciation des cellules en Treg dans le thymus et en périphérie (Haxhinasto *et al.* 2008). Par ailleurs, en présence de rapamycine, les Treg surexpriment des facteurs anti-apoptotiques et présentent une plus forte expression de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), inhibiteur de la voie Pi3K / Akt / mTOR (Strauss *et al.* 2009). Une délétion de cet inhibiteur conduit à une augmentation de la sensibilité des Treg à la rapamycine (Zeiser, *et al.* 2008).

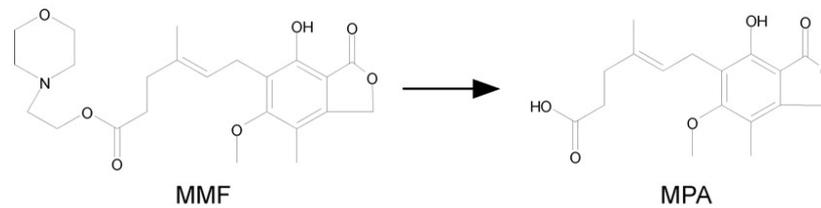
*In vivo*, il a été observé chez les patients recevant du sirolimus après une greffe rénale, que le nombre de Treg circulant était augmenté de quatre fois par rapport aux patients sous CsA (Ruggenti *et al.* 2007), tacrolimus ou MMF (Hendriks *et al.* 2009). Par ailleurs, ces Treg présenteraient un phénotype mémoire (Hendriks, *et al.* 2009). Plus récemment, une augmentation de la fréquence des Treg a également été retrouvée au cours du traitement par la rapamycine de patients ayant subi une transplantation des poumons (Lange *et al.* 2010).

## **D - Le Mycophénolate mofétil (MMF)**

### *1. Découverte et utilisation du mycophénolate mofétil*

Le Mycophenolate mofétil (MMF), ou 2 - morpholinoethyl (E) - 6 - (1,3-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl) - 4 - méthyl - 4 - hexenoate, est extrait du champignon *Penicillium stoloniferum*. Le MMF est une pro-drogue inactive, métabolisée dans le foie en ester de l'acide mycophénolique (MPA) (Figure 38), qui inhibe

la synthèse des bases puriques de l'ADN. Cet immunosuppresseur a initialement été commercialisé sous sa forme de pro-drogue, le MMF, afin de favoriser la prise orale. Plus récemment, la forme active MPA a été commercialisée par Roche (CellCept) et la forme mycophénolate sodium par Novartis (Myfortic).



**Figure 38 : Métabolisme du Mycophénolate mofetil.** Le MMF est métabolisé dans le foie en acide mycophénolique (MPA), par une hydrolyse des esters. (Miles *et al.* 2005)

Malgré son coût 15 fois plus élevé, ce nouveau produit semi-synthétique a progressivement remplacé l'azathioprine dans le traitement des rejets post-greffe, grâce à ses effets secondaires moins importants. Il agit à un stade tardif de la prolifération T. En revanche, son action sur les cellules B et la formation des anticorps serait plus importante, d'où son activité plus grande pour prévenir le rejet aigu. Il agirait également sur les molécules d'adhésion entre lymphocytes activés et cellules cibles, inhibant le recrutement de lymphocytes et macrophages au niveau du greffon, suggérant qu'il puisse être efficace non seulement dans la prévention mais également dans le traitement d'un rejet aigu.

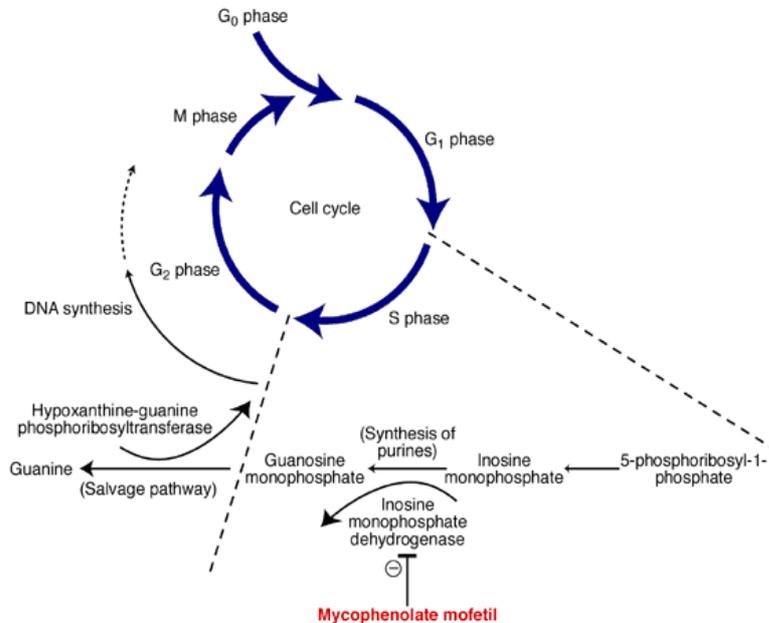
En général, le MMF est utilisé pour la prévention du rejet d'organes chez l'adulte et dans les transplantations rénales, hépatiques et cardiaques chez l'enfant de plus de 2 ans. Le rôle exact du MMF, par rapport à l'Aza, n'est pas vraiment établi. Mais dans l'immunosuppression à long terme, le MMF permettrait de s'affranchir de l'utilisation des inhibiteurs de calcineurine et des stéroïdes.

Le MMF est de plus en plus utilisé comme traitement des maladies auto-immunes, tels que le psoriasis, le SLE, ...

## 2. Mécanismes d'action du Mycophénolate mofétile

Au cours de l'activation cellulaire T, le niveau de l'Inosine MonoPhosphate DéHydrogénase (IMPDH) est multiplié par 10. Cette enzyme permet de convertir l'inosine monophosphate en guanosine monophosphate, intervenant dans la synthèse *de novo* des

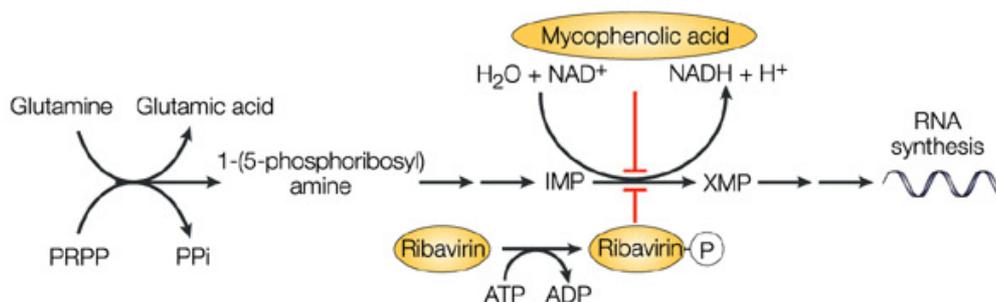
purines et permettant la synthèse d'ADN. Le MMF est converti en MPA dans le foie, par une hydrolyse des esters, et inhibe ainsi de manière réversible la IMPDH, au cours de la phase S du cycle cellulaire (Stepkowski 2000) (Figure 39).



**Figure 39: Mécanisme d'action du mycophénolate mofétil.** Le MMF inhibe l'inosine monophosphate déhydrogénase (IMPDH), enzyme contrôlant la synthèse de la guanine monophosphate, intervenant dans la voie de synthèse *de novo* des purines, utilisée par les lymphocytes T et B (Stepkowski 2000).

Son mode d'action est réversible et sélectif dans l'inhibition de la synthèse *de novo* des purines. Cependant, certaines cellules échappent à son action grâce à l'utilisation d'une voie de sauvetage, où la guanine est convertie en guanine monophosphate par l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (Figure 39).

La capacité à inhiber l'IMPDH confère au MMF une activité anti-virale (Figure 40). En effet, l'inosine monophosphate ne peut pas être convertie en xanthosine monophosphate, ce qui stoppe la synthèse de GTP (*Guanosine TriPhosphate*) et d'ARN, essentielle à la réplication virale (De Clercq 2004) (revue).



**Figure 40 : Action anti-virale du MMF.** Le MMF, par son composé actif le MPA, bloque la inosine monophosphate déhydrogénase (IMPDH), inhibant ainsi la conversion de l'inosine monophosphate en xanthosine monophosphate, base nécessaire à la synthèse d'ARN. (De Clercq 2004)

### 3. Mycophénolate mofétil : greffes du foie et récurrence du CHC

Chez les malades ayant des effets indésirables des anti-calcineurines, l'adjonction de mycophénolate, combinée à la réduction des doses d'anti-calcineurines voire à leur arrêt, pourrait permettre de stabiliser voire de faire régresser certains effets secondaires tels qu'une altération de la fonction rénale ou une hypertension artérielle (Calmus 2009) (revue). Dans les essais qui ont porté sur le remplacement partiel ou complet des inhibiteurs de calcineurine par le MMF, l'amélioration de la fonction rénale a été constatée dans la majorité des cas, mais au prix d'un risque de rejet plus important. Cependant, dans une étude française, où la dose d'anti-calcineurine était réduite de 50% avec un ajout de MMF, il a été montré une amélioration significative de la fonction rénale, sans épisode de rejet (Duvoux 2001). Ces données restent controversées dans la mesure où, de nombreuses études ont montré une amélioration de la fonction rénale sans impact sur le rejet aigu ou chronique, après réduction ou élimination complète des inhibiteurs de calcineurine (Barrera Pulido *et al.* 2008; Creput *et al.* 2007). Par ailleurs, l'administration de MMF dans le cas de rejets aigus résistants aux stéroïdes, permet de restaurer une tolérance du greffon à long terme, au vu de l'absence de rejet chronique observé chez les 16 patients greffés (Aw *et al.* 2008). Dans le même sens, une étude plus récente chez 59 patients convertis à une monothérapie MMF, a montré qu'ils ne présentaient aucun signe de rejet, un an après la conversion (Kamphues *et al.* 2009). L'administration de MMF, associée à une réduction des doses de CsA, permet également de réduire les risques cardiovasculaires liés aux thérapies anti-calcineurines (Beckebaum *et al.* 2009\*).

Les effets d'une bithérapie CsA / MMF ont été comparés à ceux de la combinaison CsA / Aza, sur la sévérité de la récurrence de l'hépatite C après la transplantation. Il semblerait que le MMF réduirait le délai d'apparition de la récurrence (50 vs 35 semaines) et la sévérité de celle-ci (grade 1,5 vs 2,2). Cependant cet effet est inversé après 6 mois de thérapie anti-virale classique ; le MMF augmenterait les propriétés anti-virales et favoriserait ainsi à long terme la progression de la fibrose (Kornberg *et al.* 2005). Ces résultats ont été confirmés en 2007 par la même équipe, où il a été observé une progression de la fibrose chez 66% des patients, suite à l'ajout de MMF à la thérapie CsA (Kornberg *et al.* 2007). Ces données restent cependant controversées. En effet, 2 ans après l'administration de MMF à des patients sous CsA, l'évolution de la récurrence de la

fibrose hépatique semble être stabilisée, en comparaison aux patients restés sous monothérapie CsA (Bahra *et al.* 2005).

#### 4. Mycophénolate mofétil et T régulateurs

Dès 2001, il a été observé, dans un modèle murin de transplantation du pancréas, que le MMF induisait une augmentation de la fréquence des Treg CD4+CD25+ dans la rate et les ganglions lymphatiques drainants le transplant. Cette augmentation serait due à l'effet tolérogène du MMF sur les DC (inhibition de leur maturation) (Gregori *et al.* 2001). Toujours dans un modèle murin, il a été montré que l'injection de 40 ng/mL de MPA préservait la prolifération et l'activité des Treg (Lim, *et al.* 2007). Chez l'Homme, la conversion des inhibiteurs de calcineurine en MMF, après la transplantation hépatique, conduit à une augmentation du pourcentage de cellules CD4+CD25+FoxP3+ de 125%, dans les 6 mois. Le MMF serait donc capable de réverser l'effet délétère des anti-calcineurines sur les Treg (Demirkiran *et al.* 2009). L'effet bénéfique du MMF sur la fréquence des Treg a également été observé après la transplantation rénale, en comparaison à des patients recevant de la rapamycine combinée à de faibles doses d'inhibiteurs de calcineurine (Fourtounas *et al.* 2010). Par ailleurs, le MPA inhibe *in vitro* la transcription de l'IL-17, grâce à sa capacité à empêcher la production d'IL-1 $\beta$  par les monocytes et de TIM-1 par les cellules CD4+, deux régulateurs importants de la différenciation Th17. De cette manière, le MMF influencerait favorablement la balance Treg / Th17 (Abadja *et al.* 2009).

## E - Les Corticoïdes

### 1. Découverte et utilisation des corticoïdes

Les corticostéroïdes ou corticoïdes sont des hormones stéroïdiennes naturelles sécrétées par le cortex de la glande surrénale. Cette partie superficielle de la glande produit les glucocorticoïdes (cortisone, hydrocortisone, prednisone) qui ont une action sur le métabolisme protidique et glucidique. Les corticoïdes jouent aussi et surtout un rôle dans les défenses immunitaires où ils diminuent l'inflammation (d'où le terme d'anti-inflammatoires stéroïdiens) et tendent à augmenter la destruction des lymphocytes qui mûrissent dans le thymus (action immunosuppressive). Cependant, l'effet des corticoïdes naturels est bien inférieur à celui des corticoïdes de synthèse, 4 à 10 fois plus puissants.

Les corticoïdes de synthèse sont proches des hormones naturelles mais plus puissantes et plus spécifiques. Isolés à la fin des années 1930, les corticoïdes ont été utilisés pour la première fois avec succès pour traiter une femme atteinte d'une maladie rhumatismale grave, à la fin des années 1940. Depuis, la recherche a fait de gros progrès et les laboratoires ont développé, à partir d'une version de synthèse, une multitude de produits, à action générale ou locale : comprimés, solutions injectables, crèmes, pommades, aérosols (asthme), collyres, ...

Les corticoïdes sont utilisés dans différents domaines thérapeutiques. Pour leur action anti-inflammatoire, dans les maladies inflammatoires chroniques (polyarthrites, lupus; allergies graves, asthme), pour leur action immunosuppressive dans les transplantations d'organes.

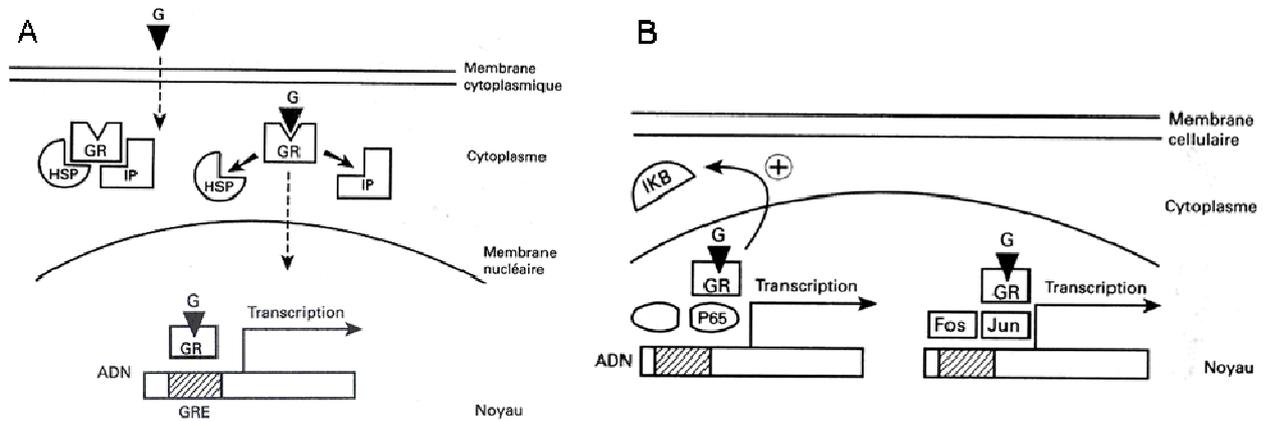
Au cours de mon doctorat, je me suis principalement intéressée à la dexaméthasone qui est une hormone glucocorticoïde de synthèse ayant un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur très important. Sa puissance est environ 40 fois celle du cortisol.

## 2. Mécanismes d'action des corticoïdes

Tous les médicaments glucocorticoïdes ont un mécanisme d'action commun. Ils agissent en modulant l'expression génique d'un certain nombre de protéines impliquées dans la réaction inflammatoire.

Dans le sang, les corticoïdes circulent liés à la Corticoid Binding Globulin (CBG). Les corticoïdes entrent dans la cellule et se fixent dans le cytoplasme au Glucocorticoïde Récepteur de type II (CGRII) couplé aux Heat Shock Proteins (HSP 70 et 90) et à une immunophiline. Leur liaison au CGRII entraîne la dissociation du complexe CGRII / HSP, permettant ainsi la phosphorylation du complexe CGRII / corticoïdes. La dimérisation de ces complexes phosphorylés leur permet d'être transloqués dans le noyau, où ils se fixent sur leur Glucocorticoid Responsive Element (GRE) au niveau de la région promotrice des gènes cibles (Figure 41A). Il en résulte la transcription directe de gènes codant des protéines à activité anti-inflammatoire, telles que la lipocortine I (annexine-1), l'enképhalinase, la SLPI (*Secretory Leucocyte Protease Inhibitor*), l'IL-10 et IκB. Une inhibition directe de la transcription de certains gènes est également possible, grâce à la fixation du complexe sur un site GRE négatif. En parallèle, le complexe CGRII / corticoïdes monomérique inhibe l'action des facteurs de transcription NFκB et AP-1 et limite ainsi

indirectement la synthèse de protéines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , phospholipase A<sub>2</sub>, IL-2, collagénase et stromélysine). Le complexe permet également d'augmenter l'expression de I $\kappa$ B favorisant l'inhibition de NF $\kappa$ B (Figure 41B).



**Figure 41: Les corticoïdes ont une activité anti-inflammatoire en régulant l'expression de gènes cibles selon deux mécanismes distincts :** (A) une action directe via la liaison du complexe récepteur / corticoïdes, sous forme d'homodimères, à une séquence nucléotidique d'ADN appelée Glucocorticoid Response Element (GRE) qui entraîne la transcription de gènes cibles, et (B) une action indirecte via l'interaction entre le complexe récepteur / corticoïdes et les facteurs de transcription NF $\kappa$ B et AP-1 conduisant à une inhibition de ces deux facteurs et donc à une trans-répression de leurs gènes cibles. Source : [pharmacomedicale.org](http://pharmacomedicale.org)

Les corticoïdes sont des dérivés du cholestérol, ce qui leur confère la capacité d'interagir avec les membranes cellulaires. Cet effet non génomique induit ainsi une stabilisation de la membrane de la cellule, ce qui a pour conséquence une diminution de la libération des enzymes lysosomiales et granules contenant les médiateurs de l'inflammation (histamine et sérotonine), et une diminution des capacités de phagocytose. Cette stabilisation des membranes induit également une modification des échanges membranaires de calcium et de sodium et une régulation du taux d'AMP (AdénosinemonoPhosphate) cyclique, conduisant à l'inhibition de l'activation cellulaire T.

Les corticoïdes ont une action sur les différents acteurs de l'immunité et de l'inflammation, de par l'inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion, et la diminution de l'acide arachidonique (via la synthèse de lipocortine-1 qui possède une activité anti-phospholipase A<sub>2</sub>). Il en résulte une diminution de la différenciation et de l'activité anti-infectieuse des macrophages ; une inhibition de la fonction des lymphocytes T helpers, suppresseurs et cytotoxiques ; une circulation des polynucléaires éosinophiles, basophiles et mastocytes permettant un effet anti-

allergique ; et une inhibition de l'afflux des leucocytes au niveau du site inflammatoire, via la diminution de la perméabilité vasculaire et de l'activation des cellules endothéliales.

### 3. Corticoïdes : greffes hépatiques et récurrence du CHC

Les corticoïdes (prednisone ou prednisolone, précédés, pendant la phase péri-opératoire, de la méthylprednisolone), ont longtemps été considérés comme indispensables après la transplantation d'organe solide. Depuis quelques années, plusieurs études ont démontré qu'il était possible d'interrompre les corticoïdes après un délai de quelques mois, ce qui est réalisé en pratique entre 6 et 12 mois en France. Par prudence, il est recommandé de maintenir de faibles doses de corticoïdes (de l'ordre de 5 mg/jour) chez les patients transplantés pour une maladie hépatique auto-immune (Calmus 2009) (revue). La conversion d'une bithérapie Tacrolimus / stéroïdes à une thérapie basée sur l'administration de Tacro / MMF et daclizumab (anti-IL-2R) permet de réduire le risque de rejet aigu de 15% et diminue le délai d'apparition de ce rejet (Otero et al. 2009). Il semblerait en effet qu'une immunosuppression sans stéroïdes soit sans risque pour le rejet du greffon après la transplantation hépatique, elle présente même des avantages en termes de diabète *de novo*, d'infection par le CMV (*CytoMégalo Virus*) et même de récurrence de la fibrose C (Sgourakis et al. 2009).

En effet, il a été suggéré que la récurrence de l'infection par le VHC était statistiquement plus faible après élimination des stéroïdes de la thérapie immunosuppressive (Segev et al. 2008). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les corticoïdes augmentent de 10 fois la capacité du VHC à entrer dans ses cellules cibles. En effet, les corticoïdes augmentent la transcription de certains récepteurs d'entrée du VHC, tels que l'occludine et le SRBI (Ciesek et al. 2010). Il semblerait cependant qu'une immunosuppression sans stéroïdes (CsA / Aza seul) n'a pas d'impact sur le grade de la fibrose à long terme (7 ans) (Manzia et al. 2010).

### 4. Corticoïdes et T régulateurs

Toutes les études s'accordent sur le fait que les corticoïdes augmentent la fréquence des Treg. Dans la sclérose multiple, non seulement la fréquence des Treg est augmentée, mais également l'expression de leurs molécules fonctionnelles, telles que le CD25, FoxP3 et l'IL-10 ; et ce dès 48h après l'injection de corticoïdes (Braith et al. 2009).

L'effet des corticoïdes sur les Treg a également été montré dans d'autres pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux, où leur augmentation est corrélée à l'amélioration de la pathologie (Azab *et al.* 2008); l'asthme, où il semblerait que seuls les Treg CD4+CD25<sup>high</sup>LAP<sup>+</sup>, et pas les CD4+CD25<sup>+</sup>, voient leur proportion augmenter après traitement par inhalation et que cette augmentation soit corrélée à une amélioration de la pathologie (Zhang *et al.* 2008). Dans un modèle murin de transplantation, l'administration de dexaméthasone et d'IL-2 au donneur, avant la greffe, permet l'expansion des Treg du donneur et ainsi une meilleure survie à long terme du transplant (Xie *et al.* 2009). Une étude plus récente a confirmé l'effet potentialisateur de la dexaméthasone sur l'expression de FoxP3. Cependant, malgré le fait que la dexaméthasone induit *in vitro* des cellules CD25<sup>high</sup> aux caractéristiques phénotypiques des Treg, ces cellules n'ont pas d'activité suppressive. De même, les Treg isolés de patients présentant un SLE et traités par corticoïdes, ont une activité suppressive similaire à celle des Treg isolés de patients non traités (Prado *et al.* 2010).

Par ailleurs, il a été montré, dans le traitement de l'asthme, que cette augmentation de Treg est due à l'induction de Tr1 (Karagiannidis *et al.* 2004). En effet, il n'est pas encore clairement défini si l'effet des corticoïdes sur les Treg est direct ou s'il favorise l'émergence d'iTreg. Dans ce sens, une étude a suggéré que l'administration de corticoïdes prévenait la maturation des DC, en inhibant la sécrétion d'IL-12 et d'IL-23 et en augmentant celle d'IL-10, rendant les DC tolérogènes. Ces DC tolérogènes peuvent *in vitro* conférer des propriétés régulatrices à des cellules CD4+CD25<sup>-</sup> (Luther *et al.* 2009).

## F - Traitements en cours d'évaluation dans la transplantation hépatique

De nouveaux immunosuppresseurs sont en cours d'évaluation dans la transplantation hépatique, mais le rapport coût-efficacité de ces nouveaux protocoles d'immunosuppression doit être précisé.

Les anticorps **anti-récepteurs de l'IL-2** (Basiliximab, Daclizumab aujourd'hui arrêté), en association avec la cyclosporine ou le tacrolimus permettent de réduire l'incidence du rejet aigu. Leur utilisation peut permettre également de réduire très rapidement les corticoïdes (Calmus 2009) (revue). En effet, dans une étude clinique réalisée chez 47 patients transplantés hépatiques pour cause de cirrhose C, il a été observé que le

Basiliximab était associé à moins de rejet aigu que les stéroïdes (50 vs 25%) et à une meilleure survie (Lupo *et al.* 2008). Par ailleurs, malgré la sous expression de CD25 en présence de Basiliximab, il semble que la fonction suppressive des Treg ne soit pas altérée (Vondran *et al.* 2010).

L'**OKT3**, anticorps monoclonal bloquant, dirigé contre la molécule membranaire CD3 propre à l'ensemble des lymphocytes T, induit une déplétion rapide, intense, et relativement brève de ces lymphocytes. Il a été essentiellement utilisé dans le traitement des rejets aigus graves, corticorésistants ou réfractaires, avec une excellente efficacité. Il est toutefois doté d'effets indésirables importants, tant immédiats (hypotension, dyspnée, diarrhée...) essentiellement liés au syndrome de relargage des cytokines, que retardés (infections, infections virales, syndromes lymphoprolifératifs), qui en limitent l'emploi. Son utilisation a été considérablement réduite depuis que la fréquence des rejets requérant l'OKT3 a baissé au cours des dernières années, de 10 à moins de 1 % (Calmus 2009) (revue).

Le traitement immunosuppresseur idéal n'existe pas. L'effet de l'association actuelle des différents traitements immunosuppresseurs a permis de réduire considérablement l'incidence du rejet aigu. Cependant, la survie des patients et celle des greffons n'a pas augmenté de façon aussi nette, en particulier au-delà d'1 an. Plus de 10 % des transplantés hépatiques ont une insuffisance rénale évoluée ou terminale 10 ans après la transplantation hépatique (Calmus 2009) (revue). De plus, l'exposition prolongée à un traitement immunosuppresseur, en combinaison à l'exposition à d'autres carcinogènes, soumet le transplanté hépatique à un risque de tumeurs *de novo*. Ce risque, initialement sous-estimé, pourrait avoisiner 20 %, 15 ans après la transplantation (Duvoux 2001). Le développement de nouveaux médicaments, dénués si possible de ces effets indésirables, et possédant des effets inhibiteurs sur la maladie du greffon contre l'hôte, est un des enjeux actuels (Yabu and Vincenti 2007) (revue).

Un autre but est le développement de médicaments capables d'induire une tolérance du greffon, sans altérer la fonction des lymphocytes T régulateurs. C'est le cas, actuellement, des immunosuppresseurs biologiques tels que les anticorps monoclonaux. Parmi les anticorps et molécules de fusion, le Belatacept (CTLA-4-Ig) est le plus avancé,

mais il ne sera pas disponible avant fin 2010. Le Belatacept semble rendre les DC tolérogènes pour favoriser le développement des Treg, dans un modèle murin d'arthrite (Ko *et al.* 2010).

De nouveaux agents chimiques, capables d'agir sur des voies nouvelles et plus spécifiques, sont actuellement à l'étude. Par exemple, le FTY720 (analogue de sphingosine), en essai de phase III dans la transplantation rénale, provoque un retour des lymphocytes vers les organes lymphoïdes et les y séquestre, les empêchant de passer dans la circulation sanguine. Cette molécule semble par ailleurs augmenter le nombre et la fonction des Treg *in vitro* (Zhou *et al.* 2009).

L'un des objectifs actuel est le développement de nouvelles molécules capable de favoriser le maintien des populations T régulatrices. Cependant, la manipulation de la fréquence et/ou de l'activité des Treg présente encore un risque élevé. Ces populations ne sont pas encore parfaitement connues et leur implication positive ou délétère dans de nombreuses pathologies, en font une cible thérapeutique difficile à utiliser. La plus grande difficulté est de maintenir l'équilibre fragile qui existe entre les T effecteurs et les T régulateurs. La rupture de cet équilibre pourrait avoir des conséquences irréversibles chez le patient. En effet, exarcerber le développement de cellules T régulatrices pourrait notamment favoriser le développement de cancers, alors que trop inhiber ces cellules favoriserait au contraire le développement de pathologies auto-immunes. Ainsi, le risque d'échec de ces nouvelles classes de molécules reste encore élevé.

**ARTICLE 1 - CHAPITRE 7 DU LIVRE “REGULATORY T CELLS”**

**Title : Regulatory T cells and Hepatocellular Carcinoma : Implication of the Regulatory T Lymphocytes in the Control of the Immune Response**

**Titre : Cellules T régulatrices et Carcinome hépatocellulaire : Implication des lymphocytes T régulateurs dans le contrôle de la réponse immunitaire.**

Nadira Delhem, **Miroux C**, Thibaut Vausselin.

*Nova Science Publishers. 2010.*

## RESUME

Le Carcinome Hépatocellulaire (CHC) est le 5<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent au monde et la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer. Le développement du CHC est plus fréquent chez les hommes présentant une cirrhose, conséquence la plus fréquente des infections hépatiques chroniques (VHC et VHC) ou de l'alcoolisme. A l'heure actuelle, la seule alternative de survie au stade du CHC sont la résection de la tumeur ou la transplantation hépatique.

Les mécanismes immunitaires tiennent une place importante dans la surveillance de la malignité et le contrôle de la progression tumorale. Des lymphocytes infiltrants la tumeur ont été décrits dans le CHC, et une infiltration importante est corrélée à une diminution de la récurrence tumorale après résection. Cependant, la croissance continue de la tumeur ; malgré la présence d'une infiltration de cellules immunitaires spécifiques des antigènes tumoraux au sein même et autour de la tumeur ; suggèrent l'existence d'une défaillance dans le contrôle de la réponse immunitaire. De nombreux mécanismes d'altération de la réponse immune anti-tumorale ont été proposés, mais il apparaît évident qu'il existe une suppression directe des cellules T effectrices par les cellules T régulatrices.

Les cellules T régulatrices ont été initialement décrites dans les pathologies auto-immunes inflammatoires et sont caractérisées par leur faculté à inhiber la réponse immune T helper. Aujourd'hui, de nombreuses populations de cellules T régulatrices sont décrites, cependant, les cellules T régulatrices naturelles CD4+CD25+ et les cellules Tr1 restent les mieux caractérisées.

Actuellement, il n'y a pas de preuves d'implication directe des cellules T régulatrices dans la malignité et le contrôle de la progression de l'hépatocarcinome. Cependant, des études récentes ont montré que ces deux sous-populations de cellules régulatrices, et particulièrement les Tr1, sont impliquées dans la modulation des réponses immunitaires au cours de l'infection chronique par le VHC, les impliquant indirectement dans la progression du CHC.

## ARTICLE 2 - REVUE GENERALE

**Title : Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases : implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response**

**Titre : Les cellules T régulatrices dans les maladies hépatiques liées au VHB et au VHC : Implication des lymphocytes T régulateurs dans le contrôle de la réponse immunitaire.**

**Miroux C**, Thibaut Vausselin, Nadira Delhem

*Expert Opinion on Biological Therapy.* 2010, 10(11):1-10.

## RESUME

La cirrhose hépatique est une conséquence fréquente des infections chroniques (VHB et VHC) ou de l'abus d'alcool. La cirrhose est par ailleurs la cause majeure de carcinome hépatocellulaire (CHC). Actuellement, la transplantation hépatique reste l'approche thérapeutique la plus efficace dans le traitement des CHC. Malheureusement, la majorité des patients présente une récurrence de l'infection virale sur le greffon. Il a été montré que l'évolution de la pathologie dépendrait de mécanismes immunologiques. En effet, malgré la présence de cellules T spécifiques du virus, le risque élevé de chronicité (80%) et le développement continu de la tumeur hépatique suggèrent une défaillance du système immunitaire.

Il semble que l'inhibition des réponses immunitaires anti-virale et anti-tumorale, par les cellules T régulatrices, joue un rôle central dans l'altération du système immunitaire. Différents types de populations régulatrices sont décrites, mais les T régulateurs naturels (nTreg) et les T régulateurs de type 1 induits (Tr1) sont les mieux caractérisés, et ont pu être très récemment associés à la fois à la progression de la pathologie fibrotique et à la sévérité des récurrences après la transplantation hépatique.

Les nTreg et les Tr1, tous 2 importants pour la tolérance du greffon, inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale. Cependant, il n'y avait, jusque très récemment, aucunes certitudes quant à l'implication directe des cellules T régulatrices dans l'évolution de l'hépatite, et plus particulièrement au cours de l'infection chronique, de la cirrhose ou du CHC. Cette revue vous présente les différentes études qui ont récemment suggérés une implication des T régulateurs dans la modulation des réponses immunitaires anti-VHB et anti-VHC, pouvant ainsi favoriser le développement du cancer.

Il a en effet été rapporté qu'il existe une augmentation de la fréquence des Treg au cours de l'infection par le VHB et le VHC, et que l'inhibition de la réponse immune effectrice par les Treg conduit à la persistance virale et à la progression de la pathologie vers le CHC. Il a également été décrit qu'après la transplantation hépatique pour cause de cirrhose C, la fréquence des nTreg et des Tr1 est augmentée proportionnellement à la sévérité de la récurrence.

Ainsi, à la fois les nTreg et les Tr1 semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la réponse immunitaire, conduisant à l'hépatite chronique et favorisant la progression de la pathologie jusqu'à la cirrhose et le CHC.

L'ensemble de ces études apporte un éclairage sur le rôle déterminant des Treg, ainsi que des suggestions pour l'amélioration des traitements actuels ou même le développement de nouvelles thérapies.

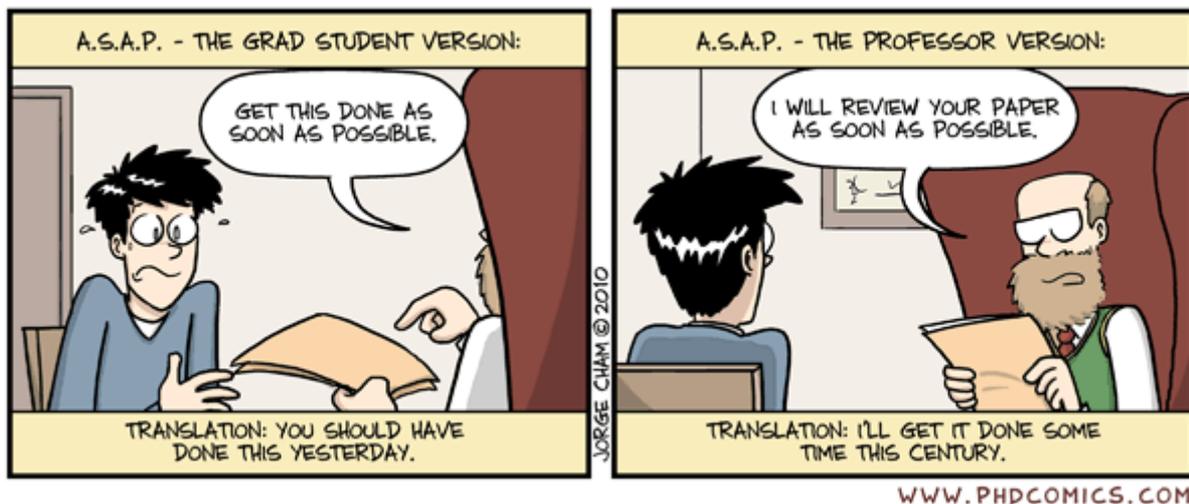
## **OBJECTIFS DE LA THESE**

La transplantation hépatique (TH) représente l'unique traitement efficace, lorsque l'hépatite chronique C a occasionné une cirrhose et que, du fait des complications de la cirrhose, le pronostic vital est en jeu au terme de quelques mois. Malheureusement, la récurrence de la cirrhose C après une TH est quasi systématique et les facteurs qui en sont à l'origine peuvent être multiples. Il a été récemment décrit que les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ (Treg) et certains immunosuppresseurs pouvaient favoriser la récurrence de la fibrose C après la transplantation. Le patient transplanté peut également être confronté au problème du rejet aigu d'allogreffe, qui est partiellement contrôlé par les Treg et par une thérapie immunosuppressive rigoureuse. Paradoxalement, plusieurs études ont suggéré que certains immunosuppresseurs sont moins efficaces que d'autres dans la prophylaxie du rejet d'allogreffe et peuvent même être associés à des épisodes de rejet plus fréquents. Dans ce contexte, il existait un besoin urgent d'évaluer le rôle que peuvent jouer les immunosuppresseurs sur les Treg dans la récurrence de la fibrose C mais également dans le rejet du greffon, d'autant qu'il n'y a toujours pas de traitement efficace permettant de contrer ces derniers durablement.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur deux objectifs principaux. Il s'agissait dans un premier temps de participer aux travaux qui ont permis de déterminer l'implication des Treg dans la progression de la pathologie vers le CHC et dans la sévérité des récurrences de la cirrhose C après la transplantation hépatique. Et dans un second temps, la partie centrale de ma thèse a été de déterminer (i) si certains immunosuppresseurs pouvaient jouer un rôle défavorable dans la récurrence virale C et/ou au cours du rejet, en interférant avec le développement et l'activité des Treg et (ii) comment les immunosuppresseurs pouvaient agir sur la fonctionnalité des Treg.

Nous espérons ainsi pouvoir identifier des protocoles d'immunosuppression qui maintiennent l'activité suppressive des Treg, sans pour autant l'exacerber au risque de favoriser la récurrence, mais sans non plus la diminuer au risque de favoriser le rejet aigu d'allogreffe. Les résultats attendus sont très importants dans la mesure où la TH reste à ce jour la seule alternative de survie au stade du carcinome hépatocellulaire et surtout dans la mesure où il n'existe pas de traitement efficace pour contrer la récurrence de la fibrose C qui survient dans 80% des cas. Face à cet échec, il existe donc un besoin urgent, d'évaluer les facteurs à l'origine de cette récurrence.

Notre objectif ultime étant, grâce à nos résultats, d'ouvrir de nouvelles perspectives aux traitements immunosuppresseurs utilisés après la TH, en prenant notamment en compte la synergie d'action des immunosuppresseurs sur les Treg.



*In science the credit goes to the man who convinces the world,  
not the man to whom the idea first occurs.  
Sir Francis Darwin*

## **RESULTATS**

Chers lecteurs,

Ce chapitre se subdivise en 3 parties distinctes et vous présente ainsi :

- Les travaux auxquels j'ai collaboré très étroitement au cours de ma thèse et qui m'ont permis de mettre en évidence le rôle des Treg dans la primo-infection par le VHC et dans la récurrence après une TH : Article 3 et 4.
- Les travaux principaux de ma thèse, concernent l'effet des immunosuppresseurs, utilisés en TH, sur les Treg : Article 5 et 6.
- Les travaux annexes auxquels j'ai participé et qui sont en lien direct avec ma thématique de recherche : Article 7, 8 et 9.

## ARTICLE 3

**Title : Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression.**

**Titre : Rôle des lymphocytes T régulateurs dans la progression de la fibrose hépatique associée à l'infection par le VHC.**

Delhem N, Cottrez F, Carpentier A, **Miroux C**, Moralès O, François V, Groux H, Auriault C, Pancré V.

*Bulletin du Cancer.* **2008** ; 95 (11) : 1029-38.

## RESUME

### Contexte :

L'infection par le Virus de l'Hépatite C (VHC) est fortement prévalente en France. Les caractéristiques principales de l'infection virale sont le très fort risque (environ 80 %) de développement d'un portage chronique et l'évolution vers des lésions d'hépatite chronique active sévères puis de cirrhose ; le carcinome hépatocellulaire (CHC) représentant fréquemment le stade ultime de cette évolution. L'évolution vers la forme chronique de l'infection s'accompagne d'une diminution importante de la réponse cellulaire anti-virale multi-spécifique des cellules T CD4 et CD8. Nous suggérons que le dysfonctionnement du système immunitaire au cours de l'infection par le VHC, puisse reposer sur l'existence de mécanismes immunosuppresseurs supportés notamment par les lymphocytes T CD4 régulateurs Tr1 via leur production élevée d'IL-10.

### Méthodes et résultats :

Grâce à la PCR quantitative en temps réel, nous avons pu mettre en évidence, une augmentation significative de l'expression intra-hépatique de gènes codant diverses molécules impliquées dans l'immunosuppression et décrites comme directement associées à l'activité des T régulateurs. En effet, l'expression de CD4, CD25, T1-ST2 ou CCR5 mais aussi de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  est fortement augmentée chez les patients présentant une cirrhose et/ou un hépatocarcinome versus les patients n'ayant aucune lésion hépatique. Plus récemment, les marqueurs spécifiques de la population régulatrice Tr1 ont été mis en évidence et nous ont permis de valider la surexpression de ces marqueurs, proportionnellement à l'évolution de la fibrose hépatique. Ces résultats sont confortés par la détection des marqueurs des Tr1 directement dans les biopsies hépatiques, par immunohistochimie *ex vivo*.

### Conclusion :

Ces résultats nous confortent donc dans l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire serait immuno-régulé chez les patients chroniquement infectés et qui évoluent vers le CHC ; et démontrerait l'implication des Tr1 et possiblement d'autres populations régulatrices telles que les CD4+CD25+ (Treg) dans la progression de la pathologie infectieuse. La mise en évidence de différents phénotypes de T régulateurs chez des patients chroniquement infectés versus des patients présentant un hépatocarcinome renforcerait considérablement l'importance *in vivo* des effets qui pourraient être induits par les cellules T régulatrices.

## ARTICLE 4

**Title : Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation.**

**Titre : Augmentation de l'expression des cellules T régulatrices de type 1 (Tr1) au cours de la récurrence de l'hépatite C après la transplantation hépatique.**

Carpentier A, Conti F, Stenard F, Aoudjehane L, **Miroux C**, Podevin P, Morales O, Chouzenoux S, Scatton O, Groux H, Auriault C, Calmus Y, Pancre V, Delhem N.

*American Journal of Transplantation*. 2009 ; 9 (9) : 2102-12.

## RESUME

### Contexte :

Le dysfonctionnement de la réponse immunitaire au cours de l'infection par le VHC a été associé à l'activité des cellules T régulatrices. Par ailleurs, les cirrhoses liées à l'infection par le VHC sont la première cause de Transplantation Hépatique (TH). Cependant, chez 80% des patients transplantés, la récurrence est quasi-systématique et est caractérisée par une accélération de la progression de la fibrose.

### Méthodes :

L'implication de différentes populations T régulatrices (CD4+CD25+ : nTreg et CD49b+CD18+ : Tr1) dans la sévérité des récurrences après la TH, a été étudiée par analyse transcriptomique et ELISA sur des échantillons sériques et par immunohistochimie sur des biopsies hépatiques, à 1 et 5 ans après la TH. Les patients transplantés ont été classés en 3 groupes distincts : 10 patients stables et VHC négatif, 10 patients présentant une récurrence modérée de l'hépatite C (METAVIR<A1F2) et 10 patients avec une récurrence sévère (METAVIR>A1F2).

### Résultats :

5 ans après la transplantation, l'expression des marqueurs associés à la sous-population nTreg, particulièrement le CD4, le CD25, OX40, GITR, et ICAM1 est significativement augmentée dans le foie des patients présentant une récurrence hépatique, quel que soit leur degré de récurrence ( $p < 0.05$  versus foie sain). Alors que, les marqueurs co-exprimés par les cellules Tr1 (CD49b, CD18) sont significativement sur-exprimés chez les patients présentant une récurrence sévère par rapport aux patients avec récurrence minimale ou stable après la TH ( $p < 0.05$ ).

1 an après la TH, une augmentation des marqueurs des Tr1 est déjà retrouvée chez les patients qui évolueront vers la récurrence sévère, leur conférant un caractère prédictif. Par ailleurs, la sécrétion d'IL-10, cytokine majeure de l'immunosuppression caractérisant la population Tr1, a été retrouvée augmentée aux niveaux sérique et intra-hépatique dans les récurrences sévères à 1 et 5 ans post-TH.

### Conclusion :

Ces résultats suggèrent donc que les lymphocytes T régulateurs sont impliqués dans la sévérité de la récurrence de l'hépatite C après la transplantation hépatique. La population Tr1 semble être la plus spécifiquement impliquée dans la sévérité de la maladie. De plus, sa fréquence en périphérie ou dans le foie, ainsi que l'augmentation de la sécrétion d'IL-10, 1 an déjà après la TH, semblent être prédictifs de la sévérité de la récurrence à 5 ans.

## ARTICLE 5

**Title : Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells *in vitro*.**

**Titre : Effet inhibiteur *in vitro* de la cyclosporine sur les cellules T régulatrices humaines.**

**Miroux C**, Moralès O, Carpentier A, Dharancy S, Conti F, Boleslawski E, Podevin P, Auriault C, Pancré V, Delhem N.

*Transplantation Proceedings*. 2009 ; 41 (8) : 3371-4.

## RESUME

### Contexte :

La récurrence quasi-systématique de la cirrhose C, après la transplantation hépatique, est la principale barrière à la survie du greffon. Cette récurrence est favorisée à la fois par le traitement immunosuppresseur et les cellules T régulatrices CD4+CD25+ (Treg), pourtant indispensables pour l'induction et le maintien de la tolérance du greffon. Dans ce contexte, nous avons analysé les effets d'un immunosuppresseur couramment utilisé après la TH, la cyclosporine A (CsA), sur les Treg.

### Méthodes :

Les cellules T CD4+CD25+ ont été isolées de donneurs sains, puis cultivées en présence de 40 et 400 ng/mL de CsA. Leur activité suppressive a été analysée dans des cocultures de Treg et PBMC (ratio 2 :1), activés par de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 ; et évalué par l'incorporation de Thymidine tritiée. Les analyses phénotypiques des Treg ont été réalisées par cytométrie de flux (FACS) et PCR quantitative en temps réel (Q-PCR) et leur sécrétion cytokinique a été évaluée par ELISA.

### Résultats :

La CsA inhibent de manière dose dépendante la prolifération des PBMC activés, ainsi que celle des Treg (induites par de l'anti-CD3, anti-CD28, de l'IL2 à fortes doses et des PBMC autologues irradiés).

De manière intéressante, l'ajout de 40 ng/mL de CsA, dans la coculture, inhibe la fonction suppressive des Treg, alors qu'une forte dose (400 ng/mL) n'a pas d'effet sur leur activité.

De manière surprenante, la CsA utilisée à 40 ng/mL modifie le profil de sécrétion cytokinique des Treg en faveur d'un profil pro-inflammatoire Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), sans altération de leur sécrétion de cytokine immunosuppressive (IL-10, TGF- $\beta$ ).

### Conclusion :

Une dose thérapeutique de CsA inhibe la fonction des cellules T régulatrices CD4+CD25+, en induisant un shift cytokinique en faveur d'une sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ .

Ces résultats suggèrent que la CsA pourrait empêcher l'induction de la tolérance du greffon et réduire le risque de récurrence de l'hépatite C.

## ARTICLE 6

**Title : Cyclosporin A, but not Tacrolimus, inhibits regulatory T cells activity independently of the calcineurin pathway.**

**Titre : La cyclosporine A, mais pas le tacrolimus, inhibe l'activité des cellules T régulatrices par une voie calcineurine-indépendante.**

**Miroux C**, Moralès O, Vausselin T, Sténard F, Calmus Y, de Launoit Y, Pancre V, Conti F, Delhem N.

*Journal of Hepatology*. En soumission.

## RESUME

### Contexte :

La récurrence quasi-systématique de la cirrhose C, après la transplantation hépatique (TH), est la principale barrière à la survie du greffon. Cette récurrence est favorisée à la fois par le traitement immunosuppresseur (IS) et les cellules T régulatrices CD4+CD25+ (Treg). Par ailleurs, nous avons montré que la cyclosporine A (CsA) inhibe l'activité des Treg à la dose thérapeutique de 40 ng/mL. Nous avons donc analysé l'effet des autres IS couramment utilisés après la TH ; le tacrolimus (Tac), le mycophénolate mofétil (MMF) et les corticoïdes (Dexa) ; sur les Treg.

### Méthodes :

Les cellules T CD4+CD25+ ont été isolées de donneurs sains, puis cultivées en présence de CsA, de Dexa, de MMF, seuls ou en combinaison ; ou de Tac et de NIM811, un analogue non immunosuppresseur de la CsA. Leur activité suppressive a été analysée dans des co-cultures de Treg et PBMC (ratio 2 :1), activés par de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 ; et évalué par l'incorporation de thymidine tritiée. Les analyses phénotypiques des Treg ont été réalisées par cytométrie de flux (FACS) et PCR quantitative en temps réel (Q-PCR) , leur sécrétion cytokinique a été évaluée par ELISA et le profil de phosphorylation de N-FAT a été analysé par western blot.

### Résultats :

La CsA inhibe significativement l'activité des Treg aux doses thérapeutiques de 20 ( $p < 0.06$ ) et 40 ng/mL ( $p < 0.034$ ), alors que des doses supérieures à 100 ng/mL ne modifient pas cette activité. Cette dose thérapeutique de CsA (40 ng/mL) ne semble pas modifier le phénotype des Treg alors qu'elle induit une sécrétion significative d'IL-2 ( $p < 0.029$ ) et d'IFN- $\gamma$  ( $p < 0.05$ ). En effet, l'analyse du transcriptome n'a pas révélé de modification de l'expression des marqueurs associés aux Treg (CD25, FoxP3, GITR, CTLA-4, LAG-3, ...). De la même façon, l'analyse cytométrique n'a pas montré de changement d'expression des marqueurs CD25, FoxP3 et CD127.

Le Tac, MMF et les corticoïdes inhibent la prolifération des PBMC activés et maintiennent l'activité des Treg. Les corticoïdes sont également capables d'induire la prolifération des Treg ( $p < 0.041$ ). Cependant, l'association de la CsA à la Dexa ne permet pas de réverser l'inhibition de l'activité des Treg par la CsA, contrairement à son association avec le MMF. De manière surprenante, NIM 811 inhibe l'activité des Treg à la même concentration que la CsA ( $p < 0.043$ ).

En présence de CsA ou NIM, le profil de phosphorylation de N-FAT n'est pas modifié, alors que le tacrolimus induit une augmentation de sa déphosphorylation à la dose de 50 ng/mL. Ceci suggère que la CsA inhiberait l'activité des Treg par une voie calcineurine indépendante.

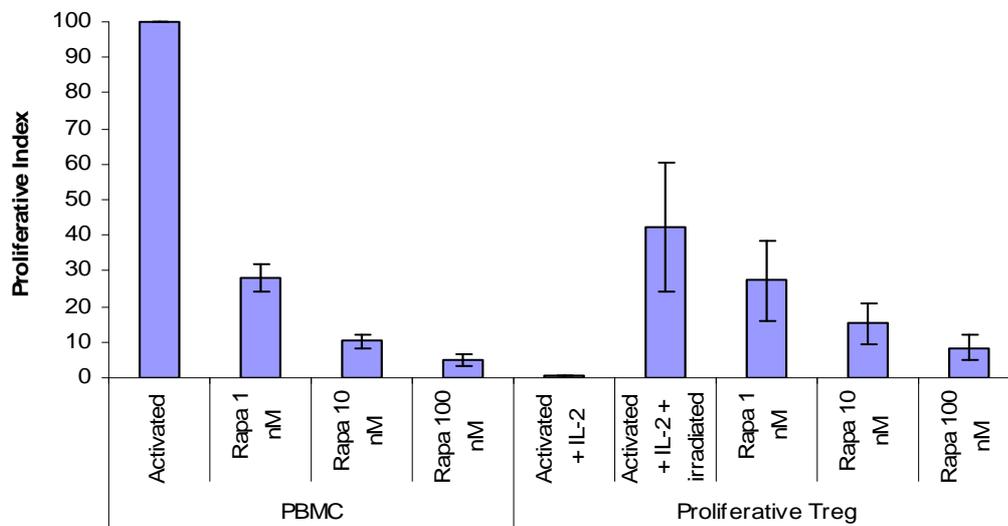
### Conclusion :

Une dose thérapeutique de CsA inhibe la fonction des cellules T régulatrices CD4+CD25+, en induisant la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , et ce de manière calcineurine indépendante. Par ailleurs, les corticoïdes ne sont pas capables de réverser l'inhibition de l'activité des Treg induite par la CsA. Ces résultats pourraient expliquer pourquoi la CsA est plus souvent associée à des épisodes de rejet de greffe et moins souvent à des récurrences de l'hépatite C.

**FIGURE 42**

**Effet de la Rapamycine sur la prolifération et l'activité suppressive des Treg.**

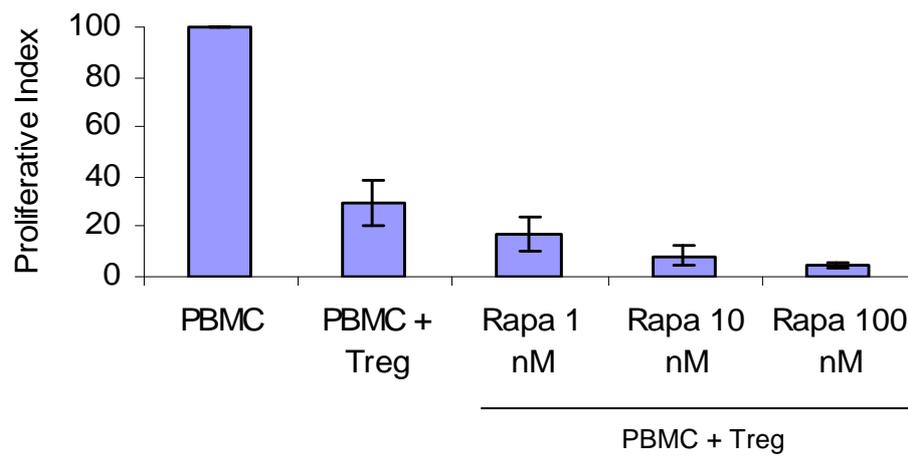
La rapamycine (Sigma-Aldrich) a été dissoute dans de l'éthanol 2mM à la concentration finale de  $10^6$  pM. Elle a été utilisée en culture aux concentrations de 1, 10 et 100 nM.



La prolifération des PBMC est induite, *in vitro*, en mimant l'activation antigénique par de l'anti-CD3 (1µg/mL) et de l'anti-CD28 (100 ng/mL). L'évaluation de la prolifération des cellules est réalisée par incorporation de thymidine tritiée (1 µCi durant les 18 dernières heures de culture). La prolifération des PBMC diminue respectivement de 70, 90 et 95% en présence de 1, 10 et 100 nM de rapamycine.

Par ailleurs, la Rapamycine inhibe également de manière dose-dépendante la prolifération des Treg; induite *in vitro* en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-2 (300 U/mL) et de PBMC autologues irradiés (ratio 1 :1). La présence dans le milieu de culture de PBMC autologues irradiés est une condition indispensable à la prolifération des Treg.

Résultats – Figure 42



L'activité suppressive des Treg a été évaluée dans des cocultures de PBMC activés et de Treg, à un ratio de 2:1. En présence de 1, 10 ou 100 nM de Rapamycine, dans la coculture, la capacité suppressive des Treg n'est pas modifiée.

**ARTICLE 7**

**Title : Analysis of gene transcription in sera during chronic hepatitis C infection.**

**Titre : Analyse de la transcription de gène sérique au cours de l'Hépatite C chronique.**

Carpentier A, Conti F, Carrière M, Aoudjehane L, **Miroux C**, Moralès O, Calmus Y, Groux H, Auriault C, Pancré V, Delhem N\*, Podevin P\*.

\* co-auteurs

*Journal of Medical Virology*. 2009 ; 81 (3) : 473-80.

## RESUME

### Contexte :

L'évaluation de la progression de l'hépatite C chronique nécessite le développement de techniques non invasives d'évaluation des facteurs impliqués. Le sérum est le « matériel » le plus accessible pour les analyses de routine chez le patient.

### Méthodes :

La transcription de 219 gènes impliqués dans la pathogenèse de l'infection par le VHC a été analysée, par PCR quantitative, à la fois dans le sérum, les PBMC et les biopsies hépatiques de 5 patients chroniquement infectés par le VHC.

### Résultats :

Une corrélation significative a été retrouvée entre : les échantillons hépatiques versus le sérum ( $r(2) = 0.37$ ), les échantillons hépatiques versus les PBMC ( $r(2) = 0.54$ ) et le sérum versus les PBMC ( $r(2) = 0.49$ ). De plus, l'expression des marqueurs des cellules T et B, des molécules d'adhésion, des marqueurs d'apoptose et d'inflammation hépatique, est comparable et significativement corrélée entre le sérum et les échantillons hépatiques ( $r(2) < 1$ ). Ces résultats indiquent que le sérum peut être utilisé pour le monitoring de la progression de l'hépatite C.

Dans ce sens, le sérum de 10 patients infectés par le VHC (génotype 1b) a été utilisé pour comparer le profil d'expression de gènes, au sérum de 10 donneurs sains. Ainsi, il a été montré que 41 gènes, impliqués dans l'activation lymphocytaire T et dans l'apoptose, sont significativement sur-exprimés chez les patients infectés par le VHC.

En parallèle, l'influence de la prise d'alcool sur l'expression des gènes sériques a été évaluée chez les patients infectés par le VHC 1b. La consommation d'alcool est associée à une augmentation de 6 gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et à une diminution des gènes associés à la fonction des cellules dendritiques.

### Conclusion :

Cette étude a permis de conclure que le sérum pouvait être utilisé pour évaluer l'expression des gènes hépatiques. Cependant des études supplémentaires seront nécessaires afin de valider la relevance des gènes à monitorer dans le suivi de la progression de l'hépatite C.

## ARTICLE 8

**Title : Regulatory T cells type 1 predict response to anti-viral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation**

**Titre : Les cellules T régulatrices de type 1 sont prédictives de la réponse au traitement anti-viral de la récurrence de l'hépatite C après transplantation hépatique**

Sténard F, Moralès O, Viallon V, Aoudjehane L, **Miroux C**, Ben Othman S, Chouzenoux S, Groux H, Auriault C, Soubrane O, Calmus Y, Delhem N, Conti F.

*American Journal of Transplantation*. En soumission.

## RESUME

### Contexte :

Le groupe TRANSPEG a initié une étude prospective nationale, dans le but d'analyser l'efficacité de la bithérapie IFN- $\alpha$ 2A / Ribavirine, chez les patients en récurrence de l'infection par le VHC après la transplantation hépatique. Dans cette étude, l'influence des cellules T régulatrices sur la réponse anti-virale a été analysée.

### Méthodes :

Les patients ont été inclus dans cette étude en fonction de leur réponse virologique soutenue (SVR) 18 et 30 mois après le début du traitement. 100 patients ont été inclus dans cette étude TRANSPEG (Août 2002 – Janvier 2004) et les données cliniques de 27 d'entre eux sont disponibles. L'expression des marqueurs des Treg (Tr1 et FoxP3+) a été analysée par étude transcriptomique sur des échantillons de sérum, des PBMC ou des biopsies hépatiques.

### Résultats :

La fréquence des Tr1, évaluée par l'expression de leur marqueur prédominant le CD49b, avant l'introduction de la thérapie anti-virale, a été retrouvée significativement associée à la SVR. Les patients répondeurs au traitement présentent une diminution de l'expression du CD49b dans le sérum (médiane d'expression relative = -2.93) par rapport aux patients non répondeurs au traitement (-0.21,  $p < 0.05$ ). Ces résultats ont été confirmés au sein des échantillons de PBMC et dans les biopsies hépatiques. Le niveau d'expression du CD49b est donc prédictif de la réponse à la thérapie anti-virale.

### Conclusion :

Ces résultats suggèrent que les Tr1 semblent jouer un rôle dans l'échec de la réponse immunitaire et de la thérapie anti-virale, au cours de la récurrence de l'hépatite C. L'estimation de l'expression des marqueurs des Tr1 pourrait ainsi aider dans la sélection des patients, transplantés et présentant une récurrence de l'infection par le VHC, nécessitant un traitement anti-viral plus intense.

**ARTICLE 9 – REVUE**

**Title : Regulatory T-cells and hepatocellular carcinoma: implication of the regulatory T lymphocytes in the control of the immune response**

**Titre : Cellules T régulatrices et carcinome hépatocellulaire : Implication des lymphocytes T régulateurs dans le contrôle de la réponse immune.**

Delhem N, Carpentier A, Moralès O, **Miroux C**, Groux H, Auriault C, Pancré V.

*Bulletin du Cancer.* **2008** ; 95 (12) : 1219-25.

## RESUME

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde et la troisième cause de mortalité liée au cancer. Le CHC survient plus fréquemment chez les hommes qui ont développé une cirrhose, le plus souvent consécutive à une infection chronique virale (VHC et VHB) ou à un abus d'alcool. A l'heure actuelle, les seuls traitements pour le CHC sont la résection ou la transplantation hépatique. Les mécanismes immunologiques sont très importants dans la surveillance de la malignité et dans le contrôle de la progression tumorale. Il a par ailleurs été décrit qu'une infiltration étendue de lymphocytes infiltrant la tumeur hépatique (TILs) était associée à une récurrence réduite de la tumeur après résection. Cependant, la croissance continue de la tumeur, malgré l'infiltration de cellules T spécifiques à la fois à l'intérieur et autour de la tumeur, suggère un échec du contrôle immunitaire. De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer cette altération de la réponse immune, mais il est apparu évident qu'il pouvait y avoir une inhibition directe des cellules effectrices par les lymphocytes T régulateurs qui joueraient un rôle dans la suppression de la réponse immune anti-tumorale. Initialement identifiés en situation de désordres immunologiques, telles certaines pathologies auto-immunes inflammatoires, les lymphocytes T régulateurs se caractérisent par leur capacité à inhiber la réponse T helper. Plusieurs sous-populations de cellules T régulatrices sont décrites à ce jour, mais les cellules T CD4+CD25+FoxP3+ et les Tr1 restent les mieux caractérisées. Une implication directe des T CD4+CD25+ dans la malignité et dans le contrôle de la progression du CHC n'a pas été clairement définie à ce jour. Cependant, des études récentes ont montré que les T régulateurs et, en particulier, les Tr1 pouvaient être impliqués dans la chronicité de l'infection par le VHC et favoriser la progression du CHC, en modulant la réponse immune cellulaire.

## COMMUNICATIONS - CONGRES

### Communications orales :

- 10<sup>ème</sup> Réunion du Réseau national hépatites de l'ANRS organisée les 21 et 22 Janvier 2010, à Paris.

*Titre : La Dexaméthasone n'est pas capable de réverser l'effet inhibiteur de la Cyclosporine A sur l'activité des cellules T régulatrices CD4+CD25+.*

- 44<sup>ème</sup> Meeting Annuel de European Association for the Study of the Liver (EASL), organisée du 22 au 26 Avril 2009, à Copenhague, Danemark.

*Titre : Immunosuppressive drug cyclosporine A inhibits human Regulatory T cell activity, independently of calcineurin pathway.*

- 63<sup>èmes</sup> Journées de l'AFEF, qui se sont tenues à Paris du 24 au 27 Septembre 2008.

*Titre : Effet inhibiteur de la cyclosporine A sur les cellules T régulatrices humaines in vitro.*

- 7<sup>ème</sup> Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation, qui s'est tenu à Lyon du 5 au 8 Décembre 2007.

*Titre : Modulation de l'activité ex vivo des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ par la cyclosporine A.*

### Communications écrites :

- Congrès Annuel 2010 de la Société Française d'Immunologie (SFI), organisé du 24 au 26 Novembre 2010, à Marseille.

- 2<sup>èmes</sup> Journées du Cancéropole Nord-Ouest, organisé les 4 et 5 Mai 2009, au Touquet.

- 9<sup>ème</sup> Réunion du Réseau national hépatites de l'ANRS organisée les 22 et 23 Janvier 2009, à Paris.

- 22<sup>ème</sup> conférence européenne d'immunogénétique et d'histocompatibilité organisée du 2 au 5 Avril 2008, à Toulouse.

- 8<sup>ème</sup> Réunion du Réseau national hépatites de l'ANRS organisée les 24 et 25 janvier 2008, à Paris.

**« On se lasse de tout sauf de comprendre »**  
Virgile

## **DISCUSSION - CONCLUSION**

Au cours de ma thèse, j'ai abordé divers aspects de l'implication des cellules T régulatrices naturelles CD4+CD25+CD127- (nTreg) et induites (Tr1) dans la pathologie hépatique associée à l'infection par le virus de l'hépatite C. Les objectifs de cette étude ont été, dans un premier temps, d'analyser l'implication des Treg dans la progression de l'hépatite C après la primo-infection, puis dans la sévérité des récidives de la cirrhose C après une transplantation hépatique. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer si les drogues immunosuppressives, administrées après la TH, pouvaient affecter la tolérance immunitaire et/ou influencer la récurrence de l'hépatite C après la transplantation, en interférant notamment avec l'activité des Treg.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a évalué l'implication des Treg dans la progression de la récurrence de l'hépatite C. Il a seulement été décrit une augmentation de la fréquence des Treg CD4+CD25+, dans le sang de patients chroniquement infectés par le VHC (Cabrera *et al.* 2004) et au cours de la récurrence virale C (Perrella *et al.* 2009), et une implication de l'IL-10 dans la suppression de la réponse immunitaire anti-VHC (Delpuech *et al.* 2001).

Nous avons analysé dans un premier temps, l'expression des marqueurs de cellules T régulatrices (nTreg et Tr1) dans le foie des patients chroniquement infectés par le VHC et dans le sérum de patients VHC+ présentant des récurrences minimales ou sévères de l'hépatite C après une transplantation hépatique. Nous avons ainsi montré, pour la première fois, une surexpression des marqueurs des Treg chez les patients évoluant vers le CHC (Article 3) et chez les patients présentant une récurrence sévère 1 an et 5 ans après la transplantation (Article 4), par rapport aux patients VHC négatif. Et c'est plus particulièrement, les marqueurs membranaires associés à la sous-population régulatrice Tr1 (CD49b et CD18) qui sont surexprimés au cours de la récurrence sévère. Par ailleurs, le niveau sérique d'IL-10, cytokine majeure de l'immunosuppression et caractéristique de la sous-population Tr1 fonctionnelle, est spécifiquement et significativement augmentée au cours de la récurrence sévère de l'hépatite C. C'est le cas également pour la cytokine immunosuppressive TGF- $\beta$ , qui est plutôt associée aux T régulateurs CD4+CD25+. La surexpression en périphérie de ces marqueurs cytokiniques a été confortée au niveau

intra-hépatique dans des explants tumoraux autologues (*Article 4*). Nous avons également montré que l'IL-10 peut être prédictive, 1 an après la transplantation, de l'évolution vers une récurrence sévère. Ces découvertes pourraient avoir des implications thérapeutiques importantes dans la prise en charge des patients, dans la mesure où les patients transplantés qui présenteraient de fort taux d'IL-10 en périphérie 1 an post-transplantation, pourraient bénéficier d'un suivi plus important. Ces patients pourraient notamment faire l'objet de l'administration plus précoce de traitements anti-viraux ou de traitements visant plus spécifiquement les acteurs de l'immunosuppression, afin de ralentir la progression de la récurrence.

Par ailleurs, le fait de montrer que l'évaluation de l'expression des marqueurs des cellules T régulatrices en périphérie est suffisante pour prédire ce qui se passe réellement au sein du greffon et de la tumeur est un atout majeur. En effet, la récupération du sérum est plus simple d'accès et surtout il s'agit d'une technique non invasive, facilement utilisable en routine clinique (*Article 4 / Article 7*).

En outre, le fait que nous ayons trouvé une augmentation de la fréquence des Tr1 au cours de la récurrence sévère après une TH est parfaitement corrélé au fait que la prolifération des cellules Tr1 est dépendante de l'IL-15, cytokine justement pas inhibée par les drogues immunosuppressives administrées après la transplantation hépatique (Conti *et al.* 2003). Par ailleurs, il a été montré que les niveaux sériques d'IL-10 et d'IL-15 sont plus élevés au cours de l'infection chronique par le VHC et ce proportionnellement à la sévérité de la pathologie (Kakumu *et al.* 1997); suggérant que les Tr1 pourraient proliférer au cours de l'évolution de la pathologie et ainsi jouer un rôle dans la progression et la sévérité des récurrences après la transplantation.

De manière surprenante, parmi l'ensemble des marqueurs de Treg analysés, nous n'avons pas retrouvé de surexpression du facteur de transcription FoxP3, aussi bien en périphérie qu'en intra-hépatique. Ceci pourrait être expliqué d'une part, par le fait que les Tr1, majoritairement impliqués dans la sévérité des récurrences, n'expriment pas ou que très faiblement ce facteur de transcription (Rahmoun, *et al.* 2006). D'autre part, en ce qui concerne les Treg naturels, FoxP3 ne semble pas être un marqueur spécifique chez l'Homme, en particulier depuis que son expression a également été retrouvée dans les

cellules CD4+CD25<sup>-</sup> après l'activation (Ziegler 2007) (revue). Par contre, de façon intéressante, la protéine FoxP3 serait acétylée dans les nTreg activés, et cet état d'acétylation semble être requis pour la fonction de FoxP3 dans la suppression des Treg. Ainsi, la forme acétylée de FoxP3 pourrait caractériser plus spécifiquement les nTreg, que la forme totale de FoxP3 (Long and Wood 2009) (revue).

Nous avons ainsi montré pour la première fois une implication des Treg dans la sévérité des récurrences de l'hépatite C, après la transplantation hépatique. L'augmentation de l'expression des marqueurs des cellules T régulatrices CD4+CD25<sup>+</sup> et Tr1 dans le sérum et dans le foie de patients VHC positif, par rapport aux patients négatifs pour l'ARN viral, pourrait ainsi expliquer le fait que les patients VHC<sup>+</sup> présentent un risque plus faible de rejet aigu après la transplantation.

Dans la continuité de ce travail, nous avons également montré une corrélation entre la fréquence des Tr1 et la réponse à la thérapie anti-virale après la transplantation (Article 8). Dans cette étude, il a été démontré que le niveau de cellules Tr1, évalué dans le sérum par l'expression du CD49b, était prédictif de la SVR chez les patients en récurrence de l'hépatite C. En effet, des patients avec un faible taux de Tr1, avant l'introduction de la thérapie anti-virale IFN- $\alpha$  / Ribavirine, avaient une meilleure chance de répondre à ce traitement. Par ailleurs, l'effet prédictif du CD49b sur la réponse anti-virale est indépendant du génotype du VHC, bien que les génotypes 1 et 4 soient plus résistants aux traitements que les génotypes 2 et 3. Ces résultats vont dans le sens des travaux précédents, dans la mesure où nous pouvons suggérer qu'une augmentation des Tr1 affecte la réponse anti-virale, favorisant ainsi la réinfection du greffon par le VHC et donc la récurrence.

Cependant, la corrélation entre la fréquence des cellules Tr1 et la réponse virologique n'a pu être basée que sur l'expression du CD49b. Il n'a, en effet, pas été retrouvé de corrélation entre l'expression du CD18 et la réponse anti-virale. De fait, les Tr1 sont décrits comme étant CD18<sup>high</sup> (Rahmoun, *et al.* 2006), or notre étude a été réalisée par Q-PCR, technique avec laquelle il n'est pas possible de distinguer l'expression du CD18 de celle du CD18<sup>high</sup>. Notons de plus, que le CD18 est un marqueur moins spécifique de la population Tr1 que le Cd49b, de par son expression quasi-ubiquitaire dans de nombreux types cellulaires.

La fréquence des Tr1 représente donc un nouvel outil prédictif qui devrait pouvoir aider à la sélection de patients transplantés présentant une récurrence de l'hépatite C et nécessitant une thérapie anti-virale plus soutenue. De plus, comme la thérapie anti-virale chez les patients transplantés est associée à des effets secondaires lourds et à des risques de rejet plus importants (Dumortier *et al.* 2004; Rodriguez-Luna *et al.* 2004\*), il est nécessaire de déterminer spécifiquement les patients nécessitant réellement un traitement aussi soutenu.

En ce qui concerne la population CD4+CD25+FoxP3+, leur fréquence ne semble pas être un facteur prédictif du succès de la thérapie antivirale, après la TH. Il a pourtant été suggéré que cette population régulatrice pouvait prédire le résultat de la thérapie anti-virale, mais au cours de la chronicité de la primo-infection par le VHC (Akiyama, *et al.* 2010). Cette disparité de résultat est probablement due au fait que les thérapies immunosuppressives administrées après la transplantation affectent principalement les Treg naturels, du fait de l'inhibition préférentielle de l'IL-2, cytokine indispensable à leur survie.

Ces résultats sont encourageants mais restent limités par le manque d'analyses fonctionnelles *ex vivo* des Treg. En effet, l'augmentation de la fréquence des Treg observée chez le patient, au cours de la pathogenèse de l'hépatite C, ne signifie pas forcément que ces cellules soient fonctionnelles. Or, il est difficile d'isoler des Treg de patients sous immunosuppression, du fait de leur état lymphopénique et de la faible proportion naturelle des nTreg en périphérie (3 à 5% des PBMC). L'analyse fonctionnelle de la population Tr1 est, quant à elle, encore plus difficile à envisager puisque leur isolement spécifique est toujours impossible à l'heure actuelle.

Ayant confirmé l'importance des populations régulatrices dans la récurrence après une TH, et du fait de l'impact de certaines drogues immunosuppressives sur la fréquence et la fonction des Treg *in vivo* (Demirkiran, *et al.* 2009; Lange, *et al.* 2010; Levitsky, *et al.* 2009; San Segundo, *et al.* 2006); nous avons décidé d'évaluer *in vitro* l'effet direct de ces drogues sur l'activité des Treg. Pour des contraintes techniques d'isolement des Tr1 (citées ci-dessus), nous nous sommes focalisés uniquement sur la population régulatrice CD4+CD25+.

Ainsi, nous avons pu confirmer que la CsA pouvait inhiber l'activité des Treg, comme il avait déjà été retrouvé dans d'autres études (Coenen, *et al.* 2006; Kawai, *et al.* 2005; San Segundo, *et al.* 2006; Wang, *et al.* 2006; Zeiser, *et al.* 2006). Cependant, l'observation majeure que nous avons faite est que la CsA affecte l'activité des Treg uniquement lorsqu'elle est utilisée à une dose thérapeutique de 40 ng/mL (dose administrée au long terme, 5 ans après la transplantation), et que cette inhibition conduit à un shift cytokinique des Treg vers un profil Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) (Article 5). Par ailleurs, la CsA inhiberait l'activité des Treg indépendamment de la voie de la calcineurine. En effet, son analogue NIM811, qui n'a pas d'action sur la calcineurine, affecte également l'activité des Treg ; alors qu'un autre inhibiteur de calcineurine le tacrolimus, maintient leur activité. De plus, le profil de phosphorylation de N-FAT (cible de la calcineurine) n'est pas modifié en présence de différentes doses de CsA (Article 6). Enfin, les corticoïdes, connus pour préserver l'activité des Treg, sont incapables de contrebalancer l'effet inhibiteur de la CsA sur les Treg, contrairement au MMF (Article 6).

En amont de toute expérimentation avec les immunosuppresseurs, nous avons tout d'abord vérifié que les Treg fraîchement isolés des donneurs sains conservaient bien leur capacité à supprimer la prolifération des PBMC activés *in vitro*, et ce à différents ratio Teff : Treg. Nous avons volontairement utilisé le ratio de 2 effecteurs pour 1 suppresseur dans toutes nos expériences, car il était le plus pertinent pour évaluer un effet différentiel des immunosuppresseurs sur l'activité des Treg. Nous avons pu valider que l'activité suppressive des Treg sur la prolifération des PBMC est également corrélée à une inhibition de la capacité des PBMC à sécréter des cytokines telles que l'IL-2 ou l'IFN- $\gamma$  (Thornton and Shevach 1998) et l'IL-10. Par ailleurs, le fait que nous ayons observé une sécrétion maintenue de TGF- $\beta$  dans la coculture de PBMC et de T régulateurs, voire même une légère augmentation, conforte l'importance de cette cytokine dans la fonction suppressive des Treg (Nakamura *et al.* 2004).

Par ailleurs, les cellules CD4+CD25+ sont naturellement anergiques après stimulation *in vitro* par de l'anti-CD3, de l'anti-CD28 (Thornton and Shevach 1998). Cet état d'anergie n'est pas rompu en présence des différents immunosuppresseurs testés, même ceux connus pour induire la prolifération des Treg, tels que la Rapamycine (Figure 42) ou les corticoïdes. En effet, Battaglia *et al.* ont, contrairement à nous (Figure 42), montré que

la rapamycine (100 nM) et de fortes doses d'IL-2 sont suffisantes pour induire la prolifération des Treg murins (Battaglia, *et al.* 2005) et humains (Battaglia, *et al.* 2006) jusqu'à trois semaines. Ces Treg sont plus immunosuppresseurs que les Treg fraîchement isolés. Cependant, il a été suggéré que l'expansion des Treg en présence de rapamycine serait plutôt une conséquence de son action sur les DC (Lopez-Hoyos, *et al.* 2009). Par ailleurs, il a été montré et nous l'avons confirmé, qu'il est possible de forcer *in vitro* la prolifération des Treg, en présence de fortes doses d'IL-2 et de PBMC autologues irradiés (Earle *et al.* 2005; Hoffmann *et al.* 2004). Nous ne nous expliquons pas la nécessité des PBMC irradiés, mais nous pouvons suggérer que leur présence mime l'environnement immunitaire *in vivo*, avec la sécrétion de facteurs nécessaires à la prolifération des Treg et la présence de cellules présentatrices d'antigène. Toutes les drogues immunosuppresseuses testées (CsA, Tac, Rapa, MMF et Dexa) dans ces conditions prolifératives, inhibent la prolifération des Treg de manière dose dépendante (Article 6).

De manière intéressante, nous avons montré, au cours de cette étude, que la dexaméthasone (corticoïde) à une dose thérapeutique de  $10^{-9}$  M pouvait augmenter significativement ( $p < 0.041$ ) la prolifération des Treg. Aucune étude n'avait, jusqu'à présent, montré cet effet direct *in vitro*. Par contre, chez des patients sous corticothérapie, des études ont déjà décrits une augmentation de la fréquence et de l'activité suppressive des Treg, ainsi qu'une augmentation de l'expression des molécules CD25 et FoxP3, (Azab, *et al.* 2008; Braitch, *et al.* 2009; Karagiannidis, *et al.* 2004). Ce résultat est cohérent dans la mesure où les corticoïdes sont connus pour induire l'expression du GITR sur les Treg, molécule associée à leur fonction suppressive (Lopez-Hoyos, *et al.* 2009). De plus, Liao *et al.* ont également montré que l'activation du GITR est impliquée dans la capacité suppressive des Treg et induit leur prolifération après la stimulation par le TCR (Liao *et al.* 2010). Dans ce contexte, il apparaît crucial d'évaluer les effets physiologiques de la dexaméthasone sur les Treg. On pourrait en effet imaginer que l'utilisation des corticoïdes, à faibles doses afin de s'affranchir de leurs effets indésirables, pourrait permettre la multiplication *ex vivo* des Treg en vue d'une utilisation thérapeutique.

Mais, le résultat majeur de cette étude est le fait qu'une dose de 20 ou 40 ng/mL de CsA inhibe la capacité suppressive des Treg, alors que des doses plus élevées, allant de

100 à 400 ng/mL, n'ont pas d'effet sur l'activité des Treg (*Article 5 / Article 6*). Les résultats, concernant un effet différentiel de la CsA selon sa concentration, sont en accord avec ceux d'une étude de 2005, où il a été montré, dans un modèle murin de greffe cardiaque, que la CsA avait un effet différentiel sur les Treg, selon la concentration utilisée. Cependant, dans ce modèle, la CsA inhibe l'activité des Treg lorsqu'elle est utilisée à forte dose (50 mg/kg vs 10 mg/kg) (Kawai, *et al.* 2005). Ainsi, même si toutes les études s'accordent sur le fait que la CsA a un effet délétère sur le nombre de Treg circulant après la transplantation (Korczak-Kowalska, *et al.* 2007; Segundo *et al.* 2006), son effet sur l'activité suppressive des Treg humains reste parfois controversé. En effet, certaines équipes ont observé une altération de l'activité régulatrice des Treg en présence d'inhibiteurs de calcineurine, alors que d'autres ont observé une activité similaire à celle observée chez les patients traités par la rapamycine (Lopez-Hoyos, *et al.* 2009). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les marqueurs utilisés lors de la caractérisation des Treg diffèrent selon les études. En effet, la CsA n'inhiberait pas l'activité suppressive des Treg CD4+CD25+ mais altérerait l'activité de la fraction hautement suppressive CD4+CD25<sup>high</sup>CD27<sup>high</sup> (Coenen, *et al.* 2006). Cependant, de façon consensuelle, il est généralement admis que la CsA inhibe l'activité suppressive des Treg, alors que la rapamycine, les corticoïdes ou le MMF la préserve (Abadja, *et al.* 2009; Kopf, *et al.* 2007).

C'est dans le but de mieux comprendre comment la CsA pouvait inhiber l'activité des Treg, que nous avons analysé par cytométrie de flux son effet direct sur les Treg. Ainsi, nous avons pu observer, de manière surprenante, qu'une faible dose de CsA (40 ng/ml) augmente légèrement mais pas significativement l'expression du CD25 (*Article 6*). Par contre, l'expression du facteur de transcription FoxP3, protéine décrite comme essentielle à l'activité des Treg (Campbell and Ziegler 2007), est légèrement diminuée en présence de cette faible dose de CsA (*Article 6*). De la même façon, la CsA ne modifie pas l'expression du CD127 sur les Treg (*Article 6*). Le CD127 est le récepteur  $\alpha$  à l'IL-7, cytokine essentielle au maintien des T effecteurs *in vivo*. Les Treg sont CD127-/low, alors que les cellules CD4+CD25- expriment cette protéine (Liu, *et al.* 2006; Seddiki, *et al.* 2006). Seddiki *et al.* ont ainsi montré que toutes les cellules CD4+CD127-/low ont une activité suppressive et sont anergiques, indépendamment de l'expression du CD25 (Seddiki, *et al.* 2006). Ainsi, le CD127 semble être un marqueur plus fiable que le FoxP3 dans la caractérisation de Treg

humains CD4+CD25+ fonctionnels. Cependant, sa spécificité n'est pas absolue depuis que sa sous-expression a également été retrouvée sur les lymphocytes T après l'activation (Liu, *et al.* 2006; Seddiki, *et al.* 2006). Par ailleurs, Klein *et al.* ont récemment montré que 1/3 des cellules CD127<sup>-</sup> étaient FoxP3<sup>-</sup>, et inversement, 1/3 des CD127<sup>+</sup> sont FoxP3<sup>+</sup>. Ceci suggère que le CD127 pourrait être un marqueur d'une population de lymphocytes T régulateurs différentes des CD4+CD25+FoxP3<sup>+</sup> (Klein, *et al.* 2010). Néanmoins, en dehors de la grande difficulté à trouver des marqueurs spécifiques des Treg, les faibles modifications de l'expression protéique des cellules CD4+CD25+ observées en présence de faibles doses de CsA, ne sont pas significatives et ne peuvent donc pas expliquer l'inhibition de l'activité des Treg en présence de CsA. De la même manière, la CsA n'a pas non plus d'impact significatif sur le transcriptome des Treg, hormis pour l'IL-4 et le GITR qui sont surexprimés en présence de fortes doses de CsA (Article 6). L'IL-4 est inductrice des Treg à partir de cellules CD4+CD25<sup>-</sup> (Wan and Flavell 2006) (revue), quant au GITR il a été montré comme étant impliqué dans la fonction suppressive des Treg (Liao, *et al.* 2010). Ainsi, la sur-expression de ces deux gènes en présence de fortes doses de CsA (400 ng/mL) est en corrélation avec le maintien de l'activité des Treg à cette dose.

Concernant le profil de sécrétion cytokinique, analysé par ELISA, et en accord avec d'autres études, nous avons observé que les Treg ne produisent pas d'IL-10 mais sécrètent un niveau basal d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2, qui est abrogé par l'activation anti-CD3, anti-CD28 (Campbell and Ziegler 2007). En effet, il est clairement décrit qu'au cours de l'activation FoxP3 joue un rôle de répresseur transcriptionnel sur le facteur de transcription NFAT et inhibe ainsi la transcription de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  par les Treg. Par contre, la cytokine immunosuppressive TGF- $\beta$  est produite par les Treg et sa sécrétion est augmentée suite à l'activation (Figure 43).

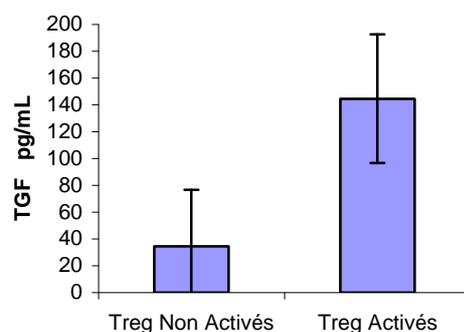


Figure 43 : Augmentation de la sécrétion de TGF- $\beta$  suite à l'activation des Treg.

Nous n'avons pas retrouvé, au cours de cette étude, de modifications de la sécrétion des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- $\beta$  en présence de faibles doses de CsA (40 ng/ml). Cependant, en présence de cette dose thérapeutique, nous avons observé une augmentation inattendue et significative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  (*Article 5 / Article 6*). Il semblerait donc que l'inhibition de l'activité des Treg par de faibles doses de CsA résulte en un « *shift* cytokinique » en faveur de cytokines pro-inflammatoires de la voie Th1. Cette production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  en présence de 40 ng/mL de CsA pourrait d'expliquer le regain de prolifération des PBMC observé dans les MLR en présence de CsA.

Sachant que la CsA inhibe la transcription de l'IL-2 et que FoxP3 est connu pour inhiber la production d'IL-2 via une inhibition de N-FAT (Bettelli *et al.* 2005; Torgerson *et al.* 2009); et qu'aucune modification de l'expression de FoxP3 n'est observée en présence de faibles doses de CsA; il semblait raisonnable de se demander si la CsA peut favoriser la production d'IL-2 via une voie calcineurine / N-FAT indépendante.

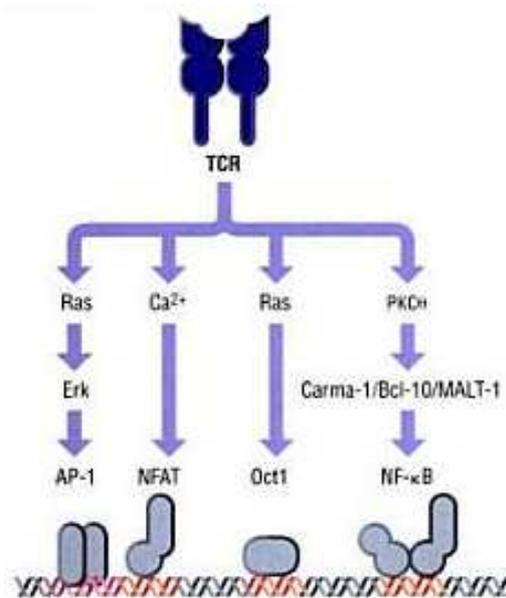
Dans le but de déterminer par quelle voie passe la CsA pour inhiber les Treg et pour induire une production inattendue d'IL-2, nous avons testé, sur l'activité des Treg, un analogue non immunosuppresseur de la CsA : NIM811. L'utilisation de cet analogue est très intéressante, de par son mécanisme d'action intracellulaire différent de celui de la CsA. En effet, comme la CsA, NIM811 est capable d'inhiber la glycoprotéine P, canal de résistance multi-drogue permettant le relargage des drogues en dehors du cytoplasme. Cependant, il n'est pas capable d'inhiber l'activité de la calcineurine (Kallen J 1997). De manière intéressante, nous avons observé que NIM811, qui est décrit comme n'ayant pas d'activité suppressive, est capable d'inhiber de manière dose dépendante la prolifération des PBMC activés et des Treg induites. Et surtout, nous avons montré que NIM811 est également capable de supprimer l'activité des Treg, comme la CsA, uniquement à des faibles concentrations (*Article 6*). De plus, le tacrolimus, un inhibiteur de calcineurine comme la CsA, est lui incapable d'inhiber l'activité des Treg et ce à des doses thérapeutiques équivalentes de la CsA (Tac 2 ng/mL équivalent à CsA 20 ng/mL) (*Article 6*). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'effet inhibiteur de la CsA (20 et 40 ng/ml) sur l'activité des Treg serait indépendant de la voie calcineurine / N-FAT. Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse du profil de phosphorylation de la protéine N-FAT en présence de CsA. En effet, nous n'avons pas observé de modification de l'état de

déphosphorylation de N-FAT en présence de 20 ou 40 ng/mL de CsA, écartant l'hypothèse d'une activation de la voie N-FAT qui aurait pu expliquer la levée de l'inhibition de l'expression de l'IL-2 (Article 6).

Cet effet de la CsA sur la sécrétion d'IL-2 est surprenant, dans la mesure où l'effet immunosuppresseur de la CsA est attribué à une inhibition de la transcription de l'IL-2 (Kallen J 1997). Cependant, certaines études ont montré que la CsA n'inhibait pas complètement la sécrétion de l'IL-2, au vu des 20% d'IL-2 encore détectés dans les surnageants de culture de lymphocytes T activés en présence de cette drogue. Quant à l'ajout exogène d'IL-2 dans les cultures en présence de CsA, il ne permet pas de restaurer la prolifération lymphocytaire, suggérant que l'inhibition de la synthèse de l'IL-2 ne doit pas être le seul mode d'action employé par la CsA pour inhiber les lymphocytes T (Di Padova 1990). Par ailleurs, Bollyky *et al.* ont montré que la stimulation du CD44 favorise la sécrétion d'IL-2 par les Treg de manière N-FAT indépendante et qu'un traitement stimulant le CD44 permet d'empêcher l'inhibition de la transcription de l'IL-2 par la CsA (Bollyky *et al.* 2009). De plus, il a été démontré une altération de la voie N-FAT et une diminution de l'activité de la calcineurine dans les Treg murins (Sumpter *et al.* 2008). Ces études suggèrent donc que la CsA pourrait passer par une autre voie de signalisation dans les Treg, afin de favoriser une sécrétion d'IL-2.

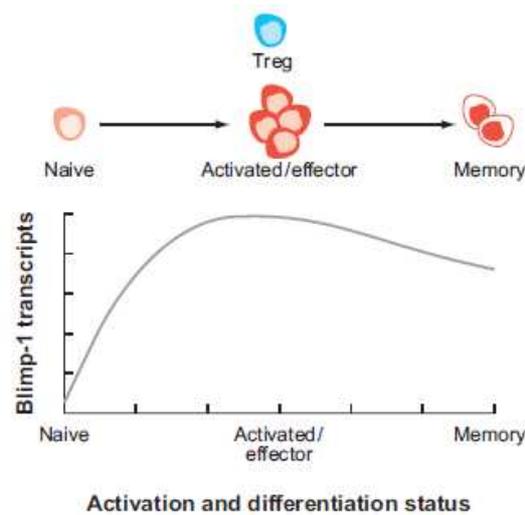
Au cours de ma thèse, je n'ai pas eu le temps de caractériser spécifiquement la voie d'action de la CsA (20 et 40 ng/ml) sur la transactivation de l'expression de l'IL-2, dans les Treg. Ainsi, une des perspectives de ce travail serait d'analyser plus finement les mécanismes moléculaires mis en jeu par la CsA à faible dose, et conduisant à une augmentation de l'expression de l'IL-2 par les Treg. Une des premières pistes serait de déterminer si la CsA n'interagit pas, en fonction de sa concentration avec d'autres voies de transcription de l'IL-2 et notamment avec la voie des MAP-kinases (AP1) et la voie IKK (NFκB). En effet, le promoteur du gène IL-2 contient les sites de liaison pour au moins 4 facteurs de transcription (AP-1, NFAT, oct1 et NFκB) qui, ensemble contribuent à assurer un taux maximal de transcription de l'IL2. Ces facteurs de transcription sont activés par des voies déclenchées en aval du signal TCR (voir Introduction - Chapitre Le système immunitaire : les lymphocytes CD3+ - C). Ainsi, l'augmentation du calcium suffit à activer

**N-FAT**, le DAG quant à lui active la protéine kinase cytoplasmique PKC $\theta$  stimulant le facteur de transcription **NF $\kappa$ B**. Le DAG active également Ras qui en retour active Erk, une MAPK très importante dans l'activation de Fos qui, en liaison à Jun, va former le facteur de transcription **AP-1**. Ras active également **Oct1** dont le rôle n'est pas clairement défini (Figure 44).



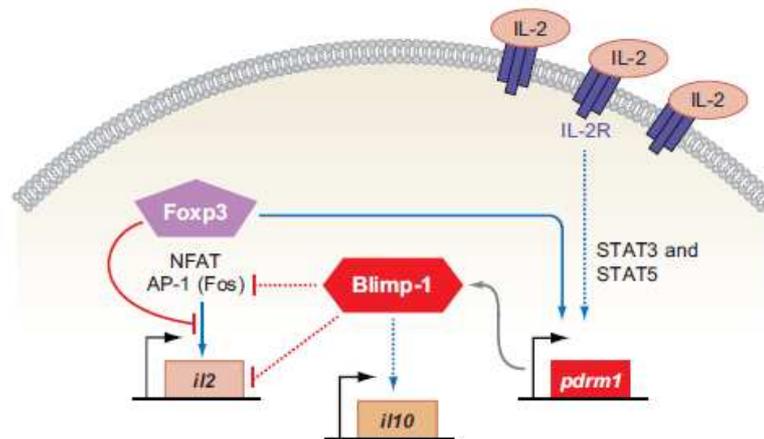
**Figure 44 : Activation de la transcription de l'IL-2 par les signaux TCR.** L'activation de la transcription de l'IL-2 nécessite la fixation d'au moins 4 facteurs de transcription sur son promoteur : AP-1, N-FAT, Oct1 et NF $\kappa$ B.

Outre ces différents facteurs de transcription, nous souhaiterions également nous intéresser à la protéine **Blimp-1** (*B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1*) et plus particulièrement à la sur-expression de cette protéine dans les Treg. En effet, au cours de ces trois dernières années, cette protéine a été impliquée dans la voie de signalisation de l'IL-2 dans les lymphocytes T. Blimp-1 diminuerait la prolifération des cellules T, via la répression de la transcription de l'IL-2 et favoriserait ainsi l'apoptose de ces cellules (Martins and Calame 2008) (revue). Par ailleurs, Blimp-1 semble être impliquée dans la biologie des Treg. En effet, l'expression de son ARNm est retrouvée à un niveau élevé dans les Treg naturels (Figure 45) et le KO de Blimp-1 dans les cellules T murines conduit au développement de pathologies inflammatoires.



**Figure 45 : Expression de Blimp-1 dans les cellules T.** L'ARNm de Blimp-1 est présent à un faible taux dans les T CD4+ et CD8+ naïves, à un taux élevé dans les cellules T effectrices activées et à un niveau modéré dans les cellules T CD8+ mémoires et quelques T CD4+ mémoires. Les cellules T régulatrices naturelles CD4+CD25+ fraîchement isolées expriment l'ARNm de Blimp-1 au même niveau que les cellules T CD4+ non régulatrices.

Cependant, l'absence de Blimp-1 n'altère ni le développement, ni la fonction suppressive *in vitro* des Treg. L'effet sur l'activité des Treg *in vivo* pourrait être différent grâce au rôle joué par Blimp-1 dans l'activation de la transcription de l'IL-10, cytokine impliquée dans la fonction suppressive des Treg dans certaines conditions pathologiques (Martins and Calame 2008) (revue). Par ailleurs, il a été suggéré que FoxP3 lui-même activerait la transcription de Blimp-1, qui en retour inhiberait la transcription de l'IL-2, soit directement, soit indirectement via une action sur les facteurs de transcription AP-1 et NFAT (Figure 46) (Martins and Calame 2008).



**Figure 46 : Modèle de l'implication de Blimp-1 dans les Treg.** Blimp-1 serait induit directement par FoxP3 et la signalisation du récepteur à l'IL-2. Blimp-1 inhiberait directement la transcription d'IL-2 et activerait la transcription d'IL-10. Les lignes en pointillés représentent des voies non confirmées dans les Treg.

Ainsi, Blimp-1 serait une molécule centrale dans la voie de transcription de l'IL-2. Il serait donc intéressant d'analyser l'effet de la CsA sur l'expression de Blimp-1 dans les Treg et de déterminer si l'augmentation de l'expression de l'IL-2 pourrait être liée à une sous-expression ou une inhibition de Blimp-1 dans les Treg.

En ce qui concerne l'augmentation inattendue de la production de l'IFN $\gamma$  par les Treg lorsqu'ils sont soumis à de faibles concentrations de CsA, il faudra confirmer ce résultat, notamment par des analyses en ELISPOT qui nous permettront de quantifier le nombre de Treg sécrétant de l'IFN- $\gamma$ . Et afin de déterminer plus précisément le rôle joué par la CsA sur la production d'IFN- $\gamma$ , il serait intéressant d'analyser plus spécifiquement l'effet de cet immunosuppresseur sur sa voie de transcription.

Dans notre étude, nous avons également analysé l'effet des corticoïdes, et plus particulièrement de la dexaméthasone, sur les Treg. Les corticoïdes sont connus pour augmenter la fréquence des Treg, ainsi que l'expression de leurs molécules fonctionnelles telles que le CD25 et le FoxP3 (Azab, *et al.* 2008; Braitch, *et al.* 2009; Karagiannidis, *et al.* 2004), mais ne favoriseraient par contre pas leur activité suppressive (Prado, *et al.* 2010). Nous avons confirmé *in vitro* que la dexaméthasone pouvait augmenter légèrement l'expression du CD25 (non présenté) et qu'elle pouvait augmenter *in vitro* leur prolifération (Article 6).

Or, dans la mesure où les protocoles de traitement anti-rejet reposent sur la combinaison de plusieurs médicaments immunosuppresseurs, il était important d'étudier ces associations sur l'activité des Treg. Ainsi, les combinaisons d'immunosuppresseurs les plus utilisées sont : la bithérapie inhibiteurs de calcineurine (CsA, Tac) / corticoïdes (Dexa), inhibiteurs de calcineurine / anti-métabolites (MMF), ou des trithérapies inhibiteurs de calcineurine / anti-métabolites / corticoïdes. Les corticoïdes sont administrés au cours de la première année de traitement et à plus long terme au cours des épisodes de rejet. Il nous a semblé intéressant d'analyser l'effet combiné des corticoïdes et de la CsA à faible dose sur l'activité des Treg. Dans ces conditions, nous avons observé dans les cocultures de PBMC et de Treg, en présence de 40 ng/mL de CsA, que l'ajout de dexaméthasone ne permettait pas de « réverser » l'effet inhibiteur de la CsA sur l'activité des Treg. Il semblerait donc que la CsA bloque l'action potentialisatrice des corticoïdes sur les Treg

(Article 6). Cependant, comme l'a suggéré Prado en 2010, l'augmentation de la fréquence des Treg et de l'expression de leurs marqueurs fonctionnels (tel que FoxP3), en présence de corticoïdes, n'ai pas forcément corrélé à leur fonction régulatrice. Ainsi, les corticoïdes pourraient ne pas être des potentialisateurs de l'activité suppressive des Treg (Prado, et al. 2010).

Parallèlement, nous avons analysé l'effet de la bithérapie CsA/MMF sur l'activité des Treg. *In vivo*, le MMF serait capable de réverser l'effet délétère des anti-calcineurines sur les Treg (Demirkiran, et al. 2009). C'est ce que nous avons confirmé dans la coculture de PBMC/Treg, en présence de CsA, le MMF est bien capable de contrebalancer l'inhibition de l'activité des Treg par la CsA (Article 6).

Dans le futur, l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'activité des Treg en présence de faibles doses de CsA, devrait permettre de mieux comprendre l'effet de la CsA sur les Treg et la raison pour laquelle les corticoïdes ne peuvent pas « réverser » cet effet.

Dans la continuité de ces travaux, il serait pertinent de compléter cette étude en élargissant le panel d'immunosuppresseurs, et en nous intéressant plus particulièrement aux immunosuppresseurs en cours d'évaluation dans la transplantation. En effet, nous souhaiterions analyser des IS non conventionnels et en particulièrement les anticorps anti-récepteurs, tels que le basiliximab (anti IL-2R) ou le Belatacept (CTLA-4 Ig), et les nouvelles molécules chimiques en développement, comme les analogues de sphingosine (FTY720). Et enfin, il serait intéressant que cette étude se poursuive aussi en évaluant l'impact sur l'activité des Treg, de nouveaux traitements anti-viraux et notamment d'analogues semi-synthétiques de la CsA (inhibiteurs de CyP : Debio025 et SCY-635), ainsi que des inhibiteurs à la fois de JAK et de la protéine kinase C.

L'ensemble de l'étude que nous avons réalisée, concernait l'effet des immunosuppresseurs conventionnels sur des Treg isolés de donneurs sains, mais il serait intéressant à plus long terme de conforter les résultats obtenus *in vitro* à la sévérité de la récurrence chez le patient transplanté. Pour se faire, nous pourrions envisager de caractériser les Treg isolés *ex vivo* de patients transplantés hépatiques pour cause de

cirrhose C et ayant reçu des protocoles d'immunosuppression différents. Ces patients pourraient être classés non seulement selon le protocole d'immunosuppression reçu, mais également selon la sévérité de la récurrence et les éventuels épisodes de rejet observés, afin d'établir un lien entre immunosuppresseurs et récurrence et/ou rejet. Après avoir isolé les Treg des patients transplantés, ils pourraient être caractérisés, en termes de phénotype, de prolifération, d'expression de gènes et de sécrétion cytokinique. Par ailleurs, l'analyse des modifications éventuelles de leur activité suppressive sur des PBMC autologues ou hétérologues activés pourrait être envisagée. Ces travaux pourraient également être complétés par une étude épidémiologique rétrospective. La perspective de ce travail serait de pouvoir établir une corrélation statistique significative entre les différentes combinaisons d'immunosuppresseurs testées, et la sévérité du rejet ou de la récurrence observée chez les patients ayant reçu le même protocole d'immunosuppression. Ces deux types d'étude seraient réalisables grâce notre étroite collaboration avec des services cliniques de la transplantation hépatique

En tout état de cause, l'un des objectifs actuels des transplantateurs est de réduire l'immunosuppression voire de l'éliminer, du fait des nombreux effets indésirables des différents traitements immunosuppresseurs. De plus, il faut noter que les patients transplantés hépatiques présentent un risque 2 à 4 fois plus élevé de développement de cancers *de novo*, souvent lié au phénomène de « sur-immunosuppression » (Herrero 2009) (revue). Ces tumeurs représentent ainsi une des causes majeures de mortalité à long terme après la TH. Malheureusement, il n'y a, à l'heure actuelle, aucun moyen de détecter cet état de « sur-immunosuppression », du fait de l'absence de corrélation entre les taux sanguins d'immunosuppresseurs et l'apparition de ces cancers. Dans ce sens, il a été montré que la fréquence des cellules CD8+CD28+ (< 0,4%) pouvait être prédictive du développement de cancers *de novo* après la TH (Boleslawski *et al.*, à paraître, *Liver Transplantation* 2010). Dans cette étude, il n'a pas été retrouvé d'effet des concentrations sanguines de CsA ou de Tac sur l'expression du CD28. De plus, comme les molécules de stimulation, second signal de la réponse immunitaire T, tiennent un rôle important dans l'immunité anti-tumorale, il serait intéressant d'analyser leurs implications dans le développement du CHC.

Ainsi, dans le contexte où une réduction de l'immunosuppression après la transplantation semble requise, différents outils prédictifs s'offriraient aux transplantateurs, afin de faciliter le suivi des patients après la TH. En effet, l'utilisation de la sous-expression du CD28 comme marqueur de « sur-immunosuppression » pourrait être un outil de choix dans la sélection des patients nécessitant une diminution des doses d'immunosuppresseurs, au risque de développer des cancers *de novo*, voire d'aggraver la récurrence du CHC. Par ailleurs, l'analyse de la fréquence des Treg à 1 an post-TH pourrait également permettre de prédire la sévérité des récurrences de l'hépatite C à 5 ans. Et enfin, l'analyse de la fréquence de la sous population régulatrice Tr1 devrait également permettre de prévoir l'efficacité de la thérapie anti-virale.

**En conclusion**, nos résultats suggèrent qu'une dose thérapeutique de CsA inhibe l'activité des Treg CD4+CD25+. Or, les cellules T régulatrices jouent un rôle important dans la tolérance du greffon après transplantation et leur inhibition par la CsA pourrait alors favoriser le rejet du greffon. Par ailleurs, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les Treg, en présence de CsA, pourrait également favoriser le développement de cellules T effectrices spécifiques des antigènes du greffon. Ceci pourrait donc expliquer le fait que la CsA ait été associée à un risque de rejet plus fréquent que d'autres immunosuppresseurs (Rayhill, *et al.* 2006; Villamil, *et al.* 2006). Cependant, supprimer la fonction des Treg en leur faisant sécréter des cytokines favorisant le développement de cellules T effectrices pourrait permettre l'émergence d'une réponse immunitaire anti-virale contre le VHC, et ainsi diminuer la sévérité des récurrences après la transplantation. Cette hypothèse expliquerait les récurrences moins sévères observées au cours du traitement par la CsA chez les transplantés hépatiques (Rayhill, *et al.* 2006; Villamil, *et al.* 2006). D'autant que, la CsA est connue pour avoir un effet anti-viral direct sur la réplication du VHC (Nakagawa, *et al.* 2004).

*Ces résultats sont importants dans la mesure où la transplantation hépatique est à l'heure actuelle la seule alternative de survie au stade du carcinome hépatocellulaire, et qu'il n'existe aucun traitement efficace contre le rejet du greffon ou la récurrence de l'hépatite C. Le traitement immunosuppresseur idéal n'existe toujours pas, mais il ne devrait pas augmenter*

*l'activité suppressive des Treg, au risque de favoriser la récurrence de l'hépatite C, et ne devrait pas non plus inhiber cette activité, au risque de favoriser le rejet du greffon.*

***Ainsi, nous nous retrouvons face à un dilemme auquel il faudra tenter de répondre tout en respectant un équilibre fragile dépendant principalement de la fréquence des Treg. A cette grande complexité, s'ajoute bien évidemment l'ambition de vouloir utiliser les Treg comme un outil clinique ou comme une cible thérapeutique, sans trop perturber l'homéostasie cellulaire au risque peut-être de favoriser l'émergence d'autres pathologies (auto-immunes, inflammatoires, cancéreuses...). Je vous propose pour finir ce manuscrit de poursuivre cette réflexion en discutant du potentiel thérapeutique offert par le « maniement » éventuel des lymphocytes T régulateurs.***

## LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS : UN POTENTIEL THERAPEUTIQUE ?

Au vu de l'implication des Treg dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, qu'elle soit bénéfique (tolérance fœto-maternel, tolérance des greffes, maladies auto-immunes et infection) ou délétère (développement tumoral, infection), de nombreux groupes ont cherché à établir des modèles expérimentaux de thérapie basés sur l'utilisation ou l'éradication fonctionnelle de ces cellules.

De nombreuses équipes de recherche ont travaillé sur des thérapies alternatives visant à manipuler le système immunitaire : les thérapies géniques ainsi que les thérapies cellulaires. Les thérapies géniques, se basant sur le potentiel immunorégulateur des Treg, consisteraient à réaliser *ex vivo* des transferts de gènes codant des protéines conférant une activité régulatrice à des cellules T effectrices. De bons candidats seraient par exemple les gènes codant des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Une autre stratégie intéressante serait de forcer l'expression ectopique de Foxp3 dans les cellules T pathogéniques, spécifiques par exemple des allo-antigènes du donneur dans le cas de transplantation d'organes ou d'auto-antigènes dans le cas des maladies auto-immunes. Cela permettrait la génération stable de cellules T antigène-spécifique possédant une activité suppressive (Roncarolo and Battaglia 2007) (revue). Les thérapies visant à manipuler les cellules du système immunitaire pour induire un état de tolérance ainsi que celles consistant à manipuler et/ou amplifier certaines sous-populations immunitaires *ex vivo* telles que les DC ou des populations lymphocytaires T régulatrices (les Treg naturels, les lymphocytes Tr1 ou bien des populations de lymphocytes TCD8+CD45RClow régulateurs) sont très prometteuses en clinique humaine. De nombreuses stratégies thérapeutiques réalisées dans des modèles animaux et ayant pour but de faire émerger le compartiment lymphocytaire régulateur ont été développées.

### A - Apport dans la transplantation d'organes

Il a été en effet bien documenté dans des modèles murins que l'utilisation de Treg CD4+CD25+Foxp3+ fraîchement isolés, amplifiés *in vitro* de manière polyclonale ou bien

pré-activés *in vitro* avec les allo-antigènes du donneur, permettent la tolérance à long terme d'une allogreffe médullaire en évitant l'apparition de GVHD (Cohen *et al.* 2002; Hanash and Levy 2005; Joffre, *et al.* 2004). Cependant, la combinaison du transfert adoptif de Treg avec d'autres thérapies favorisant la tolérance pourrait permettre de prolonger davantage la survie du greffon.

Il est ainsi envisageable d'utiliser des thérapies combinant l'administration de **rapamycine** avec un transfert adoptif de Treg autologues amplifiés *ex vivo*. La rapamycine est une drogue immunosuppressive ciblant mTOR (voir Introduction – Chapitre Lymphocytes T Régulateurs et Immunosuppresseurs - C) et bloquant l'expansion des cellules T effectrices sans altérer l'expansion ni la fonction suppressive des Treg. Cela a été démontré *in vivo* chez la souris (Battaglia, *et al.* 2005), *in vitro* chez l'homme (Battaglia, *et al.* 2006) mais aussi chez des patients ayant reçu une allogreffe rénale (Segundo, *et al.* 2006). En effet, la co-administration de faibles doses de rapamycine et de Treg spécifiques du donneur (expandus *ex vivo*) serait la clé de l'induction d'une tolérance immunitaire spécifique et à long terme ; le traitement par Treg ou rapamycine seul n'étant pas suffisant (Zhang *et al.* 2010). Ces résultats ont été très récemment confirmés dans un modèle de greffe rénale chez le singe. Il a été montré que le transfert adoptif de Treg spécifiques des antigènes du donneur (expandus *in vitro* en présence de DC irradiées pulsées) ou le traitement avec de faibles doses de rapamycine (0,5 mg/kg/jour) prolongent la survie du greffon d'environ 25 jours par rapport aux rats non traités (médiane de survie : 32 jours versus 7 jours) ; et la thérapie combinée (Treg + rapamycine) permet d'allonger la durée de vie du greffon à 48 jours (Ma *et al.* 2010). De la même manière, une thérapie combinée de rapamycine et d'anticorps anti-CD154 (CD40-Ligand, membre de la superfamille TNF) permet une survie indéfini de la xénogreffe, grâce à une augmentation précoce de la fréquence des Treg au sein du greffon (Muller *et al.* 2010). Il a également été montré que la co-administration de la rapamycine et de la protéine de fusion TGF- $\beta$ 1 / Fc permet le développement *de novo* de Treg FoxP3+ et permet la survie à long terme d'une allogreffe d'ilôts pancréatiques (Zhang *et al.* 2010\*).

Une autre approche intéressante est celle qui a été proposée par le groupe de Waldmann et qui a montré que l'injection d'**anticorps non déplétants** (seul ou en combinaison) et dirigés contre des molécules de surface des lymphocytes T (CD4, CD8,

CD40L) permet d'induire un état de tolérance vis-a-vis de greffes d'organes ou de tissus allogéniques (Qin *et al.* 1990; Waldmann and Cobbold 1998). Ainsi, plus récemment, la déplétion lymphocytaire des T CD4 et CD8, par des anticorps déplétants, a permis de favoriser la prolifération *in vivo* des Treg injectés et la survie de greffe de peau chez la souris (Park *et al.* 2010). Cet effet peut être augmenté par l'administration d'un complexe **IL-2 / anti-IL-2**. En effet, l'administration d'un cocktail associant de l'IL-2 et un anticorps anti-IL-2 permet, chez la souris, de créer une tolérance indéfinie à la greffe d'ilots pancréatiques. En effet, ce traitement de 3 jours provoque une expansion des Treg (> 10 fois), et qui ont une activité suppressive plus importante que les Treg de souris non traitées (Webster *et al.* 2009).

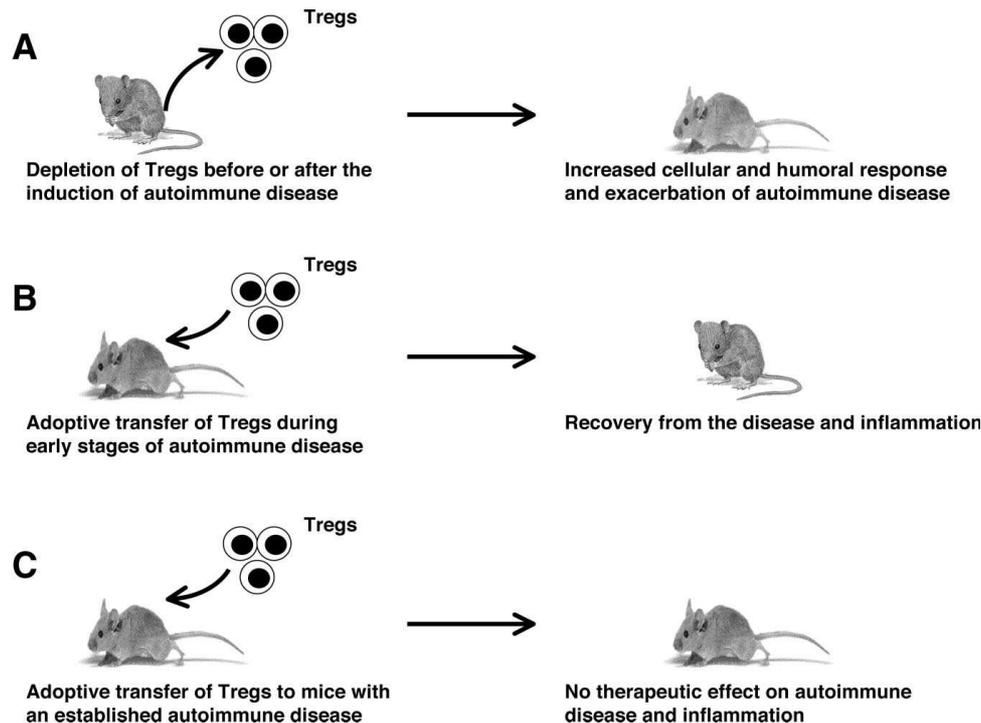
Il est également possible de cibler directement des molécules exprimées par les Treg, comme le **GITR** dont la ligation par son ligand inhibe l'activité des Treg. Une équipe a ainsi créé une protéine de fusion du GITR (GITR-Fc) qui séquestre le ligand du GITR et empêche son activation. L'injection du GITR-Fc à des souris permet de prolonger la survie de greffes de peau, et ce, par un mécanisme dépendant des Treg. Par ailleurs, l'association du GITR-Fc avec un anticorps anti-CD154 (CD40 Ligand) permet de potentialiser cet état de tolérance (Kim *et al.* 2010).

Une autre approche, réalisée dans une greffe hépatique chez le rat, a consisté en l'injection 7 jours avant la greffe de lymphocytes du donneur préalablement irradiés. Ce transfert de **lymphocytes apoptotiques** permet une augmentation de la fréquence des cellules T régulatrices dans le sang et ainsi une augmentation de la survie du greffon (Cheng *et al.* 2009).

## **B - Apport dans les pathologies auto-immunes et immuno-inflammatoires**

De nombreuses études précliniques réalisées dans des modèles animaux ont montré que le transfert adoptif de Treg est capable de prévenir le développement de pathologies autoimmunes ou immuno-inflammatoires telles que : le diabète de type 1, l'EAE, la RA, ... (Roncarolo and Battaglia 2007) (revue) (Figure 47).

Les travaux montrant que le transfert adoptif de Treg peut corriger une pathologie auto-immune active et déjà établie sont plus rares (Mottet *et al.* 2003; Tang *et al.* 2004; Tarbell *et al.* 2007).



**Figure 47 : Rôle des Treg dans les maladies auto-immunes : leçons des modèles expérimentaux.** (A) la déplétion des Treg, avant ou après l'induction de la pathologie conduit à une augmentation des réponses immunitaires cellulaire et humorale et à l'exacerbation de la pathologie. (B) le transfert adoptif de Treg au moment de l'induction de la maladie permet de diminuer la sévérité de l'inflammation, suggérant un rôle des Treg dans les stades précoces de développement des maladies auto-immunes. (C) le transfert de Treg apparaît inefficace sur des pathologies chroniques inflammatoires déjà établies, en partie dues à l'influence des DC chroniquement activées (Andre, et al. 2009).

Le groupe de Powrie a montré en 2003 que l'**injection de Treg polyclonaux** dans le traitement d'une pathologie inflammatoire intestinale déjà établie (modèle murin de l'IBD) permettait d'éliminer les infiltrats lymphocytaires pathogéniques au niveau de la lamina propria intestinale et de rétablir une architecture intestinale physiologique (Mottet, et al. 2003). Après expansion *ex vivo* de Treg stimulés par des DC autologues présentant des antigènes des îlots pancréatiques, Tarbell et al. ont montré que l'injection de ces Treg antigène-spécifiques permettait de corriger un diabète auto-immun déjà établi chez une souris NOD (*Non-Obese Diabetic*) de treize semaines. Les souris traitées avec succès possèdent toujours des cellules T diabétogéniques mais elles présentent parallèlement un nombre accru de cellules FoxP3+ au niveau des ganglions lymphatiques drainant le pancréas (Tarbell, et al. 2007). Un travail du groupe de Kuchroo a, parallèlement, montré que le traitement de pathologies auto-immunes à l'aide de Treg générés *ex vivo* devait être associé à un contrôle de l'inflammation tissulaire locale. En effet, en utilisant un modèle murin d'EAE ils ont montré qu'au pic de la pathologie, les Treg spécifiques d'un

peptide de l'EAE étaient capables d'inhiber des lymphocytes T effecteurs de même spécificité isolés à partir de la rate mais incapables d'inhiber ces mêmes effecteurs lymphocytaires isolés à partir du système nerveux central. L'importante production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF) par ces lymphocytes T effecteurs recrutés au niveau du système nerveux central inhibe l'activité suppressive des Treg (Korn *et al.* 2007).

L'utilisation de Treg polyclonaux semble fonctionner dans des animaux lymphopéniques où l'expansion de ces cellules est possible et où un pool suffisant de Treg ayant une spécificité pour les auto-antigènes d'intérêt est constitué. Cependant, dans un hôte immunocompétent, les travaux actuels semblent indiquer la nécessité d'injecter des Treg ayant une spécificité antigénique pour les auto-antigènes d'intérêt. Cela rend donc plus complexe la mise en place de protocoles cliniques de thérapie cellulaire chez des patients atteints de pathologies auto-immunes ou immuno-inflammatoires.

La découverte de l'importance des CPA et de l'environnement inflammatoire dans l'altération de l'activité des Treg offre aujourd'hui de nouvelles perspectives thérapeutiques (Andre, *et al.* 2009). Ainsi, l'inhibition de la cytokine pro-inflammatoire TNF par un anticorps **anti-TNF** (infliximab) permet de restaurer l'activité des Treg et leur expression de FoxP3, chez des patients souffrant de RA (Valencia *et al.* 2006). L'effet de l'inhibition d'autres cytokines inflammatoires, telles que l'IL-6 ou l'IL-1 $\beta$  (qui favorise la trans-différenciation des Treg en Th17), sur le traitement des maladies auto-immunes n'a pas encore été étudié. Chez des patients souffrant de SLE, il a été rapporté que la déplétion des cellules B (CPA) par un anticorps **anti-CD20** (rituximab) conduisait à une augmentation de la population T régulatrice, expliquant ainsi l'effet bénéfique du traitement sur la pathologie (Vallerskog *et al.* 2007).

D'autres molécules activées par les cytokines inflammatoires et inhibant les Treg pourraient être ciblées afin de restaurer l'activité des Treg, et notamment la Pi3k, les STATs ou encore les MAPK (Andre, *et al.* 2009). En effet, des études ont montré l'importance biologique de la voie de la Pi3K/Akt dans l'effet suppresseur et la biologie des Treg. Le statut d'activation de cette voie de signalisation pourrait conditionner la sensibilité des lymphocytes T effecteurs à la régulation médiée par les Treg. Quand la voie

Pi3K/Akt est hyperactive dans les cellules T effectrices, ces cellules deviennent alors résistantes à la suppression induite par les Treg. Ce constat pourrait peut-être expliquer que des anomalies au niveau de cette voie de transduction soient détectables dans des manifestations auto-immunes (Wohlfert and Clark 2007).

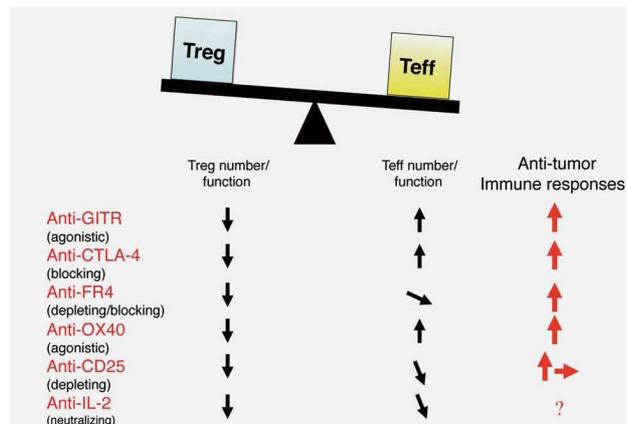
L'immunomodulation des Treg par les immunoglobulines intraveineuses (**IVIg** : *IntraVenous Immunoglobulin*) représente un nouvel outil thérapeutique dans le traitement des maladies auto-immunes. Les IVIg sont une préparation d'immunoglobulines polyspécifiques, issues du pool de plasma de centaines de donneurs sains. Leur efficacité dans le traitement des maladies auto-immunes, telles que le syndrome de Guillain-Barré et la sclérose multiple, ou dans des modèles de transplantation a été expliquée par leur effet bénéfique sur l'expansion et la fonction des Treg à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les Treg serait en effet activés suite à la reconnaissance de la portion Fc des IgG ou d'auto-anticorps naturels contenus dans les IVIg (Maddur *et al.* 2010; Tha-In *et al.* 2010).

Le ciblage des Treg par ces différentes molécules pourrait être couplé à l'utilisation de la **rapamycine** qui est connu pour inhiber les T effecteurs tout en favorisant l'expansion et l'activité des Treg (Strauss, *et al.* 2009). L'utilisation de la rapamycine dans un modèle murin d'EAE est efficace dans le traitement de la pathologie. Il a été observé que la rapamycine permettait l'expansion sélective des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD45RBlowCD103+ et l'inhibition des cellules T CD4+CD45RBhigh. La modulation du ratio Teff / Treg par la rapamycine permet ainsi la résolution de l'EAE dans ce modèle (Esposito *et al.* 2010). Webster *et al.* ont également montré que l'association de rapamycine et d'un cocktail **IL-2/anti-IL-2** permet de traiter l'EAE déjà installée. L'utilisation du cocktail IL-2/anti-IL-2 en monothérapie ne permet pas de résoudre la pathologie déjà évoluée (Webster, *et al.* 2009).

Par ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur de HDAC (**HDACi** : *Histone DéAcétylase inhibitor*), l'acide valproïque, dans un modèle murin de RA, augmente la fréquence et la fonction des Treg en stabilisant la protéine FoxP3, permettant ainsi le traitement de la pathologie (Saouaf *et al.* 2009).

### C - Cible dans l'immunité anti-tumorale

Comme décrit précédemment, les Treg sont impliqués dans l'inhibition de la réponse immune anti-tumorale. De nombreuses équipes ont ainsi cherché à développer des stratégies thérapeutiques visant, cette fois, à inhiber les cellules T régulatrices CD4+CD25+, notamment en ciblant les molécules de surface exprimées par ces cellules ou en modulant leur activité. Le but étant d'inverser la balance entre Treg et T effecteurs dans le contrôle de l'immunité anti-tumorale (Figure 48) (Nishikawa and Sakaguchi 2010) (revue).



**Figure 48 : Schématisation de l'effet de divers thérapies cellulaires dirigées contre les Treg, sur la balance Treg / Teff.** L'inhibition de l'activité suppressive des Treg induit une augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale. (Nishikawa and Sakaguchi 2010)

Dès 1999, des travaux réalisés chez le rongeur ont montré que l'inhibition des Treg CD4+CD25+, par un anticorps monoclonal **anti-CD25**, couplé à l'exotoxine A du *Pseudomonas*, ou un anticorps **anti-IL-2** conjugué à la toxine de la diphtérie (Denileukine diftotox), favorise l'activation et l'expansion de cellules T effectrices inhibant ainsi la croissance tumorale. Cependant la déplétion de ces Treg ne semble être efficace que si elle est réalisée au moment de l'inoculation de la tumeur. De plus, l'efficacité de ces anticorps dans l'inhibition spécifique des Treg est controversée, du fait de l'expression du récepteur à l'IL-2 (CD25) directement sur les cellules cancéreuses (de Rezende et al. 2010) (revue). L'IL-2 est utilisée en thérapeutique humaine notamment chez des patients atteints de tumeurs rénales ou de mélanomes afin de favoriser les réponses immunitaires anti-tumorales. La dose d'IL-2 administrée est un paramètre très important à prendre en compte. A hautes doses, l'IL-2 va favoriser l'expansion des Treg chez ces patients et de ce fait la progression de la tumeur (Ahmadzadeh and Rosenberg 2006). L'expression

constitutive et forte de CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2) à la surface des Treg par rapport aux lymphocytes T conventionnels leur donne un avantage prolifératif. En effet, ces stratégies sont à prendre avec précaution du fait de l'expression du CD25 sur les cellules T effectrices activées et de l'importance de l'IL-2 dans l'expansion des cellules T CD8+, importantes dans l'immunité anti-tumorale (Onizuka, *et al.* 1999). Ainsi, il a récemment été montré une augmentation significative de la proportion de Treg CD4+CD25<sup>high</sup> (6 versus 22 %), chez 46 patients atteints de mélanomes et traités par un vaccin contenant des DC et de faibles doses d'IFN- $\alpha$  et d'IL-2. Cette proportion de Treg revient à un niveau basal chez les patients dont la progression tumorale s'est stabilisée (9,5 %) par rapport aux patients dont la maladie progresse (14,5 %) (Bjoern *et al.* 2010).

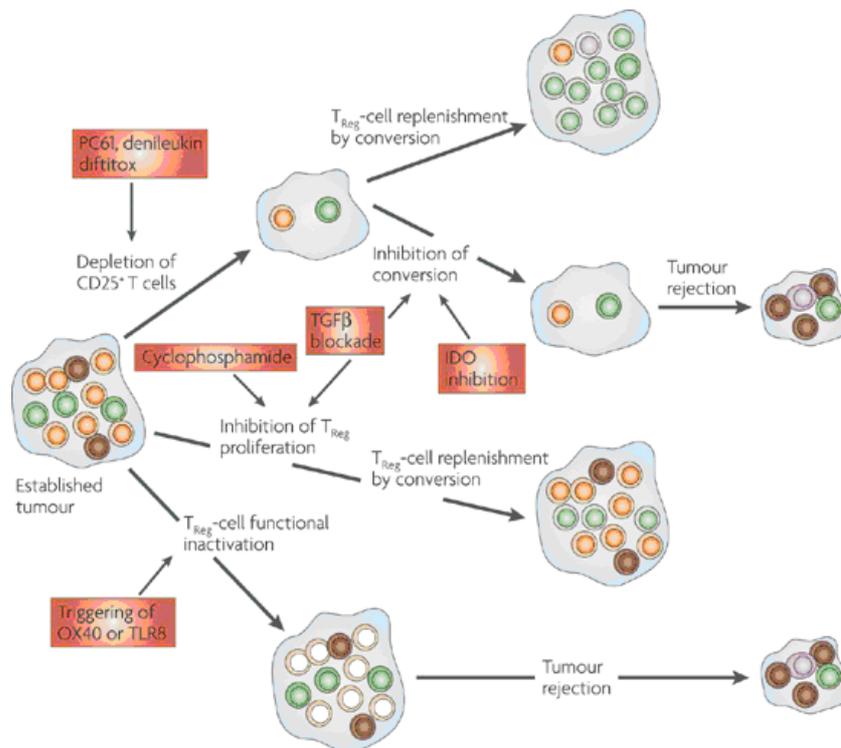
Il a également été documenté que l'activation de la signalisation par le GITR via un anticorps **anti-GITR** était capable d'inhiber l'activité suppressive des Treg (McHugh, *et al.* 2002). Dans ce contexte, l'utilisation d'un anticorps anti-GITR dans le traitement de tumeurs murines a permis d'augmenter la réponse anti-tumorale des cellules T CD4+ et CD8+, et ce de manière plus efficace lorsque la tumeur est déjà installée. Ceci indique que la stimulation de la signalisation GITR permet une expansion des T effecteurs pré-existants au site tumoral plutôt que leur génération (Ko *et al.* 2005).

L'inhibition de CTLA-4 est connue pour abroger l'activité suppressive des Treg. Ainsi, dans un modèle de souris présentant un KO (*KnockOut*) du CTLA-4 dans les Treg, ou lors de l'utilisation d'anticorps **anti-CTLA-4 (Tremelimumab)**, il a été montré une augmentation de l'activité des cellules T effectrices et une diminution de la suppression médiée par les Treg, conduisant à une inhibition de la croissance tumorale (Wing *et al.* 2008). Cependant, cela résulterait en une accumulation de Treg au sein du tissu tumoral (Kavanagh, *et al.* 2008). Par ailleurs, la combinaison d'anti-GITR et d'anti-CTLA-4 aurait un effet anti-tumoral plus important, notamment sur des tumeurs avancées (Ko, *et al.* 2005).

Plus récemment, une équipe a développé un peptide synthétique (**P60**) se fixant spécifiquement à FoxP3 et inhibant ainsi sa translocation nucléaire. P60 inhibe *in vitro* l'activité des Treg murins et humains et induit le syndrome scurfy *in vivo*. Par ailleurs, son administration à des souris empêche l'implantation d'une tumeur et favorise également la réponse anti-virale (adénovirus portant la protéine NS3 du VHC) (Casares *et al.* 2010).

Par ailleurs, il semblerait que certains traitements anti-cancéreux couramment utilisés, aient un effet sur les Treg. Ainsi, il a été montré que de faibles doses de cyclophosphamide diminuaient sélectivement la fréquence des Treg, sans effets cytotoxiques sur les T effecteurs et les cellules NK (Ghiringhelli *et al.* 2007). Des analyses histologiques de carcinomes métastatiques indiquent même que sous cyclophosphamide, le nombre de Treg infiltrant la tumeur est fortement diminué, au profit d'une infiltration de cellules T CD8+ (Audia *et al.* 2007).

Malgré l'effet prometteur de ces différentes molécules, un des obstacles à la déplétion spécifique des Treg est le manque de spécificité de leur marqueur. En effet, les Treg et les T effecteurs possèdent un phénotype activé commun, de par l'expression du CD25, CTLA-4, GITR, OX-40, ... La déplétion des Treg résulte donc en l'élimination de cellules T effectrices CD4+ et CD8+. De plus, la déplétion des Treg conduit à la néoconversion de cellules T naïves en Treg, afin de maintenir l'homéostasie immunitaire. Afin d'induire une immunité anti-tumorale efficace, il est donc nécessaire d'empêcher cette néoconversion, notamment en inhibant l'IDO ou le TGF- $\beta$  (Colombo and Piconese 2007) (revue) (Figure 49).



**Figure 49 : Les traitements anti-tumoraux peuvent agir à différents niveaux sur les Treg :** Déplétion (denileukine difitox), Inactivation fonctionnelle (anti-OX-40), Inhibition de la prolifération des Treg (cyclophosphamide) ou Inhibition de la conversion des T naïfs en Treg (inhibition de IDO, anti-TGF- $\beta$ ). Treg (orange), Treg non fonctionnel (blanc), CD4 (vert), CD8 (marron). (Colombo and Piconese 2007)

## D - Une aide à la thérapie génique

L'ensemble de ces données suggère qu'en accompagnement de thérapies cellulaires correctives, l'injection de Treg génétiquement modifiés pourrait être bénéfique dans la prise en charge thérapeutique des maladies auto-immunes ou des rejets de greffes.

Une utilisation potentielle des Treg pour le traitement des myopathies a été proposée en 2003 par le groupe de Davoust. En co-injectant à la souris des Treg exprimant un TCR transgénique spécifique pour la protéine HA (*influenza hemagglutinin*) avec les cellules musculaires exprimant le transgène, ils ont pu permettre l'installation durable des cellules musculaires transduites au sein du tissu musculaire de l'animal (Gross *et al.* 2003). Plus récemment, Hombach *et al.* ont réussi à transduire *ex vivo* des Treg avec un rétrovirus codant le récepteur du CEA (*CarcinoEmbryonic Antigen*), tout en préservant la fonction des Treg. En effet, les Treg transduits sont activés de manière antigène dépendante et sont capables d'inhiber spécifiquement la réponse CTL dirigée contre l'antigène tumoral, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, leur transfert dans une souris inoculée avec une tumeur exprimant le CEA permet la croissance de la tumeur (Hombach *et al.* 2009). La manipulation génique des Treg a également été réalisée dans un modèle murin de greffe cardiaque. Des Treg ont été transduits par un rétrovirus exprimant un TCR reconnaissant un allo-antigène, permettant ainsi la tolérance à long terme du transplant (Tsang *et al.* 2008).

Ces modèles sont très prometteurs et les barrières de l'isolement spécifique des Treg et de leur expansion sont maintenant quasi-résolues (Trzonkowski *et al.* 2009). En effet, un des gros risques était d'isoler et d'amplifier des lymphocytes T CD4+ effecteurs contaminants dans la population triée. La découverte récente des marqueurs de surface CD127 et CD49d, permettant de bien séparer les populations effectrices (CD127<sup>high</sup>CD49d<sup>+</sup>) et régulatrices (CD127<sup>low</sup>CD49d<sup>low</sup>), va permettre d'améliorer la spécificité des procédures de tri cellulaire. De plus, la culture des fractions triées avec de la rapamycine pourrait assurer l'obtention post-culture d'une population cellulaire encore plus pure. L'expansion *in vitro* des Treg humains a été durant longtemps un facteur limitant aussi bien dans leur étude fondamentale (due à la faible fréquence de Treg dans

le sang périphérique humain) que dans le design de protocoles cliniques. Toutefois, la possibilité d'amplifier *ex vivo* des Treg humains antigène-spécifique (ayant une spécificité autre que pour des alloantigènes) reste encore à être précisée. Les essais cliniques de thérapie cellulaire les plus imminents, allogreffe médullaire (Roncarolo and Battaglia 2007) (revue) ou le traitement de la GVHD (Trzonkowski, *et al.* 2009), utiliseront des Treg amplifiés de manière polyclonale. Une étude récente va d'ailleurs permettre une avancée dans la génération de Treg antigène-spécifique. En effet, Fourcade *et al.* ont montré que les Treg et les T effecteurs spécifiques d'antigènes tumoraux partagent la même spécificité épitopique mais ont un TCR distinct (Fourcade *et al.* 2010).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aandahl, E.M., Michaelsson, J., Moretto, W.J., Hecht, F.M. and Nixon, D.F. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. **2004**, *J Virol*, 5 - 2454-9
- Abadja, F., Videcoq, C., Alamartine, E., Berthou, F. and Mariat, C. Differential effect of cyclosporine and mycophenolic acid on the human regulatory T cells and TH-17 cells balance. **2009**, *Transplant Proc*, 8 - 3367-70
- Abbas, A.K., Murphy, K.M. and Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **1996**, *Nature*, 6603 - 787-93
- Accapezzato, D., Francavilla, V., Paroli, M., Casciaro, M., Chircu, L.V., et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. **2004**, *J Clin Invest*, 7 - 963-72
- Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. **2002**, *Nat Immunol*, 6 - 549-57
- Ahmadzadeh, M. and Rosenberg, S.A. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. **2006**, *Blood*, 6 - 2409-14
- Akiyama, M., Ichikawa, T., Miyaaki, H., Motoyoshi, Y., Takeshita, S., et al. Relationship between regulatory T cells and the combination of pegylated interferon and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis type C. **2010**, *Intervirol*, 3 - 154-60
- Alam, S.M., Travers, P.J., Wung, J.L., Nasholds, W., Redpath, S., et al. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. **1996**, *Nature*, 6583 - 616-20
- Almawi, W.Y., Assi, J.W., Chudzik, D.M. and Lazarovits, A.I. Opposing effects of rapamycin and cyclosporin A on activation-induced Ca(2+) release. **1999**, *Eur J Pharmacol*, 1 - 51-6
- Alter, M.J. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. **1997**, *Clin Liver Dis*, 3 - 559-68, vi-vii
- Alter, M.J. Epidemiology of hepatitis C in the West. **1995**, *Semin Liver Dis*, 1 - 5-14
- Alter, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **2007**, *World J Gastroenterol*, 17 - 2436-41
- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M. and Betz, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **2004**, *Nat Immunol*, 3 - 266-71
- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M. and Betz, A.G. Tolerance, suppression and the fetal allograft. **2005**, *J Mol Med*, 2 - 88-96
- Andre, S., Tough, D.F., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V. and Bayry, J. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. **2009**, *Am J Pathol*, 5 - 1575-87
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A., et al. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. **2001**, *J Immunol*, 5 - 3008-18
- Annunziato, F. and Romagnani, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. **2009**, *Arthritis Res Ther*, 6 - 257
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. and von Boehmer, H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. **2002**, *Nat Immunol*, 8 - 756-63
- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D. and Mak, T.W. Human T-cell receptor variable gene segment families. **1995**, *Immunogenetics*, 6 - 455-500
- Artini, M., Nisini, R., Missale, G., Costanzo, A., Accapezzato, D., et al. Infection of circulating and liver infiltrating T cells by hepatitis C virus of different subtypes. **1995**, *Viral Immunol*, 2 - 63-73
- Audia, S., Nicolas, A., Cathelin, D., Larmonier, N., Ferrand, C., et al. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+ CD25+ T lymphocytes. **2007**, *Clin Exp Immunol*, 3 - 523-30
- Aw, M.M., Verma, A., Rela, M., Heaton, N., Mieli-Vergani, G., et al. Long-term outcome of mycophenolate mofetil rescue therapy for resistant acute allograft rejection in pediatric liver transplant recipients. **2008**, *Liver Transpl*, 9 - 1303-8
- Azab, N.A., Bassyouni, I.H., Emad, Y., Abd El-Wahab, G.A., Hamdy, G., et al. CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. **2008**, *Clin Immunol*, 2 - 151-7
- Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T. and Hirai, H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. **2003**, *Cancer Res*, 15 - 4516-20
- Baan, C.C., Velthuis, J.H., van Gurp, E.A., Mol, W.M., Klepper, M., et al. Functional CD25(bright+) alloresponsive T cells in fully immunosuppressed renal allograft recipients. **2007**, *Clin Transplant*, 1 - 63-71

- Bacchetta, R., Bigler, M., Touraine, J.L., Parkman, R., Tovo, P.A., et al. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. **1994**, *J Exp Med*, 2 - 493-502
- Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S.E., et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. **2006**, *J Clin Invest*, 6 - 1713-22
- Baecher-Allan, C., Wolf, E. and Hafler, D.A. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. **2006**, *J Immunol*, 8 - 4622-31
- Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J. and Hafler, D.A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **2001**, *J Immunol*, 3 - 1245-53
- Bahra, M., Neumann, U.I., Jacob, D., Puhl, G., Klupp, J., et al. MMF and calcineurin taper in recurrent hepatitis C after liver transplantation: impact on histological course. **2005**, *Am J Transplant*, 2 - 406-11
- Balbi, E., Leal, C.R., Pacheco-Moreira, L.F., Pousa, F.S., Covelo, M.C., et al. Treatment for recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation. **2009**, *Transplant Proc*, 3 - 891-4
- Barrera Pulido, L., Alamo Martinez, J.M., Pareja Ciuro, F., Gomez Bravo, M.A., Serrano Diez-Canedo, J., et al. Efficacy and safety of mycophenolate mofetil monotherapy in liver transplant patients with renal failure induced by calcineurin inhibitors. **2008**, *Transplant Proc*, 9 - 2985-7
- Bates, G.J., Fox, S.B., Han, C., Leek, R.D., Garcia, J.F., et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. **2006**, *J Clin Oncol*, 34 - 5373-80
- Battaglia, M., Stabilini, A. and Roncarolo, M.G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. **2005**, *Blood*, 12 - 4743-8
- Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., Horejs-Hoeck, J., Kaupper, T., et al. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. **2006**, *J Immunol*, 12 - 8338-47
- Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P. and Crabtree, G.R. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. **1997**, *Science*, 276 - 1930-4
- Beckebaum, S., Klein, C.G., Sotiropoulos, G.C., Saner, F.H., Gerken, G., et al. Combined mycophenolate mofetil and minimal dose calcineurin inhibitor therapy in liver transplant patients: clinical results of a prospective randomized study. **2009\***, *Transplant Proc*, 6 - 2567-9
- Beckebaum, S., Klein, C., Varghese, J., Sotiropoulos, G.C., Saner, F., et al. Renal function and cardiovascular risk profile after conversion from ciclosporin to tacrolimus: prospective study in 80 liver transplant recipients. **2009**, *Aliment Pharmacol Ther*, 8 - 834-42
- Becker, J.C., Houben, R., Vetter, C.S. and Brocker, E.B. The carcinogenic potential of tacrolimus ointment beyond immune suppression: a hypothesis creating case report. **2006**, *BMC Cancer*, - 7
- Belkaid, Y. and Rouse, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **2005**, *Nat Immunol*, 4 - 353-60
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M. and Sacks, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **2002**, *Nature*, 415 - 502-7
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **2001**, *Nat Genet*, 1 - 20-1
- Benson, A., Barrett, T., Sparberg, M. and Buchman, A.L. Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. **2008**, *Inflamm Bowel Dis*, 1 - 7-12
- Beresford, P.J., Zhang, D., Oh, D.Y., Fan, Z., Greer, E.L., et al. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. **2001**, *J Biol Chem*, 276 - 43285-93
- Bernard, F., Romano, A. and Granel, B. Regulatory T cells and systemic autoimmune diseases: systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, primary Sjogren's syndrome. **2010**, *Rev Med Interne*, 2 - 116-27
- Bernardes, S.S., Borges, I.K., Lima, J.E., Milanez Pde, A., Conchon-Costa, I., et al. Involvement of regulatory T cells in HIV immunopathogenesis. **2010**, *Curr HIV Res*, 4 - 340-6
- Bettelli, E., Dastrange, M. and Oukka, M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. **2005**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 14 - 5138-43
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **2006**, *Nature*, 441 - 235-8
- Bevan, M.J. Helping the CD8(+) T-cell response. **2004**, *Nat Rev Immunol*, 8 - 595-602
- Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., et al. Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. **2001**, *Nat Immunol*, 6 - 556-63

- Birerdinc, A. and Younossi, Z.M. Emerging therapies for hepatitis C virus. **2010**, *Expert Opin Emerg Drugs*, -
- Bjoern, J., Brimnes, M.K., Andersen, M.H., Thor Straten, P. and Svane, I.M. Changes in peripheral blood level of regulatory T cells in malignant melanoma patients during treatment with dendritic cell vaccination and low dose IL-2. **2010**, *Scand J Immunol*, -
- Bocian, K., Borysowski, J., Wierzbicki, P., Wyzgal, J., Klosowska, D., et al. Rapamycin, unlike cyclosporine A, enhances suppressive functions of in vitro-induced CD4+CD25+ Tregs. **2010**, *Nephrol Dial Transplant*, 3 - 710-7
- Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I.S., Hugues, S. and Amigorena, S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. **2007**, *J Exp Med*, 2 - 345-56
- Bolacchi, F., Sinistro, A., Ciaprini, C., Demin, F., Capozzi, M., et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. **2006**, *Clin Exp Immunol*, 2 - 188-96
- Boldt, A., Barten, M.J., Sagner, A., Mohr, F.W., Adams, V., et al. The influence of immunosuppressive drugs on T- and B-cell apoptosis via p53-mediated pathway in vitro and in vivo. **2006**, *Transplantation*, 3 - 422-7
- Bollyky, P.L., Falk, B.A., Long, S.A., Preisinger, A., Braun, K.R., et al. CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. **2009**, *J Immunol*, 4 - 2232-41
- Borel, J.F. History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. **2002**, *Wien Klin Wochenschr*, 12 - 433-7
- Braith, M., Harikrishnan, S., Robins, R.A., Nichols, C., Fahey, A.J., et al. Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. **2009**, *Acta Neurol Scand*, 4 - 239-45
- Brandt, C., Pavlovic, V., Radbruch, A., Worm, M. and Baumgrass, R. Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. **2009**, *Allergy*, 11 - 1588-96
- Brok, J., Gluud, L.L. and Gluud, C. Ribavirin monotherapy for chronic hepatitis C. **2009**, *Cochrane Database Syst Rev*, 4 - CD005527
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf1, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **2001**, *Nat Genet*, 1 - 68-73
- Bueno, L.L., Morais, C.G., Araujo, F.F., Gomes, J.A., Correa-Oliveira, R., et al. Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. **2010**, *PLoS One*, 3 - e9623
- Bukh, J., Miller, R.H. and Purcell, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **1995**, *Semin Liver Dis*, 1 - 41-63
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B. and Farrar, M.A. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. **2007**, *Immunol Lett*, 1 - 1-8
- Bystry, R.S., Aluvihare, V., Welch, K.A., Kallikourdis, M. and Betz, A.G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. **2001**, *Nat Immunol*, 12 - 1126-32
- Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R.J., Rosen, H.R., et al. An immunomodulatory role for CD4(+)/CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. **2004**, *Hepatology*, 5 - 1062-71
- Calmus, Y. Immunosuppression after liver transplantation. **2009**, *Presse Med*, 9 - 1307-13
- Calvo, V., Crews, C.M., Vik, T.A. and Bierer, B.E. Interleukin 2 stimulation of p70 S6 kinase activity is inhibited by the immunosuppressant rapamycin. **1992**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 16 - 7571-5
- Camisaschi, C., Casati, C., Rini, F., Perego, M., De Filippo, A., et al. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)/CD25(high)/Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. **2010**, *J Immunol*, 11 - 6545-51
- Campbell, D.J. and Ziegler, S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **2007**, *Nat Rev Immunol*, 4 - 305-10
- Canning, C., O'Brien, M., Hegarty, J. and O'Farrelly, C. Liver immunity and tumour surveillance. **2006**, *Immunol Lett*, 2 - 83-8
- Caproni, M., Torchia, D., Antiga, E., Volpi, W., del Bianco, E., et al. The effects of tacrolimus ointment on regulatory T lymphocytes in atopic dermatitis. **2006**, *J Clin Immunol*, 4 - 370-5
- Carpentier, A., Conti, F., Carriere, M., Aoudjehane, L., Miroux, C., et al. Analysis of gene transcription in sera during chronic hepatitis C infection. **2009\***, *J Med Virol*, 3 - 473-80
- Carpentier, A., Conti, F., Stenard, F., Aoudjehane, L., Miroux, C., et al. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. **2009**, *Am J Transplant*, 9 - 2102-12

- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K. and Weiner, H.L. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. **2007**, *J Immunol*, 1 - 179-85
- Casares, N., Rudilla, F., Arribillaga, L., Llopiz, D., Riezu-Boj, J.I., et al. A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice. **2010**, *J Immunol*, 9 - 5150-9
- Cassani, B., Poliani, P.L., Moratto, D., Sobacchi, C., Marrella, V., et al. Defect of regulatory T cells in patients with Omenn syndrome. **2010**, *J Allergy Clin Immunol*, 1 - 209-16
- Castello, G., Scala, S., Palmieri, G., Curley, S.A. and Izzo, F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. **2010**, *Clin Immunol*, 3 - 237-50
- Castroagudin, J.F., Molina, E., Romero, R., Otero, E., Tome, S., et al. Improvement of renal function after the switch from a calcineurin inhibitor to everolimus in liver transplant recipients with chronic renal dysfunction. **2009**, *Liver Transpl*, 12 - 1792-7
- Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. **2007**, *Science*, 5819 - 1687-91
- Chang, M., Williams, O., Mittler, J., Quintanilla, A., Carithers, R.L., Jr., et al. Dynamics of hepatitis C virus replication in human liver. **2003**, *Am J Pathol*, 2 - 433-44
- Chatila, T.A. Role of regulatory T cells in human diseases. **2005**, *J Allergy Clin Immunol*, 5 - 949-59; quiz 960
- Chatterji, U., Lim, P., Bobardt, M.D., Wieland, S., Cordek, D.G., et al. HCV resistance to cyclosporin A does not correlate with a resistance of the NS5A-cyclophilin A interaction to cyclophilin inhibitors. **2010**, *J Hepatol*, 1 - 50-6
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. **2009**, *Science*, 5955 - 986-91
- Chauhan, S.K., Saban, D.R., Lee, H.K. and Dana, R. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. **2009**, *J Immunol*, 1 - 148-53
- Chen, J.F., Gao, J., Zhang, D., Wang, Z.H. and Zhu, J.Y. CD4+Foxp3+ regulatory T cells converted by rapamycin from peripheral CD4+CD25(-) naive T cells display more potent regulatory ability in vitro. **2010**, *Chin Med J (Engl)*, 7 - 942-8
- Chen, M.L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. **2005**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2 - 419-24
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **2003**, *J Exp Med*, 12 - 1875-86
- Chen, X., Subleski, J.J., Hamano, R., Howard, O.M., Wiltrot, R.H., et al. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. **2010\***, *Eur J Immunol*, 4 - 1099-106
- Cheney, I.W., Lai, V.C., Zhong, W., Brodhag, T., Dempsey, S., et al. Comparative analysis of anti-hepatitis C virus activity and gene expression mediated by alpha, beta, and gamma interferons. **2002**, *J Virol*, 21 - 11148-54
- Cheng, J., Zhou, L., Qin, Y.S., Wang, Y., Xie, H.Y., et al. Donor apoptotic lymphocyte transfusion-induced liver allograft tolerance by up-regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in peripheral blood. **2009**, *Transplant Proc*, 9 - 3893-7
- Chinnakotla, S., Davis, G.L., Vasani, S., Kim, P., Tomiyama, K., et al. Impact of sirolimus on the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **2009**, *Liver Transpl*, 12 - 1834-42
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **1989**, *Science*, 4902 - 359-62
- Ciesek, S., Steinmann, E., Iken, M., Ott, M., Helfritz, F.A., et al. Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. **2010**, *Gastroenterology*, 5 - 1875-84
- Ciuffreda, D., Codarri, L., Buhler, L., Vallotton, L., Giostra, E., et al. Hepatitis C virus infection after liver transplantation is associated with lower levels of activated CD4(+)CD25(+)CD45RO(+)IL-7ra(hi) T cells. **2010**, *Liver Transpl*, 1 - 49-55
- Claassen, M.A., de Knecht, R.J., Tilanus, H.W., Janssen, H.L. and Boonstra, A. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. **2010**, *J Hepatol*, 3 - 315-21
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. and Terhorst, C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. **1988**, *Annu Rev Immunol*, - 629-62
- Cocquerel, L., Voisset, C. and Dubuisson, J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. **2006**, *J Gen Virol*, Pt 5 - 1075-84

- Coenen, J.J., Koenen, H.J., van Rijssen, E., Hilbrands, L.B. and Joosten, I. Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. **2006**, *Blood*, 3 - 1018-23
- Cohen, J.L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D. and Salomon, B.L. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. **2002**, *J Exp Med*, 3 - 401-6
- Colombo, M.P. and Piconese, S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. **2007**, *Nat Rev Cancer*, 11 - 880-7
- Conti, F., Frappier, J., Dharancy, S., Chereau, C., Houssin, D., et al. Interleukin-15 production during liver allograft rejection in humans. **2003**, *Transplantation*, 1 - 210-6
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. **2007**, *J Exp Med*, 8 - 1757-64
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. **2008**, *J Exp Med*, 8 - 1903-16
- Cottrez, F. and Groux, H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. **2004**, *Transplantation*, 1 Suppl - S12-5
- Cox, A.L., Mosbrugger, T., Mao, Q., Liu, Z., Wang, X.H., et al. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. **2005**, *J Exp Med*, 11 - 1741-52
- Creput, C., Blandin, F., Deroure, B., Roche, B., Saliba, F., et al. Long-term effects of calcineurin inhibitor conversion to mycophenolate mofetil on renal function after liver transplantation. **2007**, *Liver Transpl*, 7 - 1004-10
- Curiel, T.J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. **2007**, *J Clin Invest*, 5 - 1167-74
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **2004**, *Nat Med*, 9 - 942-9
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. **2008**, *Nat Immunol*, 12 - 1347-55
- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J. and Shevach, E.M. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. **2007**, *J Immunol*, 7 - 4022-6
- De Clercq, E. Antivirals and antiviral strategies. **2004**, *Nat Rev Microbiol*, 9 - 704-20
- de Rezende, L.C., Silva, I.V., Rangel, L.B. and Guimaraes, M.C. Regulatory T cell as a target for cancer therapy. **2010**, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 3 - 179-90
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **2007**, *J Exp Med*, 6 - 1257-65
- Decaens, T., Hurtova, M. and Duvoux, C. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. **2009**, *Gastroenterol Clin Biol*, 1 Pt 1 - 61-9
- Deknuydt, F., Bioley, G., Valmori, D. and Ayyoub, M. IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. **2009**, *Clin Immunol*, 2 - 298-307
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., et al. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. **1997**, *J Virol*, 1 - 697-704
- Delhem, N., Cottrez, F., Carpentier, A., Miroux, C., Morales, O., et al. Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. **2008**, *Bull Cancer*, 11 - 1029-38
- Delpuech, O., Buffello-Le Guillou, D.B., Rubinstein, E., Feray, C. and Petit, M.A. The hepatitis C virus (HCV) induces a long-term increase in interleukin-10 production by human CD4+ T cells (H9). **2001**, *Eur Cytokine Netw*, 1 - 69-77
- Demirkiran, A., Kok, A., Kwekkeboom, J., Kusters, J.G., Metselaar, H.J., et al. Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. **2006**, *Liver Transpl*, 2 - 277-84
- Demirkiran, A., Sewgobind, V.D., van der Weijde, J., Kok, A., Baan, C.C., et al. Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells. **2009**, *Transplantation*, 7 - 1062-8
- Desenclos, J.C. Epidemiology of hepatitis C. **2000**, *Rev Prat*, 10 - 1066-70
- Dessouki, O., Kamiya, Y., Nagahama, H., Tanaka, M., Suzu, S., et al. Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. **2010**, *Biochem Biophys Res Commun*, 2 - 331-7
- Deuffic-Burban, S., Deltenre, P., Louvet, A., Canva, V., Dharancy, S., et al. Impact of viral eradication on mortality related to hepatitis C: a modeling approach in France. **2008**, *J Hepatol*, 2 - 175-83
- Deuffic, S., Buffat, L., Poinard, T. and Valleron, A.J. Modeling the hepatitis C virus epidemic in France. **1999**, *Hepatology*, 5 - 1596-601
- Di Benedetto, F., Di Sandro, S., De Ruvo, N., Montalti, R., Guerrini, G.P., et al. Immunosuppressive switch to sirolimus in renal dysfunction after liver transplantation. **2009**, *Transplant Proc*, 4 - 1297-9

- Di Padova, F.E. Pharmacology of cyclosporine (sandimmune). V. Pharmacological effects on immune function: in vitro studies. **1990**, *Pharmacol Rev*, 3 - 373-405
- Dick, E.A., Taylor-Robinson, S.D., Thomas, H.C. and Gedroyc, W.M. Ablative therapy for liver tumours. **2002**, *Gut*, 5 - 733-9
- Dijke, I.E., Weimar, W. and Baan, C.C. Regulatory T cells after organ transplantation: where does their action take place? **2008**, *Hum Immunol*, 7 - 389-98
- Dittmer, U., He, H., Messer, R.J., Schimmer, S., Olbrich, A.R., et al. Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. **2004**, *Immunity*, 3 - 293-303
- Dolganic, A., Chang, S., Kodys, K., Mandrekar, P., Bakis, G., et al. Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. **2006**, *J Immunol*, 10 - 6758-68
- Dolganic, A., Kodys, K., Kopasz, A., Marshall, C., Do, T., et al. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. **2003**, *J Immunol*, 11 - 5615-24
- Dong, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. **2006**, *Nat Rev Immunol*, 4 - 329-33
- DuBay, D., Smith, R.J., Qiu, K.G., Levy, G.A., Lilly, L., et al. Sirolimus in liver transplant recipients with renal dysfunction offers no advantage over low-dose calcineurin inhibitor regimens. **2008**, *Liver Transpl*, 5 - 651-9
- Duggleby, R.C., Shaw, T.N., Jarvis, L.B., Kaur, G. and Gaston, J.S. CD27 expression discriminates between regulatory and non-regulatory cells after expansion of human peripheral blood CD4+ CD25+ cells. **2007**, *Immunology*, 1 - 129-39
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. **2009**, *Nat Immunol*, 8 - 857-63
- Dumortier, J., Scoazec, J.Y., Chevallier, P. and Boillot, O. Treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation: a pilot study of peginterferon alfa-2b and ribavirin combination. **2004**, *J Hepatol*, 4 - 669-74
- Dunn, G.P., Koebel, C.M. and Schreiber, R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **2006**, *Nat Rev Immunol*, 11 - 836-48
- Duvoux, C. De novo tumours after liver transplantation in adults. What is the actual risk? **2001**, *J Hepatol*, 1 - 161-4
- Earle, K.E., Tang, Q., Zhou, X., Liu, W., Zhu, S., et al. In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. **2005**, *Clin Immunol*, 1 - 3-9
- Efimova, O.V. and Kelley, T.W. Induction of granzyme B expression in T-cell receptor/CD28-stimulated human regulatory T cells is suppressed by inhibitors of the PI3K-mTOR pathway. **2009**, *BMC Immunol*, - 59
- Espósito, M., Ruffini, F., Bellone, M., Gagliani, N., Battaglia, M., et al. Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation. **2010**, *J Neuroimmunol*, 1-2 - 52-63
- Fabre, S., Lang, V., Harriague, J., Jobart, A., Unterman, T.G., et al. Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. **2005**, *J Immunol*, 7 - 4161-71
- Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **2005**, *J Exp Med*, 5 - 737-46
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **2003**, *Nat Immunol*, 12 - 1206-12
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **2006**, *J Immunol*, 11 - 6752-61
- Fantini, M.C., Dominitzki, S., Rizzo, A., Neurath, M.F. and Becker, C. In vitro generation of CD4+ CD25+ regulatory cells from murine naive T cells. **2007**, *Nat Protoc*, 7 - 1789-94
- Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., et al. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. **2004**, *J Immunol*, 9 - 5149-53
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. and Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. **2004**, *Gastroenterology*, 5 Suppl 1 - S35-50
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J. and Holland, P.V. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **1975**, *N Engl J Med*, 15 - 767-70
- Fernandes, F., Ansari, I.U. and Striker, R. Cyclosporine inhibits a direct interaction between cyclophilins and hepatitis C NS5A. **2010**, *PLoS One*, 3 - e9815

- Fernandez, I., Ulloa, E., Colina, F., Abradelo, M., Jimenez, C., et al. Incidence, risk factors, and outcome of chronic rejection during antiviral therapy for posttransplant recurrent hepatitis C. **2009**, *Liver Transpl*, 8 - 948-55
- Feske, S., Giltman, J., Dolmetsch, R., Staudt, L.M. and Rao, A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. **2001**, *Nat Immunol*, 4 - 316-24
- Fontenot, J.D. and Rudensky, A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **2005**, *Nat Immunol*, 4 - 331-7
- Fourcade, J., Sun, Z., Kudela, P., Janjic, B., Kirkwood, J.M., et al. Human tumor antigen-specific helper and regulatory T cells share common epitope specificity but exhibit distinct T cell repertoire. **2010**, *J Immunol*, 12 - 6709-18
- Fourtounas, C., Dousdampanis, P., Sakellarakis, P., Rodi, M., Georgakopoulos, T., et al. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. **2010**, *Am J Nephrol*, 1 - 1-9
- Fruman, D.A., Klee, C.B., Bierer, B.E. and Burakoff, S.J. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. **1992**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 9 - 3686-90
- Fujio, K., Okamura, T. and Yamamoto, K. The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. **2010**, *Adv Immunol*, - 99-130
- Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **1996**, *Nat Med*, 10 - 1096-103
- Gaither, L.A., Borawski, J., Anderson, L.J., Balabanis, K.A., Devay, P., et al. Multiple cyclophilins involved in different cellular pathways mediate HCV replication. **2010**, *Virology*, 1 - 43-55
- Gallay, P.A. Cyclophilin inhibitors. **2009**, *Clin Liver Dis*, 3 - 403-17
- Game, D.S., Hernandez-Fuentes, M.P. and Lechler, R.I. Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro. **2005**, *Am J Transplant*, 3 - 454-64
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., et al. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. **2003**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 8 - 4498-503
- Garin, M.I., Chu, C.C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. **2007**, *Blood*, 5 - 2058-65
- Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. **2006**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 17 - 6659-64
- Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Jung, M.C., Gruener, N.H., Schraut, W.W., et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. **1999**, *Gastroenterology*, 4 - 933-41
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., et al. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. **2002**, *J Med Virol*, 2 - 206-15
- Ghannam, S., Pene, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C. and Yssel, H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. **2010**, *J Immunol*, 1 - 302-12
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P.E., Ladoire, S., Roux, S., et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. **2007**, *Cancer Immunol Immunother*, 5 - 641-8
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. **2005**, *J Exp Med*, 8 - 1075-85
- Gil-Guerrero, L., Dotor, J., Huibregtse, I.L., Casares, N., Lopez-Vazquez, A.B., et al. In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1. **2008**, *J Immunol*, 1 - 126-35
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T. and Zlotnik, A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. **1993**, *J Immunol*, 10 - 4244-52
- Godfrey, V.L., Wilkinson, J.E. and Russell, L.B. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. **1991**, *Am J Pathol*, 6 - 1379-87
- Godfrey, W.R., Ge, Y.G., Spoden, D.J., Levine, B.L., June, C.H., et al. In vitro-expanded human CD4(+)/CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. **2004**, *Blood*, 2 - 453-61
- Godkin, A., Ng, W.F., Gallagher, K., Betts, G., Thomas, H.C., et al. Expansion of hepatitis C-specific CD4+CD25+ regulatory T cells after viral clearance: a mechanism to limit collateral damage? **2008**, *J Allergy Clin Immunol*, 5 - 1277-1284 e3

- Goncalves-Sousa, N., Ribot, J.C., deBarros, A., Correia, D.V., Caramalho, I., et al. Inhibition of murine gammadelta lymphocyte expansion and effector function by regulatory alphabeta T cells is cell-contact-dependent and sensitive to GITR modulation. **2010**, *Eur J Immunol*, 1 - 61-70
- Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S. and Noelle, R.J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. **2005**, *J Immunol*, 4 - 1783-6
- Gorelik, L. and Flavell, R.A. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. **2000**, *Immunity*, 2 - 171-81
- Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smiroldo, S., Davalli, A.M., et al. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. **2001**, *J Immunol*, 4 - 1945-53
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. **2002**, *Nat Immunol*, 11 - 1097-101
- Gross, D.A., Leboeuf, M., Gjata, B., Danos, O. and Davoust, J. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit immune-mediated transgene rejection. **2003**, *Blood*, 13 - 4326-8
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. **2004**, *Immunity*, 4 - 589-601
- Groux, H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. **2003**, *Transplantation*, 9 Suppl - 8S-12S
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **1997**, *Nature*, 6652 - 737-42
- Guerin, L.R., Prins, J.R. and Robertson, S.A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? **2009**, *Hum Reprod Update*, 5 - 517-35
- Hall, C.H., Kassel, R., Tacke, R.S. and Hahn, Y.S. HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta. **2010**, *PLoS One*, 8 - e12154
- Hanash, A.M. and Levy, R.B. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. **2005**, *Blood*, 4 - 1828-36
- Harriague, J. and Bismuth, G. Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. **2002**, *Nat Immunol*, 11 - 1090-6
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **2005**, *Nat Immunol*, 11 - 1123-32
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. **2009**, *Nature*, 7253 - 392-5
- Haxhinasto, S., Mathis, D. and Benoist, C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. **2008**, *J Exp Med*, 3 - 565-74
- He, X.S., Rehmann, B., Lopez-Labrador, F.X., Boisvert, J., Cheung, R., et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. **1999**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 10 - 5692-7
- Heck, J.A., Meng, X. and Frick, D.N. Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase. **2009**, *Biochem Pharmacol*, 7 - 1173-80
- Hendriks, T.K., Velthuis, J.H., Klepper, M., van Gorp, E., Geel, A., et al. Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4 CD25 FoxP3 T cells in renal recipients. **2009**, *Transpl Int*, 9 - 884-91
- Henkart, M.P. and Henkart, P.A. Lymphocyte mediated cytolysis as a secretory phenomenon. **1982**, *Adv Exp Med Biol*, - 227-47
- Herrero, J.I. De novo malignancies following liver transplantation: impact and recommendations. **2009**, *Liver Transpl*, - S90-4
- Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H. and Ley, T.J. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. **1994**, *Cell*, 6 - 977-87
- Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., et al. Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. **2008**, *J Immunol*, 4 - 2496-503
- Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L.A., Andreesen, R. and Edinger, M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. **2004**, *Blood*, 3 - 895-903
- Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. **1999**, *Nature*, 6719 - 530-4
- Hombach, A.A., Kofler, D., Rappl, G. and Abken, H. Redirecting human CD4+CD25+ regulatory T cells from the peripheral blood with pre-defined target specificity. **2009**, *Gene Ther*, 9 - 1088-96
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **2003**, *Science*, 5609 - 1057-61

- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **1993**, *Science*, 5107 - 547-9
- Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. **2004**, *Immunity*, 4 - 503-13
- Jellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **2001**, *J Exp Med*, 6 - 847-53
- Isakov, N. and Altman, A. Protein kinase C(theta) in T cell activation. **2002**, *Annu Rev Immunol*, - 761-94
- Ishida, T., Ishii, T., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., et al. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. **2006**, *Cancer Res*, 11 - 5716-22
- Ishimaru, N., Nitta, T., Arakaki, R., Yamada, A., Lipp, M., et al. In situ patrolling of regulatory T cells is essential for protecting autoimmune exocrinopathy. **2010**, *PLoS One*, 1 - e8588
- Itose, I., Kanto, T., Kakita, N., Takebe, S., Inoue, M., et al. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. **2009**, *J Viral Hepat*, 12 - 844-52
- Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **2006**, *Cell*, 6 - 1121-33
- Joffre, O., Gorse, N., Romagnoli, P., Hudrisier, D. and van Meerwijk, J.P. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. **2004**, *Blood*, 11 - 4216-21
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Hohenbeck, A.E., et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **2001**, *Nat Immunol*, 4 - 301-6
- Kakumu, S., Okumura, A., Ishikawa, T., Yano, M., Enomoto, A., et al. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. **1997**, *Clin Exp Immunol*, 3 - 458-63
- Kallen J, M.V., Quesniaux VFJ, Walkinshaw MD, Schneider-Scherzer E, Schörgendorfer K, Weber G and Fliri HG. Cyclosporins : Recent Developments in Biosynthesis, Pharmacology and Biology, and Clinical Applications. **1997**, *Biotechnology*, - 536 - 591
- Kamel, M.A., Ghaffar, Y.A., Wasef, M.A., Wright, M., Clark, L.C., et al. High HCV prevalence in Egyptian blood donors. **1992**, *Lancet*, 8816 - 427
- Kamphues, C., Bova, R., Rocken, C., Neuhaus, R., Pratschke, J., et al. Safety of mycophenolate mofetil monotherapy in patients after liver transplantation. **2009**, *Ann Transplant*, 4 - 40-6
- Kao, J.Y., Zhang, M., Miller, M.J., Mills, J.C., Wang, B., et al. Helicobacter pylori immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. **2010**, *Gastroenterology*, 3 - 1046-54
- Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N.J., Hense, G., et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. **2004**, *J Allergy Clin Immunol*, 6 - 1425-33
- Karczewski, M., Karczewski, J., Kostrzewa, A., Wiktorowicz, K. and Glyda, M. The role of Foxp3+ regulatory T cells in kidney transplantation. **2009**, *Transplant Proc*, 5 - 1527-9
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., et al. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. **2009**, *PLoS Pathog*, 8 - e1000546
- Kavanagh, B., O'Brien, S., Lee, D., Hou, Y., Weinberg, V., et al. CTLA4 blockade expands FoxP3+ regulatory and activated effector CD4+ T cells in a dose-dependent fashion. **2008**, *Blood*, 4 - 1175-83
- Kawai, M., Kitade, H., Mathieu, C., Waer, M. and Pirenne, J. Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine A on the development of regulatory T cells in vivo. **2005**, *Transplantation*, 9 - 1073-7
- Kim, H.P. and Leonard, W.J. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. **2007**, *J Exp Med*, 7 - 1543-51
- Kim, J.I., Sonawane, S.B., Lee, M.K., Lee, S.H., Duff, P.E., et al. Blockade of GITR-GITRL interaction maintains Treg function to prolong allograft survival. **2010**, *Eur J Immunol*, 5 - 1369-74
- Kim, J.M. and Rudensky, A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. **2006**, *Immunol Rev*, - 86-98
- Kim, S.H., Oh, E.J., Ghee, J.Y., Song, H.K., Han, D.H., et al. Clinical significance of monitoring circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in kidney transplantation during the early posttransplant period. **2009**, *J Korean Med Sci*, - S135-42
- Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R. and Wood, K.J. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. **2002**, *J Immunol*, 3 - 1080-6

- Klein, S., Kretz, C.C., Krammer, P.H. and Kuhn, A. CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood. **2010**, *J Invest Dermatol*, 2 - 492-9
- Kleinewietfeld, M., Starke, M., Di Mitri, D., Borsellino, G., Battistini, L., et al. CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. **2009**, *Blood*, 4 - 827-36
- Klintmalm, G.B., Goldstein, R., Gonwa, T., Wiesner, R.H., Krom, R.A., et al. Use of Prograf (FK 506) as rescue therapy for refractory rejection after liver transplantation. US Multicenter FK 506 Liver Study Group. **1993**, *Transplant Proc*, 1 Pt 1 - 679-88
- Ko, H.J., Cho, M.L., Lee, S.Y., Oh, H.J., Heo, Y.J., et al. CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population. **2010**, *J Autoimmun*, 2 - 111-20
- Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Nishioka, T., Hirota, K., et al. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. **2005**, *J Exp Med*, 7 - 885-91
- Koenen, H.J., Smeets, R.L., Vink, P.M., van Rijssen, E., Boots, A.M., et al. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. **2008**, *Blood*, 6 - 2340-52
- Kogina, K., Shoda, H., Yamaguchi, Y., Tsuno, N.H., Takahashi, K., et al. Tacrolimus differentially regulates the proliferation of conventional and regulatory CD4(+) T cells. **2009**, *Mol Cells*, 2 - 125-30
- Kohler, S., Pascher, A., Junge, G., Sauer, I.M., Nagy, M., et al. Graft versus host disease after liver transplantation - a single center experience and review of literature. **2008**, *Transpl Int*, 5 - 441-51
- Kopf, H., de la Rosa, G.M., Howard, O.M. and Chen, X. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. **2007**, *Int Immunopharmacol*, 13 - 1819-24
- Korczak-Kowalska, G., Wierzbicki, P., Bocian, K., Klosowska, D., Niemczyk, M., et al. The influence of immunosuppressive therapy on the development of CD4+CD25+ T cells after renal transplantation. **2007**, *Transplant Proc*, 9 - 2721-3
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. **2007**, *Nat Med*, 4 - 423-31
- Kornberg, A., Kupper, B., Tannapfel, A., Hommann, M. and Scheele, J. Impact of mycophenolate mofetil versus azathioprine on early recurrence of hepatitis C after liver transplantation. **2005**, *Int Immunopharmacol*, 1 - 107-15
- Kornberg, A., Kupper, B., Wilberg, J., Tannapfel, A., Thrum, K., et al. Conversion to mycophenolate mofetil for modulating recurrent hepatitis C in liver transplant recipients. **2007**, *Transpl Infect Dis*, 4 - 295-301
- Krishnadas, D.K., Li, W., Kumar, R., Tyrrell, D.L. and Agrawal, B. HCV-core and NS3 antigens play disparate role in inducing regulatory or effector T cells in vivo: Implications for viral persistence or clearance. **2010\***, *Vaccine*, 9 - 2104-14
- Krishnadas, D.K., Ahn, J.S., Han, J., Kumar, R. and Agrawal, B. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms. **2010**, *Int Immunol*, 6 - 491-502
- Kuhns, M.S., Davis, M.M. and Garcia, K.C. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. **2006**, *Immunity*, 2 - 133-9
- Kullberg, M.C., Jankovic, D., Gorelick, P.L., Caspar, P., Letterio, J.J., et al. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis. **2002**, *J Exp Med*, 4 - 505-15
- Lang, L. NIH consensus development conference updates HCV management. **2002**, *Gastroenterology*, 2 - 404
- Lange, C.M., Tran, T.Y., Farnik, H., Jungblut, S., Born, T., et al. Increased frequency of regulatory T cells and selection of highly potent CD62L+ cells during treatment of human lung transplant recipients with rapamycin. **2010**, *Transpl Int*, 3 - 266-76
- Langhans, B., Braunschweiger, I., Arndt, S., Schulte, W., Satoguina, J., et al. Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. **2010**, *Clin Sci (Lond)*, 2 - 97-109
- Lavasani, S., Dzhabazov, B., Nouri, M., Fak, F., Buske, S., et al. A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. **2010**, *PLoS One*, 2 - e9009
- Lazarous, M.C. and Kerdel, F.A. Topical tacrolimus Protopic. **2002**, *Drugs Today (Barc)*, 1 - 7-15
- Le Bras, S. and Geha, R.S. IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. **2006**, *J Clin Invest*, 6 - 1473-5
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D. and Paul, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. **1990**, *J Exp Med*, 3 - 921-9
- Lee, H.Y., Hong, Y.K., Yun, H.J., Kim, Y.M., Kim, J.R., et al. Altered frequency and migration capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. **2008**, *Rheumatology (Oxford)*, 6 - 789-94

- Levitsky, J., Miller, J., Wang, E., Rosen, A., Flaa, C., et al. Immunoregulatory profiles in liver transplant recipients on different immunosuppressive agents. **2009**, *Hum Immunol*, 3 - 146-50
- Levy, I. and Sherman, M. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. **2002**, *Gut*, 6 - 881-5
- Lewis, R.S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. **2001**, *Annu Rev Immunol*, - 497-521
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K. and Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **2006**, *Annu Rev Immunol*, - 99-146
- Li, S., Jones, K.L., Woollard, D.J., Dromey, J., Paukovics, G., et al. Defining target antigens for CD25+ FOXP3 + IFN-gamma- regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. **2007**, *Immunol Cell Biol*, 3 - 197-204
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. **2008**, *J Immunol*, 9 - 5916-26
- Liao, G., Nayak, S., Regueiro, J.R., Berger, S.B., Detre, C., et al. GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. **2010**, *Int Immunol*, 4 - 259-70
- Lim, D.G., Joe, I.Y., Park, Y.H., Chang, S.H., Wee, Y.M., et al. Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. **2007**, *Transpl Immunol*, 2 - 94-100
- Lim, H.W., Hillsamer, P., Banham, A.H. and Kim, C.H. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. **2005**, *J Immunol*, 7 - 4180-3
- Lin, W., Truong, N., Grossman, W.J., Haribhai, D., Williams, C.B., et al. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. **2005**, *J Allergy Clin Immunol*, 5 - 1106-15
- Liston, A. and Rudensky, A.Y. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. **2007**, *Curr Opin Immunol*, 2 - 176-85
- Liu, T., Soong, L., Liu, G., Konig, R. and Chopra, A.K. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. **2009**, *Biol Direct*, - 40
- Liu, V.C., Wong, L.Y., Jang, T., Shah, A.H., Park, I., et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. **2007**, *J Immunol*, 5 - 2883-92
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **2006**, *J Exp Med*, 7 - 1701-11
- Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. **2002**, *J Immunol*, 5 - 2756-61
- Long, E. and Wood, K.J. Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic. **2009**, *Transplantation*, 9 - 1050-6
- Long, S.A. and Buckner, J.H. Combination of rapamycin and IL-2 increases de novo induction of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T cells. **2008**, *J Autoimmun*, 4 - 293-302
- Lopez-Hoyos, M., Segundo, D.S., Fernandez-Fresnedo, G., Marin, M.J., Gonzalez-Martin, V., et al. Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression. **2009**, *Transplantation*, 3 Suppl - S31-9
- Lowin, B., Peitsch, M.C. and Tschopp, J. Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. **1995**, *Curr Top Microbiol Immunol*, - 1-24
- Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foug, S., et al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. **2003**, *J Biol Chem*, 22 - 20358-66
- Lu, L., Qian, X.F., Rao, J.H., Wang, X.H., Zheng, S.G., et al. Rapamycin promotes the expansion of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells after liver transplantation. **2010**, *Transplant Proc*, 5 - 1755-7
- Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A.M. and Lundin, B.S. Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. **2003**, *Infect Immun*, 4 - 1755-62
- Luo, X., Tarbell, K.V., Yang, H., Pothoven, K., Bailey, S.L., et al. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. **2007**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 8 - 2821-6
- Lupo, L., Panzera, P., Tandoi, F., Carbotta, G., Giannelli, G., et al. Basiliximab versus steroids in double therapy immunosuppression in liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. **2008**, *Transplantation*, 7 - 925-31
- Luther, C., Adamopoulou, E., Stoeckle, C., Brucklacher-Waldert, V., Rosenkranz, D., et al. Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients. **2009**, *J Immunol*, 2 - 841-8

- Ma, A., Qi, S., Song, L., Hu, Y., Dun, H., et al. Adoptive transfer of CD4(+)CD25(+) regulatory cells combined with low-dose sirolimus and anti-thymocyte globulin delays acute rejection of renal allografts in Cynomolgus monkeys. **2010**, *Int Immunopharmacol*, -
- Ma, S., Boerner, J.E., TiongYip, C., Weidmann, B., Ryder, N.S., et al. NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis C virus alone or in combination with alpha interferon. **2006**, *Antimicrob Agents Chemother*, 9 - 2976-82
- MacMillan, D. and McCarron, J.G. Regulation by FK506 and rapamycin of Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: the role of FK506 binding proteins and mTOR. **2009**, *Br J Pharmacol*, 4 - 1112-20
- Maddur, M.S., Othy, S., Hegde, P., Vani, J., Lacroix-Desmazes, S., et al. Immunomodulation by intravenous immunoglobulin: role of regulatory T cells. **2010**, *J Clin Immunol*, - S4-8
- Maecker, H.T. Human CD81 directly enhances Th1 and Th2 cell activation, but preferentially induces proliferation of Th2 cells upon long-term stimulation. **2003**, *BMC Immunol*, - 1
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **2006**, *Nature*, 7090 - 231-4
- Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **2001**, *Lancet*, 9286 - 958-65
- Manousou, P., Samonakis, D., Cholongitas, E., Patch, D., O'Beirne, J., et al. Outcome of recurrent hepatitis C virus after liver transplantation in a randomized trial of tacrolimus monotherapy versus triple therapy. **2009**, *Liver Transpl*, 12 - 1783-91
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. Cancer-related inflammation. **2008**, *Nature*, 7203 - 436-44
- Manzia, T.M., Toti, L., Angelico, R., Di Cocco, P., Orlando, G., et al. Steroid-free immunosuppression after liver transplantation does not increase the risk of graft fibrosis. **2010**, *Transplant Proc*, 4 - 1237-9
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M. and Rudensky, A.Y. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. **2005**, *J Exp Med*, 7 - 1061-7
- Martel, R.R., Klicius, J. and Galet, S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. **1977**, *Can J Physiol Pharmacol*, 1 - 48-51
- Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **1992**, *J Virol*, 5 - 3225-9
- Martin, A.P., Goldstein, R.M., Dempster, J., Netto, G.J., Katabi, N., et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma before liver transplantation--a clinical and histological examination. **2006**, *Clin Transplant*, 6 - 695-705
- Martins, G. and Calame, K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. **2008**, *Annu Rev Immunol*, - 133-69
- Matteoli, G., Mazzini, E., Iliiev, I.D., Mileti, E., Fallarino, F., et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. **2010**, *Gut*, 5 - 595-604
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. **1996**, *N Engl J Med*, 11 - 693-9
- McGeachy, M.J., Stephens, L.A. and Anderton, S.M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. **2005**, *J Immunol*, 5 - 3025-32
- McGuirk, P., McCann, C. and Mills, K.H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. **2002**, *J Exp Med*, 2 - 221-31
- McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **2002**, *Immunity*, 2 - 311-23
- McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **1998**, *N Engl J Med*, 21 - 1485-92
- Mempel, T.R., Pittet, M.J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., et al. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. **2006**, *Immunity*, 1 - 129-41
- Miles, K.K., Stern, S.T., Smith, P.C., Kessler, F.K., Ali, S., et al. An investigation of human and rat liver microsomal mycophenolic acid glucuronidation: evidence for a principal role of UGT1A enzymes and species differences in UGT1A specificity. **2005**, *Drug Metab Dispos*, 10 - 1513-20

- Mills, K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **2004**, *Nat Rev Immunol*, 11 - 841-55
- Miroux, C., Vausselin, T. and Delhem, N. Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response. **2010**, *Expert Opin Biol Ther*, 11 - 1563-72
- Miroux, C., Morales, O., Carpentier, A., Dharancy, S., Conti, F., et al. Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells in vitro. **2009**, *Transplant Proc*, 8 - 3371-4
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. and Kaveri, S.V. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. **2004**, *J Immunol*, 8 - 4676-80
- Miyara, M. and Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **2007**, *Trends Mol Med*, 3 - 108-16
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. **1992**, *Cell*, 5 - 869-77
- Montano-Loza, A.J., Wasilenko, S., Bintner, J. and Mason, A.L. Cyclosporine A protects against primary biliary cirrhosis recurrence after liver transplantation. **2010**, *Am J Transplant*, 4 - 852-8
- Moradpour, D., Penin, F. and Rice, C.M. Replication of hepatitis C virus. **2007**, *Nat Rev Microbiol*, 6 - 453-63
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., et al. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. **2004**, *J Virol*, 23 - 13278-84
- Morrissey, P.J., Charrier, K., Braddy, S., Liggitt, D. and Watson, J.D. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. **1993**, *J Exp Med*, 1 - 237-44
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **1986**, *J Immunol*, 7 - 2348-57
- Mottet, C., Uhlig, H.H. and Powrie, F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. **2003**, *J Immunol*, 8 - 3939-43
- Mouly, E., Chemin, K., Nguyen, H.V., Chopin, M., Mesnard, L., et al. The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells. **2010**, *J Exp Med*, 10 - 2113-25
- Muller, Y.D., Mai, G., Morel, P., Serre-Beinier, V., Gonelle-Gispert, C., et al. Anti-CD154 mAb and rapamycin induce T regulatory cell mediated tolerance in rat-to-mouse islet transplantation. **2010**, *PLoS One*, 4 - e10352
- Muratori, L., Gibellini, D., Lenzi, M., Cataleta, M., Muratori, P., et al. Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **1996**, *Blood*, 7 - 2768-74
- Murphy, D., Chamberland, J., Dandavino, R. and Sablon, E. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **2007**, *Hepatology*, 623A -
- Murphy, K.M. and Reiner, S.L. The lineage decisions of helper T cells. **2002**, *Nat Rev Immunol*, 12 - 933-44
- Nakagawa, M., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Kanazawa, N., et al. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. **2004**, *Biochem Biophys Res Commun*, 1 - 42-7
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. **2004**, *J Immunol*, 2 - 834-42
- Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Bevitt, D.J. and Toms, G.L. Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver. **2004**, *J Gen Virol*, Pt 6 - 1497-507
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K. and Messaoudi, I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. **2004**, *Nat Rev Immunol*, 2 - 123-32
- Nishikawa, H. and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. **2010**, *Int J Cancer*, 4 - 759-67
- Nishizuka, Y. and Sakakura, T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. **1969**, *Science*, 906 - 753-5
- Noben-Trauth, N., Hu-Li, J. and Paul, W.E. Conventional, naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. **2000**, *J Immunol*, 7 - 3620-5
- O'Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **1998**, *Immunity*, 3 - 275-83
- Ogino, H., Nakamura, K., Ihara, E., Akiho, H. and Takayanagi, R. CD4(+)CD25 (+) Regulatory T Cells Suppress Th17-Responses in an Experimental Colitis Model. **2010**, *Dig Dis Sci*, -

- Ohkura, N. and Sakaguchi, S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. **2010**, *Semin Immunopathol*, 2 - 95-106
- Oikawa, T., Ojima, H., Yamasaki, S., Takayama, T., Hirohashi, S., et al. Multistep and multicentric development of hepatocellular carcinoma: histological analysis of 980 resected nodules. **2005**, *J Hepatol*, 2 - 225-9
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. **1999**, *Cancer Res*, 13 - 3128-33
- Ormandy, L.A., Hillemann, T., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Greten, T.F., et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. **2005**, *Cancer Res*, 6 - 2457-64
- Ostergaard, H.L., Kane, K.P., Mescher, M.F. and Clark, W.R. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. **1987**, *Nature*, 6143 - 71-2
- Otero, A., Varo, E., de Urbina, J.O., Martin-Vivaldi, R., Cuervas-Mons, V., et al. A prospective randomized open study in liver transplant recipients: daclizumab, mycophenolate mofetil, and tacrolimus versus tacrolimus and steroids. **2009**, *Liver Transpl*, 11 - 1542-52
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q. and Li, M.O. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. **2010\***, *Immunity*, 5 - 642-53
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J.H., DePinho, R.A., et al. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. **2010**, *Nat Immunol*, 7 - 618-27
- Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. **1998**, *Immunity*, 5 - 745-55
- Ozeki, Y., Sugawara, I., Udagawa, T., Aoki, T., Osada-Oka, M., et al. Transient role of CD4+CD25+ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. **2010**, *Int Immunol*, 3 - 179-89
- Pachiadakis, I., Pollara, G., Chain, B.M. and Naoumov, N.V. Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? **2005**, *Lancet Infect Dis*, 5 - 296-304
- Paeshuysse, J., Kaul, A., De Clercq, E., Rosenwirth, B., Dumont, J.M., et al. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. **2006**, *Hepatology*, 4 - 761-70
- Pallet, N., Beaune, P., Legendre, C. and Anglicheau, D. Rapamycine and mTOR inhibitors: from bench to bedside. **2006**, *Ann Biol Clin (Paris)*, 2 - 107-15
- Parish, C.R. and Liew, F.Y. Immune response to chemically modified flagellin. 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. **1972**, *J Exp Med*, 2 - 298-311
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **2005**, *Nat Immunol*, 11 - 1133-41
- Park, Y.H., Koo, S.K., Kim, Y., Kim, H.M., Joe, I.Y., et al. Effect of in vitro expanded CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy combined with lymphodepletion in murine skin allotransplantation. **2010**, *Clin Immunol*, 1 - 43-54
- Parronchi, P., De Carli, M., Manetti, R., Simonelli, C., Sampognaro, S., et al. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. **1992**, *J Immunol*, 9 - 2977-83
- Pavio, N., Battaglia, S., Boucreux, D., Arnulf, B., Sobesky, R., et al. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. **2005**, *Oncogene*, 40 - 6119-32
- Pawlotsky, J.M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **2004**, *Trends Microbiol*, 2 - 96-102
- Pawlotsky, J.M., Chevaliez, S. and McHutchison, J.G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. **2007**, *Gastroenterology*, 5 - 1979-98
- Perrella, A., Arenga, G., Pisaniello, D., Rampone, B., Di Costanzo, G.G., et al. Elevated CD4+/CD25+ T-cell frequency and function during hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. **2009**, *Transplant Proc*, 5 - 1761-6
- Perz, J.F., Armstrong, G.L., Farrington, L.A., Hutin, Y.J. and Bell, B.P. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **2006**, *J Hepatol*, 4 - 529-38
- Peters, D.H., Fitton, A., Plosker, G.L. and Faulds, D. Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. **1993**, *Drugs*, 4 - 746-94
- Pham, T.N. and Michalak, T.I. Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection. **2008**, *World J Gastroenterol*, 18 - 2789-93

- Piazzolla, G., Tortorella, C., Schiraldi, O. and Antonaci, S. Relationship between interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 production in chronic hepatitis C and in vitro effects of interferon-alpha. **2000**, *J Clin Immunol*, 1 - 54-61
- Piccirillo, C.A. and Shevach, E.M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. **2001**, *J Immunol*, 3 - 1137-40
- Piccirillo, C.A., Letterio, J.J., Thornton, A.M., McHugh, R.S., Mamura, M., et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. **2002**, *J Exp Med*, 2 - 237-46
- Pillai, A.A. and Levitsky, J. Overview of immunosuppression in liver transplantation. **2009**, *World J Gastroenterol*, 34 - 4225-33
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., et al. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. **2003**, *J Virol*, 7 - 4070-80
- Polanczyk, M.J., Carson, B.D., Subramanian, S., Afentoulis, M., Vandenbark, A.A., et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. **2004**, *J Immunol*, 4 - 2227-30
- Powell, B.R., Buist, N.R. and Stenzel, P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. **1982**, *J Pediatr*, 5 - 731-7
- Powrie, F. and Mason, D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. **1990**, *J Exp Med*, 6 - 1701-8
- Powrie, F. and Mason, D. Subsets of rat CD4+ T cells defined by their differential expression of variants of the CD45 antigen: developmental relationships and in vitro and in vivo functions. **1990**, *Curr Top Microbiol Immunol*, - 79-96
- Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Caddle, L.B. and Coffman, R.L. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. **1993**, *Int Immunol*, 11 - 1461-71
- Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S.S., Niederau, C., Minuk, G.S., et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **1998**, *Lancet*, 9138 - 1426-32
- Prado, C., Gomez, J., Lopez, P., de Paz, B., Gutierrez, C., et al. Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. **2010**, *Immunobiology*, -
- Presser, K., Schwinge, D., Wegmann, M., Huber, S., Schmitt, S., et al. Coexpression of TGF-beta1 and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity. **2008**, *J Immunol*, 11 - 7751-8
- Qin, S.X., Wise, M., Cobbold, S.P., Leong, L., Kong, Y.C., et al. Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies. **1990**, *Eur J Immunol*, 12 - 2737-45
- Radkowski, M., Wilkinson, J., Nowicki, M., Adair, D., Vargas, H., et al. Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. **2002**, *J Virol*, 2 - 600-8
- Rahmoun, M., Foussat, A., Groux, H., Pene, J., Yssel, H., et al. Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity. **2006**, *Int Arch Allergy Immunol*, 2 - 139-49
- Ramirez, S., Perez-Del-Pulgar, S., Carrion, J.A., Costa, J., Gonzalez, P., et al. Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation. **2009**, *Am J Transplant*, 7 - 1591-601
- Rantala, M. and van de Laar, M.J. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. **2008**, *Euro Surveill*, 21 -
- Rao, P.E., Petrone, A.L. and Ponath, P.D. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- $\beta$ . **2005**, *J Immunol*, 3 - 1446-55
- Rayhill, S.C., Barbeito, R., Katz, D., Voigt, M., Labrecque, D., et al. A cyclosporine-based immunosuppressive regimen may be better than tacrolimus for long-term liver allograft survival in recipients transplanted for hepatitis C. **2006**, *Transplant Proc*, 10 - 3625-8
- Redmond, W.L. and Sherman, L.A. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. **2005**, *Immunity*, 3 - 275-84
- Rehermann, B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. **2009**, *J Clin Invest*, 7 - 1745-54
- Rehermann, B. and Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **2005**, *Nat Rev Immunol*, 3 - 215-29
- Rezvani, K., Mielke, S., Ahmadzadeh, M., Kilical, Y., Savani, B.N., et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. **2006**, *Blood*, 4 - 1291-7

- Riezu-Boj, J.I., Larrea, E., Aldabe, R., Guembe, L., Casares, N., et al. Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection. **2010**, *J Hepatol*, -
- Rincon, M. MAP-kinase signaling pathways in T cells. **2001**, *Curr Opin Immunol*, 3 - 339-45
- Rodrigue-Gervais, I.G., Rigsby, H., Jouan, L., Sauve, D., Sekaly, R.P., et al. Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8+ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection. **2010**, *J Immunol*, 6 - 3134-44
- Rodriguez-Luna, H. and Douglas, D.D. Natural history of hepatitis C following liver transplantation. **2004**, *Curr Opin Infect Dis*, 4 - 363-71
- Rodriguez-Luna, H., Khatib, A., Sharma, P., De Petris, G., Williams, J.W., et al. Treatment of recurrent hepatitis C infection after liver transplantation with combination of pegylated interferon alpha2b and ribavirin: an open-label series. **2004\***, *Transplantation*, 2 - 190-4
- Romagnani, S. The role of lymphocytes in allergic disease. **2000**, *J Allergy Clin Immunol*, 3 - 399-408
- Roncarolo, M.G. and Battaglia, M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. **2007**, *Nat Rev Immunol*, 8 - 585-98
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **2006**, *Immunol Rev*, - 28-50
- Ruggenenti, P., Perico, N., Gotti, E., Cravedi, P., D'Agati, V., et al. Sirolimus versus cyclosporine therapy increases circulating regulatory T cells, but does not protect renal transplant patients given alemtuzumab induction from chronic allograft injury. **2007**, *Transplantation*, 8 - 956-64
- Ruprecht, C.R., Gattorno, M., Ferlito, F., Gregorio, A., Martini, A., et al. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. **2005**, *J Exp Med*, 11 - 1793-803
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J., et al. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. **1994**, *Science*, 5188 - 1208-12
- Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. **1990**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 17 - 6547-9
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **2004**, *Annu Rev Immunol*, - 531-62
- Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **2005**, *Nat Immunol*, 4 - 345-52
- Sakaguchi, S., Takahashi, T. and Nishizuka, Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. **1982**, *J Exp Med*, 6 - 1565-76
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. and Masuda, T. 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. **1985**, *J Exp Med*, 1 - 72-87
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. 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. **1995**, *J Immunol*, 3 - 1151-64
- Samelson, L.E., Harford, J.B. and Klausner, R.D. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. **1985**, *Cell*, 1 - 223-31
- San Segundo, D., Fernandez-Fresnedo, G., Gago, M., Beares, I., Ruiz-Criado, J., et al. Number of peripheral blood regulatory T cells and lymphocyte activation at 3 months after conversion to mTOR inhibitor therapy. **2010**, *Transplant Proc*, 8 - 2871-3
- San Segundo, D., Ruiz, J.C., Fernandez-Fresnedo, G., Izquierdo, M., Gomez-Alamillo, C., et al. Calcineurin inhibitors affect circulating regulatory T cells in stable renal transplant recipients. **2006**, *Transplant Proc*, 8 - 2391-3
- Sansonno, D., Iacobelli, A.R., Cornacchiulo, V., Iodice, G. and Dammacco, F. Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. **1996**, *Clin Exp Immunol*, 3 - 414-21
- Sanyal, M., Fernandez, R. and Levy, S. Enhanced B cell activation in the absence of CD81. **2009**, *Int Immunol*, 11 - 1225-37
- Saouaf, S.J., Li, B., Zhang, G., Shen, Y., Furuuchi, N., et al. Deacetylase inhibition increases regulatory T cell function and decreases incidence and severity of collagen-induced arthritis. **2009**, *Exp Mol Pathol*, 2 - 99-104
- Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M. and Takabayashi, A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. **2003**, *Cancer*, 5 - 1089-99

- Sasaki, Y., Yamada, T., Tanaka, H., Ohigashi, H., Eguchi, H., et al. Risk of recurrence in a long-term follow-up after surgery in 417 patients with hepatitis B- or hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. **2006**, *Ann Surg*, 5 - 771-80
- Sawitzki, B., Kingsley, C.I., Oliveira, V., Karim, M., Herber, M., et al. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. **2005**, *J Exp Med*, 12 - 1925-35
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **1998**, *EMBO J*, 6 - 1675-87
- Schaefer, C., Kim, G.G., Albers, A., Hoermann, K., Myers, E.N., et al. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. **2005**, *Br J Cancer*, 5 - 913-20
- Schumacher, A., Wafula, P.O., Bertoja, A.Z., Sollwedel, A., Thuere, C., et al. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. **2007**, *Obstet Gynecol*, 5 - 1137-45
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F., et al. Selection of the T cell repertoire. **1999**, *Annu Rev Immunol*, - 829-74
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. **2006**, *J Exp Med*, 7 - 1693-700
- Seeff, L.B., Hollinger, F.B., Alter, H.J., Wright, E.C., Cain, C.M., et al. Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C hepatitis: A National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. **2001**, *Hepatology*, 2 - 455-63
- Segev, D.L., Sozio, S.M., Shin, E.J., Nazarian, S.M., Nathan, H., et al. Steroid avoidance in liver transplantation: meta-analysis and meta-regression of randomized trials. **2008**, *Liver Transpl*, 4 - 512-25
- Segundo, D.S., Ruiz, J.C., Izquierdo, M., Fernandez-Fresnedo, G., Gomez-Alamillo, C., et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. **2006**, *Transplantation*, 4 - 550-7
- Selvaraj, R.K. and Geiger, T.L. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. **2007**, *J Immunol*, 2 - 11 p following 1390
- Sene, D., Levasseur, F., Abel, M., Lambert, M., Camous, X., et al. Hepatitis C Virus (HCV) Evades NKG2D-Dependent NK Cell Responses through NS5A-Mediated Imbalance of Inflammatory Cytokines. **2010**, *PLoS Pathog*, 11 - e1001184
- Serkova, N.J., Christians, U. and Benet, L.Z. Biochemical mechanisms of cyclosporine neurotoxicity. **2004**, *Mol Interv*, 2 - 97-107
- Serra, A., Nuti, S., Tavarini, S., Sammiceli, C., Rosa, D., et al. Coligation of the hepatitis C virus receptor CD81 with CD28 primes naive T lymphocytes to acquire type 2 effector function. **2008**, *J Immunol*, 1 - 174-85
- Sewgobind, V.D., van der Laan, L.J., Kho, M.M., Kraaijeveld, R., Korevaar, S.S., et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus allows the induction of functional CD4CD25 regulatory T cells by rabbit anti-thymocyte globulins. **2010**, *Clin Exp Immunol*, 2 - 364-77
- Sgourakis, G., Radtke, A., Fouzas, I., Mylona, S., Goumas, K., et al. Corticosteroid-free immunosuppression in liver transplantation: a meta-analysis and meta-regression of outcomes. **2009**, *Transpl Int*, 9 - 892-905
- Sheridan, I., Pybus, O.G., Holmes, E.C. and Klenerman, P. High-resolution phylogenetic analysis of hepatitis C virus adaptation and its relationship to disease progression. **2004**, *J Virol*, 7 - 3447-54
- Shimizu, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. **1999**, *J Immunol*, 10 - 5211-8
- Shimizu, Y.K., Hijikata, M., Iwamoto, A., Alter, H.J., Purcell, R.H., et al. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. **1994**, *J Virol*, 3 - 1494-500
- Shin, E.C., Seifert, U., Kato, T., Rice, C.M., Feinstone, S.M., et al. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. **2006**, *J Clin Invest*, 11 - 3006-14
- Shinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K., Murphy, K.M., Loh, D.Y., et al. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. **1993**, *Science*, 5096 - 822-5
- Shirane, M. and Nakayama, K.I. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. **2003**, *Nat Cell Biol*, 1 - 28-37
- Shirouzu, Y., Ryschich, E., Salnikova, O., Kerkadze, V., Schmidt, J., et al. Rapamycin inhibits proliferation and migration of hepatoma cells in vitro. **2010**, *J Surg Res*, 2 - 705-13
- Shirwan, H. Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? **1999**, *Transplantation*, 6 - 715-26
- Silverberg, N.B., Lin, P., Travis, L., Farley-Li, J., Mancini, A.J., et al. Tacrolimus ointment promotes repigmentation of vitiligo in children: a review of 57 cases. **2004**, *J Am Acad Dermatol*, 5 - 760-6

- Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.A., Chan, S.W., McOmish, F., et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **1993**, *J Gen Virol*, - 2391-9
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **2005**, *Hepatology*, 4 - 962-73
- Smyk-Pearson, S., Golden-Mason, L., Klarquist, J., Burton, J.R., Jr., Tester, I.A., et al. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. **2008**, *J Infect Dis*, 1 - 46-57
- Sojka, D.K., Hughson, A. and Fowell, D.J. CTLA-4 is required by CD4+CD25+ Treg to control CD4+ T-cell lymphopenia-induced proliferation. **2009**, *Eur J Immunol*, 6 - 1544-51
- Somasundaram, R., Jacob, L., Swoboda, R., Caputo, L., Song, H., et al. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. **2002**, *Cancer Res*, 18 - 5267-72
- Starzl, T.E., Klintmalm, G.B., Porter, K.A., Iwatsuki, S. and Schroter, G.P. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. **1981**, *N Engl J Med*, 5 - 266-9
- Starzl, T.E., Todo, S., Fung, J., Demetris, A.J., Venkatarammam, R., et al. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. **1989**, *Lancet*, 8670 - 1000-4
- Starzl, T.E., Marchioro, T.L., Vonkaulla, K.N., Hermann, G., Brittain, R.S., et al. Homotransplantation of the Liver in Humans. **1963**, *Surg Gynecol Obstet*, - 659-76
- Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **1998**, *Science*, 5386 - 121-5
- Stepkowski, S.M. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. **2000**, *Expert Rev Mol Med*, 4 - 1-23
- Strauss, L., Czystowska, M., Szajnik, M., Mandapathil, M. and Whiteside, T.L. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. **2009**, *PLoS One*, 6 - e5994
- Sturm, N., Thelu, M.A., Camous, X., Dimitrov, G., Ramzan, M., et al. Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. **2010**, *J Hepatol*, 1 - 25-35
- Su, J. and Liu, Y.C. Foxp3 positive regulatory T cells: a functional regulation by the E3 ubiquitin ligase Itch. **2010**, *Semin Immunopathol*, 2 - 149-56
- Suffia, I., Reckling, S.K., Salay, G. and Belkaid, Y. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection. **2005**, *J Immunol*, 9 - 5444-55
- Suffia, I.J., Reckling, S.K., Piccirillo, C.A., Goldszmid, R.S. and Belkaid, Y. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. **2006**, *J Exp Med*, 3 - 777-88
- Sugimoto, K., Ikeda, F., Stadanlick, J., Nunes, F.A., Alter, H.J., et al. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. **2003**, *Hepatology*, 6 - 1437-48
- Sumpter, T.L., Payne, K.K. and Wilkes, D.S. Regulation of the NFAT pathway discriminates CD4+CD25+ regulatory T cells from CD4+CD25- helper T cells. **2008**, *J Leukoc Biol*, 3 - 708-17
- Sun, L., Yi, S. and O'Connell, P.J. Foxp3 regulates human natural CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of xenogeneic response. **2010**, *Xenotransplantation*, 2 - 121-30
- Sun, L., Yi, S. and O'Connell, P.J. IL-10 is required for human CD4(+)CD25(+) regulatory T cell-mediated suppression of xenogeneic proliferation. **2010\***, *Immunol Cell Biol*, 4 - 477-85
- Sutton, V.R., Wowk, M.E., Cancilla, M. and Trapani, J.A. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. **2003**, *Immunity*, 3 - 319-29
- Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C.D., Lee, S. and Rouse, B.T. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. **2003**, *J Exp Med*, 6 - 889-901
- Tafuri, A., Alferink, J., Moller, P., Hammerling, G.J. and Arnold, B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. **1995**, *Science*, 5236 - 630-3
- Taguchi, O. and Nishizuka, Y. Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse. **1981**, *Clin Exp Immunol*, 2 - 425-34
- Tai, P., Wang, J., Jin, H., Song, X., Yan, J., et al. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. **2008**, *J Cell Physiol*, 2 - 456-64
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **2000**, *J Exp Med*, 2 - 303-10
- Tang, A.L., Teijaro, J.R., Njau, M.N., Chandran, S.S., Azimzadeh, A., et al. CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4+ FoxP3+ T cell homeostasis. **2008**, *J Immunol*, 3 - 1806-13
- Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. **2004**, *J Exp Med*, 11 - 1455-65

- Tao, R., de Zoeten, E.F., Ozkaynak, E., Chen, C., Wang, L., et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. **2007**, *Nat Med*, 11 - 1299-307
- Tarbell, K.V., Petit, L., Zuo, X., Toy, P., Luo, X., et al. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. **2007**, *J Exp Med*, 1 - 191-201
- Tha-In, T., Metselaar, H.J., Bushell, A.R., Kwekkeboom, J. and Wood, K.J. Intravenous immunoglobulins promote skin allograft acceptance by triggering functional activation of CD4+Foxp3+ T cells. **2010**, *Transplantation*, 12 - 1446-55
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. **2002**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 24 - 15661-8
- Thornton, A.M. and Shevach, E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **1998**, *J Exp Med*, 2 - 287-96
- Tilg, H. New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. **1997**, *Gastroenterology*, 3 - 1017-21
- Timpe, J.M., Stamataki, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M.J., et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. **2008**, *Hepatology*, 1 - 17-24
- Tjon, A.S., Nicolaas, J.S., Kwekkeboom, J., de Man, R.A., Kazemier, G., et al. Increased incidence of early de novo cancer in liver graft recipients treated with cyclosporine: an association with C2 monitoring and recipient age. **2010**, *Liver Transpl*, 7 - 837-46
- Torgerson, T.R., Genin, A., Chen, C., Zhang, M., Zhou, B., et al. FOXP3 inhibits activation-induced NFAT2 expression in T cells thereby limiting effector cytokine expression. **2009**, *J Immunol*, 2 - 907-15
- Treisman, R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. **1996**, *Curr Opin Cell Biol*, 2 - 205-15
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K. and Spits, H. 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. **2009**, *Nat Immunol*, 8 - 864-71
- Trinchet, J.C., Alperovitch, A., Bedossa, P., Degos, F., Hainaut, P., et al. Epidemiology, prevention, screening and diagnosis of hepatocellular carcinoma. **2009**, *Bull Cancer*, 1 - 35-43
- Trzonkowski, P., Szarynska, M., Mysliwska, J. and Mysliwski, A. Ex vivo expansion of CD4(+)/CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy. **2009**, *Cytometry A*, 3 - 175-88
- Tsang, J.Y., Tanriver, Y., Jiang, S., Xue, S.A., Ratnasothy, K., et al. Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. **2008**, *J Clin Invest*, 11 - 3619-28
- Tschopp, J. and Mollnes, T.E. Antigenic crossreactivity of the alpha subunit of complement component C8 with the cysteine-rich domain shared by complement component C9 and low density lipoprotein receptor. **1986**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 12 - 4223-7
- Tseng, C.T. and Klimpel, G.R. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. **2002**, *J Exp Med*, 1 - 43-9
- Ueda, H., Howson, J.M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **2003**, *Nature*, 6939 - 506-11
- Uhlig, H.H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. **2006**, *J Immunol*, 9 - 5852-60
- Umehura, T., Ichijo, T., Yoshizawa, K., Tanaka, E. and Kiyosawa, K. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan. **2009**, *J Gastroenterol*, - 102-7
- Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E.M., et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. **2006**, *Blood*, 1 - 253-61
- Valitutti, N.E.a.S. Immunological synapse. **2006**, *Encyclopedia of life science*, -
- Vallerskog, T., Gunnarsson, I., Widhe, M., Risselada, A., Klareskog, L., et al. Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. **2007**, *Clin Immunol*, 1 - 62-74
- Valmori, D., Raffin, C., Raimbaud, I. and Ayyoub, M. Human RORgammat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. **2010**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 45 - 19402-7
- Valzasina, B., Piconese, S., Guiducci, C. and Colombo, M.P. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. **2006**, *Cancer Res*, 8 - 4488-95
- Vanrenterghem, Y. Role of acute rejection in chronic rejection. **1998**, *Transplant Proc*, 4 - 1210-1

- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **2008**, *Nat Immunol*, 12 - 1341-6
- Verdonk, R.C., van den Berg, A.P., Slooff, M.J., Porte, R.J. and Haagsma, E.B. Liver transplantation: an update. **2007**, *Neth J Med*, 10 - 372-80
- Villamil, F., Levy, G., Grazi, G.L., Mies, S., Samuel, D., et al. Long-term outcomes in liver transplant patients with hepatic C infection receiving tacrolimus or cyclosporine. **2006**, *Transplant Proc*, 9 - 2964-7
- Vivarelli, M., Cucchetti, A., La Barba, G., Ravaioli, M., Del Gaudio, M., et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma under calcineurin inhibitors: reassessment of risk factors for tumor recurrence. **2008**, *Ann Surg*, 5 - 857-62
- Vivarelli, M., Dazzi, A., Zanello, M., Cucchetti, A., Cescon, M., et al. Effect of different immunosuppressive schedules on recurrence-free survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. **2010**, *Transplantation*, 2 - 227-31
- Vlad, G., Ho, E.K., Vasilescu, E.R., Fan, J., Liu, Z., et al. Anti-CD25 treatment and FOXP3-positive regulatory T cells in heart transplantation. **2007**, *Transpl Immunol*, 1 - 13-21
- Vogtenhuber, C., O'Shaughnessy, M.J., Vignali, D.A. and Blazar, B.R. Outgrowth of CD4<sup>low</sup>/negCD25<sup>+</sup> T cells with suppressor function in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell cultures upon polyclonal stimulation ex vivo. **2008**, *J Immunol*, 12 - 8767-75
- von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **2005\***, *Nat Immunol*, 4 - 338-44
- von Boehmer, H. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. **2005**, *Nat Rev Immunol*, 7 - 571-7
- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E., et al. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. **1995**, *J Exp Med*, 4 - 1519-26
- Vondran, F.W., Timrott, K., Tross, J., Kollrich, S., Schwarz, A., et al. Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation. **2010**, *Transpl Int*, 5 - 514-23
- Wada, J., Suzuki, H., Fuchino, R., Yamasaki, A., Nagai, S., et al. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. **2009**, *Anticancer Res*, 3 - 881-8
- Wagner, D., Kniepeiss, D., Schaffellner, S., Jakoby, E., Mueller, H., et al. Sirolimus has a potential to influent viral recurrence in HCV positive liver transplant candidates. **2010**, *Int Immunopharmacol*, 8 - 990-3
- Waldmann, H. and Cobbold, S. How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? **1998**, *Annu Rev Immunol*, - 619-44
- Waldmeier, P.C., Zimmermann, K., Qian, T., Tintelnot-Blomley, M. and Lemasters, J.J. Cyclophilin D as a drug target. **2003**, *Curr Med Chem*, 16 - 1485-506
- Walker, L.S. and Abbas, A.K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. **2002**, *Nat Rev Immunol*, 1 - 11-9
- Walker, M.R., Kasproicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. **2003**, *J Clin Invest*, 9 - 1437-43
- Wan, Y.Y. and Flavell, R.A. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. **2006**, *Immunol Rev*, - 114-30
- Wang, H., Zhao, L., Sun, Z., Sun, L., Zhang, B., et al. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells in mice. **2006**, *Transplantation*, 11 - 1484-92
- Wang, J.P., Zhang, Y., Wei, X., Li, J., Nan, X.P., et al. Circulating Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C. **2010\***, *APMIS*, 4 - 261-70
- Wang, S., Buchli, R., Schiller, J., Gao, J., VanGundy, R.S., et al. Natural epitope variants of the hepatitis C virus impair cytotoxic T lymphocyte activity. **2010**, *World J Gastroenterol*, 16 - 1953-69
- Wang, Z., Shi, B., Jin, H., Xiao, L., Chen, Y., et al. Low-dose of tacrolimus favors the induction of functional CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>FoxP3<sup>(+)</sup> regulatory T cells in solid-organ transplantation. **2009**, *Int Immunopharmacol*, 5 - 564-9
- Wang, Z., Choice, E., Kaspar, A., Hanson, D., Okada, S., et al. Bactericidal and tumoricidal activities of synthetic peptides derived from granulysin. **2000**, *J Immunol*, 3 - 1486-90
- Wang, Z., Zhou, J., Fan, J., Tan, C.J., Qiu, S.J., et al. Sirolimus inhibits the growth and metastatic progression of hepatocellular carcinoma. **2009\***, *J Cancer Res Clin Oncol*, 5 - 715-22
- Ward, S.M., Fox, B.C., Brown, P.J., Worthington, J., Fox, S.B., et al. Quantification and localisation of FOXP3<sup>+</sup> T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. **2007**, *J Hepatol*, 3 - 316-24
- Watashi, K. Alisporivir, a cyclosporin derivative that selectively inhibits cyclophilin, for the treatment of HCV infection. **2010**, *Curr Opin Investig Drugs*, 2 - 213-24

- Wataishi, K., Hijikata, M., Hosaka, M., Yamaji, M. and Shimotohno, K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. **2003**, *Hepatology*, 5 - 1282-8
- Wataishi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., et al. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. **2005**, *Mol Cell*, 1 - 111-22
- Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R. and Harrington, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **2007**, *Annu Rev Immunol*, - 821-52
- Webster, D.P., Klenerman, P., Collier, J. and Jeffery, K.J. Development of novel treatments for hepatitis C. **2009\***, *Lancet Infect Dis*, 2 - 108-17
- Webster, K.E., Walters, S., Kohler, R.E., Mrkvan, T., Boyman, O., et al. In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. **2009**, *J Exp Med*, 4 - 751-60
- Webster, R.B., Rodriguez, Y., Klimecki, W.T. and Vercelli, D. The human IL-13 locus in neonatal CD4+ T cells is refractory to the acquisition of a repressive chromatin architecture. **2007**, *J Biol Chem*, 1 - 700-9
- Wei, H.X., Chuang, Y.H., Li, B., Wei, H., Sun, R., et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. **2008**, *J Immunol*, 10 - 7221-9
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., et al. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. **1995**, *Cell*, 2 - 331-40
- Weiner, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **2001**, *Immunol Rev*, - 207-14
- Wildin, R.S., Smyk-Pearson, S. and Filipovich, A.H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. **2002**, *J Med Genet*, 8 - 537-45
- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. **2001**, *Nat Genet*, 1 - 18-20
- Wilke, C.M., Wu, K., Zhao, E., Wang, G. and Zou, W. Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. **2010**, *Int J Cancer*, 4 - 748-58
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **2008**, *Science*, 5899 - 271-5
- Wohlfert, E.A. and Clark, R.B. 'Vive la Resistance!'--the PI3K-Akt pathway can determine target sensitivity to regulatory T cell suppression. **2007**, *Trends Immunol*, 4 - 154-60
- Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. **2001**, *Cancer Res*, 12 - 4766-72
- Wood, K.J. and Sawitzki, B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. **2006**, *Trends Immunol*, 4 - 183-7
- Wood, K.J., Feng, G., Wei, B., Sawitzki, B. and Bushnell, A.R. Interferon gamma: friend or foe? **2007**, *Transplantation*, 1 Suppl - S4-5
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. **2006**, *Cell*, 2 - 375-87
- Xie, Y., Wu, M., Song, R., Ma, J., Shi, Y., et al. A glucocorticoid amplifies IL-2-induced selective expansion of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vivo and suppresses graft-versus-host disease after allogeneic lymphocyte transplantation. **2009**, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 9 - 781-91
- Xu, G., Wang, L., Chen, W., Xue, F., Bai, X., et al. Rapamycin and tacrolimus differentially modulate acute graft-versus-host disease in rats after liver transplantation. **2010**, *Liver Transpl*, 3 - 357-63
- Yabu, J.M. and Vincenti, F. Novel immunosuppression: small molecules and biologics. **2007**, *Semin Nephrol*, 4 - 479-86
- Yamaguchi, T., Hirota, K., Nagahama, K., Ohkawa, K., Takahashi, T., et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. **2007**, *Immunity*, 1 - 145-59
- Yannelli, J.R., Sullivan, J.A., Mandell, G.L. and Engelhard, V.H. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. **1986**, *J Immunol*, 2 - 377-82
- Yoshizawa, K., Abe, H., Kubo, Y., Kitahara, T., Aizawa, R., et al. Expansion of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **2010**, *Hepatol Res*, 2 - 179-87
- Yssel, H. and Bensussan, A. Is there a novel subset of Th22 lymphocytes in the skin distinct from Th17 lymphocytes? **2010**, *Med Sci (Paris)*, 1 - 12-4

- Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Krausz, T., Chong, A., et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. **2005**, *J Exp Med*, 5 - 779-91
- Yurchenko, E., Tritt, M., Hay, V., Shevach, E.M., Belkaid, Y., et al. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of Leishmania major infection favors pathogen persistence. **2006**, *J Exp Med*, 11 - 2451-60
- Zeiser, R., Leveson-Gower, D.B., Zambricki, E.A., Kambham, N., Beilhack, A., et al. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. **2008**, *Blood*, 1 - 453-62
- Zeiser, R., Nguyen, V.H., Beilhack, A., Buess, M., Schulz, S., et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. **2006**, *Blood*, 1 - 390-9
- Zenclussen, M.L., Thuere, C., Ahmad, N., Wafula, P.O., Fest, S., et al. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. **2010**, *Am J Reprod Immunol*, 3 - 200-8
- Zeuzem, S., Feinman, S.V., Rasenack, J., Heathcote, E.J., Lai, M.Y., et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. **2000**, *N Engl J Med*, 23 - 1666-72
- Zhang, C., Shan, J., Lu, J., Huang, Y., Feng, L., et al. Rapamycin in combination with donor-specific CD4+CD25+Treg cells amplified in vitro might be realize the immune tolerance in clinical organ transplantation. **2010**, *Cell Immunol*, 2 - 111-3
- Zhang, D., Yang, W., Degauque, N., Tian, Y., Mikita, A., et al. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. **2007**, *Blood*, 9 - 4071-9
- Zhang, J., Li, H., Wang, G.S., Jiang, N., Yang, Y., et al. Effects of sirolimus on the growth of transplanted hepatocellular carcinoma. **2009**, *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 6 - 413-6
- Zhang, Q., Qian, F.H., Liu, H., Zhou, L.F., Huang, M., et al. Expression of surface markers on peripheral CD4+CD25high T cells in patients with atopic asthma: role of inhaled corticosteroid. **2008**, *Chin Med J (Engl)*, 3 - 205-12
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. and Samelson, L.E. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. **1998**, *Cell*, 1 - 83-92
- Zhang, W., Tribble, R.P., Zhu, M., Liu, S.K., McGlade, C.J., et al. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. **2000**, *J Biol Chem*, 30 - 23355-61
- Zhang, W., Zhang, D., Shen, M., Liu, Y., Tian, Y., et al. Combined administration of a mutant TGF-beta1/Fc and rapamycin promotes induction of regulatory T cells and islet allograft tolerance. **2010\***, *J Immunol*, 8 - 4750-9
- Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J. and Shevach, E.M. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. **2006**, *Blood*, 10 - 3925-32
- Zhao, J.X., Zeng, Y.Y. and Liu, Y. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy. **2007**, *J Reprod Immunol*, 2 - 71-81
- Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y.L. and Tu, W. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. **2010**, *Cell Mol Immunol*, 1 - 44-50
- Zheng, Y. and Rudensky, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. **2007**, *Nat Immunol*, 5 - 457-62
- Zhou, P.J., Wang, H., Shi, G.H., Wang, X.H., Shen, Z.J., et al. Immunomodulatory drug FTY720 induces regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in vitro. **2009**, *Clin Exp Immunol*, 1 - 40-7
- Zhu, J., Guo, L., Watson, C.J., Hu-Li, J. and Paul, W.E. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. **2001**, *J Immunol*, 12 - 7276-81
- Ziegler, S.F. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. **2007**, *Eur J Immunol*, 1 - 21-3
- Zorn, E., Nelson, E.A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. **2006**, *Blood*, 5 - 1571-9
- Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **2006**, *Nat Rev Immunol*, 4 - 295-307
- Zucman-Rossi, J. and Laurent-Puig, P. Genetic diversity of hepatocellular carcinomas and its potential impact on targeted therapies. **2007**, *Pharmacogenomics*, 8 - 997-1003



*Ne vous souciez pas d'être sans emploi ; souciez-vous plutôt d'être digne d'un emploi.  
Confucius*

## **FORMATIONS DOCTORALES**

Chers lecteurs,

dans cette partie, je vous présente les différentes formations auxquelles j'ai participé au cours de mon doctorat.

Durant mes deux premières années de thèse, j'ai participé aux modules « **Perfectionnement en langues étrangères** ». Cette formation m'a permis d'étudier différentes situations professionnelles à travers des « mises en situation ». Nous avons ainsi abordé les thèmes suivants : la présentation (soi, son entreprise, un procédé, un produit ou un projet), les réunions, la négociation, l'entretien d'embauche.

J'ai également participé à une formation de 2 jours, ayant pour but de « **Définir et formuler son projet professionnel** ». Les objectifs de ce stage ont été d'acquérir une méthodologie permettant de déterminer son projet professionnel, en définissant les acquis (savoirs, compétences, aptitudes) et les volontés (motivations, valeurs), et de se projeter professionnellement à 1 an, 5 ans, ....

J'ai eu l'opportunité de suivre une formation théorique de 2 jours en cytométrie de flux. Formation qui m'a permis de mieux cerner les différents événements cellulaires qu'il est possible d'étudier par cette technique.

Au cours de ma 3<sup>ème</sup> année de doctorat, j'ai eu l'occasion de participer aux « **Doctoriales Franco-Belges** » et à la formation « **Nouveau Chapitre de la Thèse** », dont vous pouvez voir le détail ci-après.

## Doctoriales Franco - Belges

Les « Doctoriales Franco-Belges » sont un séminaire résidentiel présentant la valorisation des compétences doctorales auprès des entreprises et des organismes non marchands.

Les objectifs de ce séminaire ont été de mieux connaître la vie des organisations (entreprises privées, collectivités territoriales...) et leurs interactions, ainsi que les enjeux de l'innovation dans le monde économique actuel. Cette formation a également eu pour but de démontrer les atouts de la formation par la recherche et l'employabilité des docteurs au sein de ces organisations.

Cette formation, m'a permis d'expérimenter le travail en équipes pluridisciplinaires, via l'élaboration d'un projet innovant : de son idée à sa mise sur le marché.

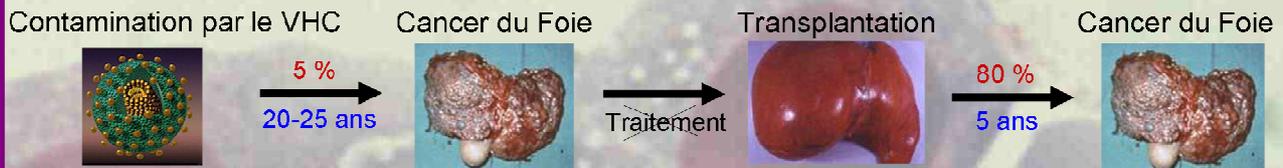
Nous avons également pu présenter nos travaux de recherche aux différents doctorants du groupe de travail. Vous pouvez visualiser le poster, que j'ai présenté aux Doctoriales 2009, ci-après. Il a été nécessaire, au cours de cet exercice, de vulgariser la présentation de nos travaux, afin de permettre leur compréhension par des doctorants en Sciences (biologie, physique, chimie), mais également en Sciences Humaines et Sociales ou en droit.

## Réapparition du Cancer du Foie sur le nouveau Foie Transplanté lors d'une Infection par le Virus de l'Hépatite C

**Céline Miroux**

Institut de Biologie de Lille – UMR 8161  
Immunopathologie des Cancers Viro-Induits  
Financement : Bourse associative ANRS

### Le Cancer du Foie lié au Virus de l'Hépatite C (VHC)

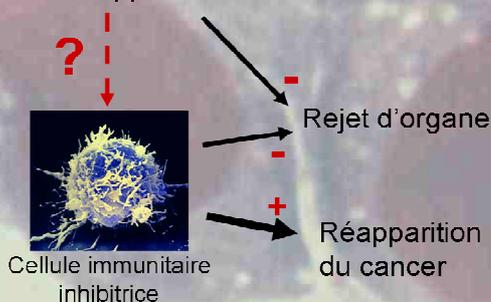


- Le cancer du foie est la 5<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde.
- Pas de traitement, la seule alternative est la transplantation d'un nouveau foie.

### Comment éviter la réapparition du Cancer du Foie ?

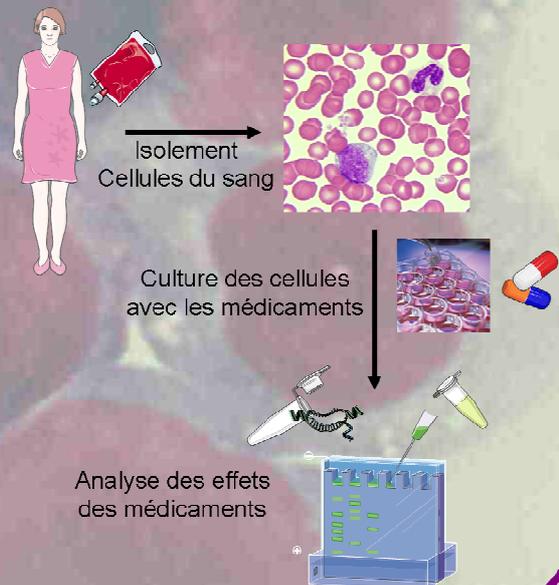
#### Objectifs

Traitement anti - rejet :  
Médicaments  
Immunosuppresseurs



Les cellules immunitaires inhibitrices empêchent le rejet de greffe mais favorisent la réapparition du cancer.

#### Comment avons-nous procédé ?



### Conclusion - Perspectives

- Ce travail est réalisé en collaboration étroite avec des cliniciens de Lille et Paris. Il a permis de mettre en évidence un Immunosuppresseur qui inhibe les cellules immunitaires inhibitrices, ce qui peut empêcher la réapparition du cancer du foie.
- A long terme, ce travail devrait permettre d'utiliser les Immunosuppresseurs les mieux adaptés après une transplantation du foie et ainsi diminuer le pourcentage de personne ayant une réapparition du cancer du foie après la transplantation.

## Nouveau Chapitre de la Thèse

J'ai eu l'opportunité, au cours de ma dernière année de thèse, de participer à la formation « *Nouveau Chapitre de la Thèse (NCT)* ». Le NCT, proposé par l'Ecole Doctorale Biologie-Santé et l'Association Bernard Grégory (ABG), a pour objectif de **valoriser les compétences** qui ont été développées au cours de la thèse (acquis professionnels, compétences, qualités personnelles) et d'analyser ainsi objectivement la manière dont la thèse a été gérée.

Ce stage est organisé de la manière suivante : 4 à 6 demi-journées de rencontres en groupe de 6 doctorants d'horizons différents, sous la direction d'un mentor issu du milieu professionnel. Mon mentor a été **Patrice Rouer**, qui est Consultant en développement des ressources humaines chez BMV & associés à Lille. L'objectif de ces réunions était d'essayer de dégager ensemble les compétences que nous avons pu acquérir au cours du doctorat. Au terme de cette formation, le doctorant est amené à présenter la valorisation de ses compétences par un rapport écrit et devant un jury composé de personnalités du monde industriel.

Le travail réalisé au cours du NCT m'a permis d'appréhender la thèse comme un projet, de dégager une multitude de compétences transférables dans d'autres activités et de m'ouvrir une voie sur différents projets professionnels.

Ainsi, vous trouverez dans le document ci-après, le mémoire du NCT scindé en différentes parties. Tout d'abord, l'explication vulgarisée de mon projet de thèse, avec les enjeux et les motivations. Dans une seconde partie, l'environnement de la thèse est détaillé : les locaux, les compétences disponibles, les partenariats et la concurrence. La troisième partie présente le déroulement de la thèse, les étapes du projet, la gestion des problèmes et le coût global. Enfin, la dernière partie expose les différentes compétences que j'ai acquises au cours de ce doctorat.



# Nouveau Chapitre de la Thèse Valorisation des Compétences

**Céline Miroux**

**Modification de l'activité inhibitrice  
des cellules immunitaires T régulatrices  
par les traitements anti-rejet  
utilisés dans les greffes du foie.**

Mentor : M. Patrice Rouer

Directeur de Thèse : Dr Nadira Delhem

Juillet 2010

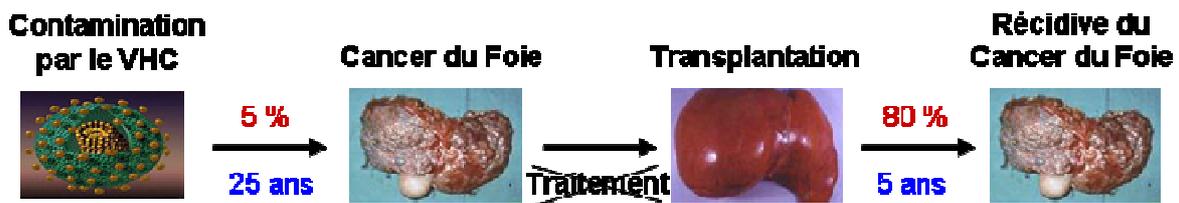
Ce « Nouveau Chapitre de la Thèse » s’inscrit dans une volonté de valoriser les compétences acquises au cours du doctorat, quelles soient scientifiques ou personnelles.

## I – Cadre général et enjeux de la thèse

### 1. Présentation de la thèse

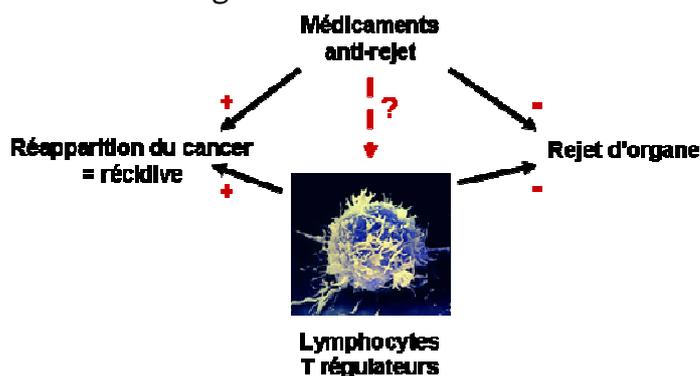
*Modification de l’activité inhibitrice des cellules immunitaires T régulatrices par les traitements anti-rejet utilisés dans les greffes du foie.*

Le Virus de l’Hépatite C (VHC) est responsable de l’hépatite C, infection qui dans 5% des cas entraîne un cancer du foie, 25 ans après la contamination. Le cancer du foie est le 4<sup>ème</sup> cancer du monde, et les pronostics annoncent une forte augmentation du nombre de personnes atteintes dans les années à venir. Le nombre de décès liés à ce cancer est de 1 million dans le monde dont 5 000 en France, chaque année. Malheureusement, le diagnostic étant souvent tardif, aucun traitement médicamenteux n’est donc possible. La seule alternative actuelle est donc l’enlèvement total du foie malade et la greffe d’un nouveau foie, on parle alors de transplantation. Cependant, le virus de l’hépatite C reste présent dans des réservoirs périphériques, telles que les cellules de l’immunité, et peut réinfecter le foie transplanté. On constate ainsi la réapparition du cancer du foie dans les 5 ans suivant la transplantation, on parle alors de récurrence.



La sévérité des récurrences a été associée à certains traitements anti-rejet, obligatoirement administrés après toute transplantation afin d’éviter le rejet de la greffe. Elle a également été associée à l’augmentation d’une population de cellules immunitaires : les lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces lymphocytes T régulateurs ont la faculté d’inhiber les cellules effectrices du système immunitaire (cellules de défense contre les infections et tout élément étranger au corps) qui pourraient détruire le foie transplanté qui est considéré comme un élément étranger. Ces Treg sont donc très importants pour la tolérance du greffon.

Dans ce contexte, l’objectif de ma thèse a donc été de déterminer si les traitements anti-rejet jouent un rôle défavorable sur la réapparition du cancer du foie en interférant avec l’activité inhibitrice des Treg.



### *Démarche utilisée et résultats obtenus*

Afin de répondre à cette question, j'ai isolé les Treg à partir de poches de sang de personnes saines (Etablissement Français du Sang, EFS) et après les avoir mis en culture, je les ai mis en contact avec les traitements anti-rejet, aux doses utilisées chez le patient.

J'ai découvert qu'un immunosuppresseur, la cyclosporine A (CsA), inhibait l'activité suppressive des Treg sur les autres cellules du système immunitaire. Ce résultat pourrait expliquer le fait que la CsA est connue pour ralentir la réapparition du cancer du foie et est associée à des rejets de greffe plus fréquents. J'ai alors cherché à comprendre comment la CsA pouvait inhiber les Treg, en étudiant sa voie de signalisation dans la cellule.

### *Les enjeux de mon projet de thèse*

Les enjeux scientifiques de ce travail de thèse sont très importants, dans la mesure où cette recherche s'inscrit dans une démarche de recherche clinique tendant à aider le patient. En effet, il n'existe pas de traitement actuellement pour contrer la récurrence du cancer du foie après la transplantation. L'objectif de ce travail n'est pas de trouver de nouveaux traitements mais d'améliorer, à long terme, l'utilisation des traitements existants et bien sûr de comprendre l'échec de certains d'entre eux.

### *Mes motivations*

L'envie de faire une thèse est venue de ma passion pour la biologie et en particulier l'immunologie, et de mon envie de répondre à une problématique médicale en cherchant à en comprendre le fonctionnement cellulaire et moléculaire. C'est aussi apprendre à gérer un projet dans son ensemble en intégrant les contraintes financières, de temps, humaines, ...

D'autre part, cette thèse, qui est très axée sur la clinique et l'amélioration des soins, me donnait l'opportunité de faire de la recherche appliquée d'intérêt public, d'allier recherche et aide médicale. De plus, l'aspect multidisciplinaire du sujet qui m'a été proposé, alliant à la fois de l'immunologie, de la cancérologie et de la virologie, m'a vraiment plu et me permettait d'élargir mes compétences pour la suite de ma carrière.

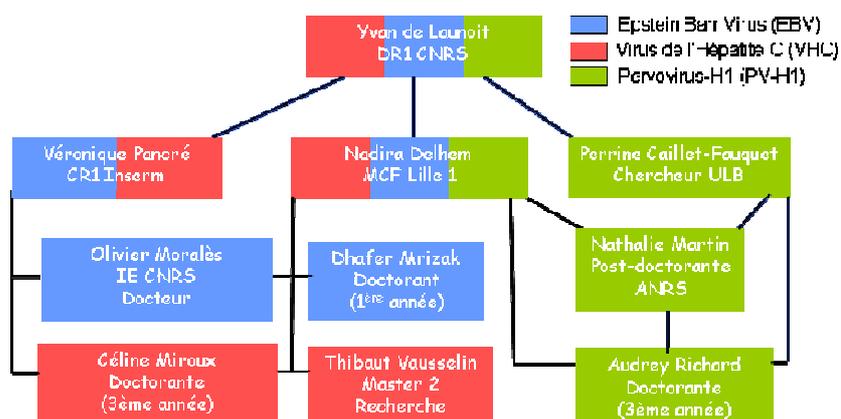
Par ailleurs, les stages saisonniers que j'ai réalisés au sein du laboratoire, avec qui j'ai toujours gardé le contact, m'ont permis d'être en confiance pour le déroulement de ce doctorat de 3 à 4 années. La liberté de décision et la confiance accordées, par ma responsable scientifique, dans la définition et la gestion de mon projet, tant au niveau de la programmation des manipulations que dans l'évolution à donner au sujet, me convenait tout à fait.

## 2. Contexte de la thèse

### *Environnement de travail*

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse est situé au sein de l'Institut de Biologie de Lille (IBL) et fait partie de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 8161, qui est une unité CNRS (Centre National de la Recherche et de la Santé) en partenariat avec les universités de Lille 1 et Lille 2 et l'Institut Pasteur de Lille (IPL). Cette unité composée de 6 équipes a focalisé l'ensemble de ses recherches sur le cancer ; de la recherche fondamentale sur les mécanismes de cancérisation et d'invasion, en passant par la chimie des tumeurs, jusqu'à des recherches plus appliquées (chimiothérapie, immunothérapie et virothérapie).

L'équipe que j'ai rejoint pour réaliser ce projet travaille sur l'ImmunoRégulation des Cancers Viro-induits (IRCV). Cette équipe est dirigée par le Pr Yvan de Launoit, également directeur administratif de l'IBL et de l'UMR 8161. Elle est constituée de 4 chercheurs, 1 ingénieur d'étude, 1 post-doctorant, 1 technicien, 3 étudiants en thèse et 1 Master 2 Recherche ; et ponctuellement quelques stagiaires. Chaque personne a un projet bien particulier, notamment l'étude des lymphomes de Hodgkin (cancers des ganglions lymphatiques) associés au Virus d'Epstein Barr (EBV), le cancer du foie associé au Virus de l'Hépatite C (VHC) et l'effet potentiel anticancéreux du Parvovirus-H1 (PV-H1) :



### Les partenariats

La collaboration avec les services cliniques d'hépatologie de l'hôpital St Antoine de Paris (Dr F. Conti, Pr Y. Calmus) et du CHRU de Lille (Dr S. Dharancy), nous a permis d'aborder et d'analyser les aspects très cliniques de mon projet en nous apportant des connaissances et une approche « médicales » que nous ne possédions pas en tant que scientifiques biologistes.

### Environnement du projet

A mon arrivée en Master 2 Recherche, en ce qui concerne le projet sur les cancers liés au VHC, l'équipe s'intéressait à l'influence des Treg sur l'évolution de l'hépatite C. Sous la direction scientifique du Dr Nadira Delhem, ils ont pu montrer qu'un nombre élevé de Treg était en partie responsable et prédictif de l'évolution de la maladie jusqu'au cancer du foie, mais également de la sévérité des réapparitions du cancer après la transplantation.

Mon travail de thèse s'est alors inscrit dans la continuité de ces travaux. En effet, l'équipe voulait déterminer les moyens par lesquels les Treg pouvaient influencer la réapparition du cancer. Etait-ce parce que leur activité était modifiée par un élément extérieur? D'autant plus que de nombreuses études, réalisées chez les patients, tendaient à montrer que les traitements anti-rejet pouvaient influencer la réapparition du cancer du foie.

J'ai donc été recrutée pour analyser l'effet des immunosuppresseurs sur l'activité des Treg. Par ailleurs, ayant effectué différents stages dans ce laboratoire au cours de mes études, je disposais déjà des compétences techniques et la connaissance du matériel pour mener à bien ce projet.

### Concurrence nationale et internationale

Dans le monde scientifique, de nombreuses équipes étudient la population T régulatrice. Ceci est du au fait que ces cellules sont impliquées dans de nombreux

processus pathologiques et de cancérisation. Cependant, l'effet des immunosuppresseurs sur les Treg est très peu analysé. A l'origine de mes travaux, seules 3 études avaient été publiées sur l'effet des immunosuppresseurs sur les Treg. Cependant, deux d'entre elles avaient été réalisées dans des modèles animaux (rat, souris), difficilement transposables chez l'Homme, et la dernière avait analysé les Treg humains *in vitro* mais ne s'était intéressée qu'à leur caractérisation (expression des molécules spécifiques des Treg) et aucunement à leur activité inhibitrice sur les autres cellules de l'immunité.

Depuis 4 ans, différentes équipes s'intéressent à cette thématique. La plupart sont basées en Europe (Angleterre, Allemagne, Italie, Pays bas, Pologne et France : St Etienne) et une en Corée. La plupart de ces études ont été réalisées chez la souris. Les seules équipes ayant étudié l'effet des drogues immunosuppressives sur les Treg humains, l'ont fait soit (i) *in vivo* en extrapolant les observations faites chez les patients sous traitements anti-rejet, ce qui ne permet pas d'être certain de l'effet direct des traitements anti-rejet sur les Treg ; soit (ii) *in vitro* en analysant le nombre et/ou l'expression des molécules des Treg mais sans étudier l'activité suppressive des Treg. Au jour d'aujourd'hui, seule une équipe polonaise ayant la même approche que la notre a publié un abstract, en Mars 2010. L'ensemble de ces données montre que mon travail de thèse et mon approche sur l'étude de l'effet des traitements anti-rejet sur les Treg sont innovants et pertinents.

### *Capital de compétences*

La réalisation de ce projet a été possible grâce aux différentes compétences scientifiques et techniques mises à ma disposition. En effet, j'ai eu la chance d'être encadrée, dès mon Master 2 Recherche, par le Dr Nadira Delhem, qui a 15 années d'expérience sur le VHC et une dizaine d'années d'expérience sur les mécanismes immunitaires d'immunorégulation. Par ailleurs, son étroite collaboration avec les cliniciens hépatologues, m'a permis de mieux appréhender la partie médicale de mon travail.

Tout au long de ma thèse, j'ai eu la possibilité d'encadrer de nombreux stagiaires du BTS au Master 2 Recherche ou Professionnel ; stagiaires dont l'aide technique m'a été précieuse. De plus, au sein de l'équipe, chaque collègue a toujours été prêt à apporter son aide dans les moments de débordement.

Le fait de réaliser ce Doctorat à l'IBL, au sein du campus de l'Institut Pasteur de Lille, a certainement contribué au bon avancement de mes travaux de recherche. En effet, le campus Pasteur offre un accès libre à de nombreux moyens techniques (différents systèmes de microscopie, cytométrie de flux, trieur de cellules, PCR quantitative en temps réel, ...), ce qui facilite la réalisation des expériences.

## **II – Déroulement, Gestion et Coût du projet**

### **1. Préparation et cadrage du projet**

#### *Les facteurs de risque et Maitrise de ces risques*

A mon arrivée au laboratoire en Master, l'équipe avait déjà de grandes compétences en caractérisation phénotypique des Treg, mais aucune tentative d'isolement de ces cellules n'avait été réalisée. Sachant que les Treg représentent ~5 % des cellules du sang, nous savions que nous aurions besoin de grandes quantités de sang afin de mener à bien le projet. Pour cela, nous nous sommes rapprochés de l'Etablissement Français du Sang

(EFS), afin de signer une convention avec eux pour la récupération de poche de sang total (~500mL). J'ai mis en place la technique d'isolement des Treg, dès le début de mon Master, en l'améliorant afin d'obtenir une meilleure pureté et un meilleur rendement. 6 mois de mise au point ont été nécessaires pour valider le caractère T régulateurs des cellules isolées.

Un autre aspect limitant de mon projet de thèse était l'accès à des prélèvements sanguins de patients en récidive du cancer du foie. Pour pallier à cela, nous avons renforcé notre collaboration avec les services cliniques d'hépatologie, notamment de Paris, qui se sont alors associés à mon projet de recherche. Nous avons ainsi pu, avec leur soutien, déposer une demande au comité d'éthique, afin d'être autorisés à travailler sur des prélèvements de patients. Nous avons également, grâce aux médecins collaborateurs, pu accéder à certains médicaments qui n'étaient pas destinés à un usage de recherche.

Enfin, sur un plan financier, l'isolement des Treg est très coûteux et les financements publics octroyés au laboratoire chaque année ne peuvent en aucun cas couvrir l'ensemble de ces frais. J'ai donc participé à la rédaction de nombreux appels d'offres déposés dans différentes associations telles que l'ANRS (Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites virales), l'AFEF (Association Française pour l'Etude du Foie), l'ABM (Agence de la Biomédecine), la SFT (Société Francophone de Transplantation), l'ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) et la Ligue nationale contre le cancer. En parallèle, j'ai optimisé la technique d'isolement (optimisation de l'efficacité d'isolement).

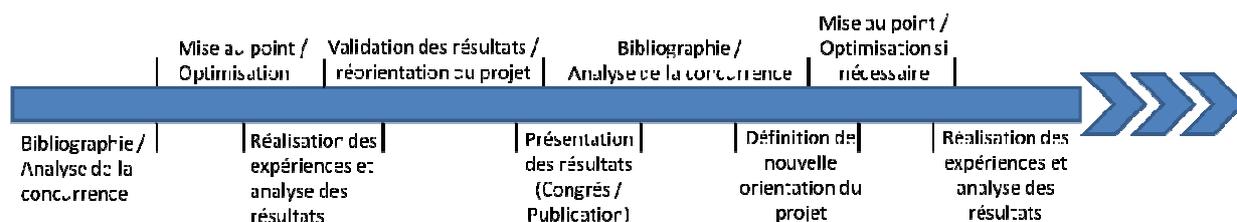
#### *Facteurs de succès*

Un point très positif et motivant au démarrage de ma thèse a été le fait que nos collaborateurs hépatologues, ainsi que la plupart des médecins rencontrés à l'occasion de congrès, voyaient un grand intérêt au projet, qui leur donnait espoir dans la compréhension de l'échec de certains traitements anti-rejet après la transplantation. Or, aucune publication scientifique n'était disponible sur le sujet et ce manque de données scientifiques confirmait bien la pertinence de la démarche que nous avons entreprise au laboratoire. Je savais donc que mon travail de thèse intéressait le monde scientifique et médical et qu'il était donc fortement susceptible de se concrétiser par des publications d'articles scientifiques.

## 2. Conduite du projet

### *Les différentes étapes du projet*

Le déroulement de mon projet de recherche s'est fait en plusieurs étapes (voir schéma ci-dessous). En effet, j'ai tout d'abord étudié la concurrence nationale et internationale, afin de savoir ce qui était connu sur le sujet et si le projet valait la peine d'être lancé. Il a également été très important de définir les moyens à mettre en œuvre, aussi bien techniques que financiers et de procéder à des mises au point techniques si nécessaire. J'ai ensuite commencé les premières expériences sur le projet, toujours suivies par une analyse des résultats et si nécessaire une réorientation du projet. Une fois que les résultats obtenus ont été validés (statistiques) et suffisants, j'ai alors rédigé un article qui a été publié dans un journal scientifique et présenté mes résultats dans différents congrès. J'ai ensuite continué le projet en réitérant ces différentes étapes, qui peuvent d'ailleurs se superposer dans le temps. Tout au long de la thèse, le schéma suivi a donc été celui ci :



### Les points d'avancement

Des points d'avancement des travaux, mensuels et collectifs, sont animés par ma responsable scientifique : discussions sur les résultats obtenus, proposition des futures expériences et réflexion sur leur faisabilité (temps, financier), réflexion scientifique, ... Ces réunions permettent une réflexion mutuelle dans le groupe, aussi bien sur son propre projet que sur les autres projets, ceci permet donc d'avoir un « regard neuf » sur les résultats et peut être des propositions de d'évolution du sujet que nous ne soupçonnions pas.

Par ailleurs, j'ai réalisé des points d'avancement scientifiques trimestriels avec nos collaborateurs hépatologues, ce qui a permis bien souvent de donner une nouvelle orientation au projet, ou de mettre le doigt sur des résultats importants qui ne nous avaient pas alerté.

Tout au long de ma thèse, il a également fallu négocier avec les différents fournisseurs de produits et kits nécessaires aux recherches. En effet, le but étant d'obtenir les meilleurs tarifs et même souvent des doses d'essai de produits à tester, qui peuvent nous permettre d'améliorer nos résultats.

### Gestion des problèmes

Mener à bien un projet de recherche, c'est aussi savoir gérer les difficultés que l'on peut rencontrer à différents niveaux. Sur le plan scientifique, les problèmes rencontrés étaient souvent d'ordres techniques tels que des pannes d'appareils dont il fallait attendre la réparation, ce qui nous faisait bien souvent modifier le planning des expériences ; mais aussi des expériences qui ne fonctionnent pas et pour lesquelles il a fallu réaliser des mises au point, voire même faire des formations dans d'autres laboratoires maîtrisant la technique.

Tout au long de mon doctorat, j'ai également été confrontée à des difficultés d'ordre financières. En effet, n'ayant pas obtenu de bourse après le Master, il m'a fallu déposer de nombreux dossiers de demandes de bourse de thèse, dans différentes associations (ANRS, AFEF, SFT), dont 3 fois pour l'ANRS. J'ai donc du exercer une activité rémunérée en parallèle de ma thèse. et gérer ces deux activités professionnelles jusqu'à l'obtention d'un financement de l'ANRS au cours de ma 2<sup>ème</sup> année de thèse.

Il est également arrivé que le laboratoire n'ai plus assez de crédit pour l'achat des consommables. Dans l'attente de l'obtention d'autres crédits, j'ai profité de ces moments pour avancer sur d'autres aspects du doctorat, tels que la rédaction de bilan sur les résultats et leur analyse, la rédaction d'articles scientifiques, la recherche bibliographique, ...

Une des difficultés du début de ma thèse a été le fait que nous étions une petite équipe (la responsable scientifique, un ingénieur d'étude et moi-même) travaillant déjà sur divers projets. Il m'a donc fallu apprendre très rapidement à être autonome et à gérer mon temps afin de pouvoir mener de front plusieurs expériences en même temps.

### 3. Evaluation du coût du projet

#### Les dépenses

Suite à l'évaluation de l'AERES en Janvier 2010, début de ma 3ème année de thèse, mon équipe de travail a considérablement évolué. J'ai donc ajouté une partie durée dans mon calcul des frais de personnel et des charges patronales (36%). Les calculs de coût en matériel et déplacements sont des valeurs moyennées (chaque expérience ou voyage étant différent) et en ce qui concerne les frais d'infrastructure, j'ai divisé le coût total pour le bâtiment par le nombre d'employés afin d'obtenir un coût par personne.

	DEPENSES						TOTAL DES DEPENSES
		Statut	Financier	Salaire mensuel brut (€)	Temps imparti au projet	Durée de participation au projet (mois)	Coût total pour le projet (€)
Frais de personnels	Moi-même	Doctorante	ANRS	2726	100 %	24	65 424
	N. Delhem	Maître de Conférences	Université	3566	30 %	36	38 516
	O. Moralès	Ingénieur d'étude	CNRS	3338	10 %	36	12 016
	N. Martin	Chercheur Post-doctorant	CNRS	2726	5 %	18	2 453
	M. Sénéchal	Technicienne	CNRS	2556	5 %	12	1 533
	3 Stagiaires	Etudiants		0	100 %	10	
Matériels et prestations	Coût estimé à 900€ / expériences, ~ 40 expériences / an						108 000
Déplacements	Collaborations : 12 voyages de 120€ Congrès : 6 congrès de 300€						3 240
Formation	Projet professionnel (250€), Doctoriales (1000€), Forum proDoc (100€), NCT (750€)						2 100
Communication	Publication d'un article scientifique						300
Infrastructures	Entretien, eau, électricité, chauffage, téléphone						1 000
<b>TOTAL</b>							<b>234 582</b>

#### Les sources de Financement du projet

Les sources de financement du projet sont très diverses, certains financements sont obtenus chaque année, comme les financements publics (ex : CNRS) attribués en fonction du nombre de chercheurs composant l'équipe, alors que les autres financements sont demandés par l'équipe auprès de différentes associations en relation avec le sujet de travail. L'obtention de ce

type de financement n'est pas systématique puisque la sélection se fait sur dossier, évalué par un comité scientifique, et le nombre de demandes est très important.

#### Conclusion

L'ensemble des salaires est à la charge des employeurs et les coûts d'entretien du bâtiment sont entièrement à la charge de l'Institut de Biologie de Lille, ces frais ne sont donc pas à prendre en compte dans le budget de l'équipe.

Reste donc à la charge de l'équipe, les coûts de manipulations, les déplacements et coûts de publications, soit 111 540€.

Les sources de financement de l'équipe pour ce projet s'élevant à un montant de 151 500€, les frais engagés sur le projet sont donc entièrement pris en charge. La somme restante sera nécessaire pour les coûts qui seront déployés sur les 6 mois restants de la thèse, tant au niveau des manipulations, que des publications ou déplacements.

Un projet de thèse peut dans certains cas créer des bénéfices financiers pour le laboratoire, si celui-ci est exploité par des firmes privées. Ce n'est pas le cas ici pour ce projet. En effet, le seul bénéfice que nous retirerons de ce travail sera la publication d'articles dans des revues internationales et donc la reconnaissance de l'équipe dans le monde scientifique.

### III – Compétences, Savoir-faire, Qualités Professionnelles et Personnelles

La réalisation de ce doctorat m'a apporté de nombreuses compétences, tant au niveau professionnel qu'au niveau personnel. Seules les compétences que j'ai trouvées significatives pour **piloter un projet** ont été développées ci-après.

#### 1. Compétences

##### *Expertise Scientifique*

Durant ces 4 années, j'ai pu approfondir mes connaissances, notamment en biologie cellulaire et plus particulièrement en **immunologie**, notamment l'immunorégulation, dans les domaines de la **cancérologie** (lymphomes, cancer du foie) et de la **virologie** (EBV, VHC,...).

##### *Compétences Techniques*

Cette thèse m'a permis de maîtriser de nombreux outils et techniques très pointus, dans différents domaines : (i) en **Biologie Cellulaire** : utilisation de microscopes, isolement de cellules immunitaires (lymphocytes T CD4+, T CD8+, T régulateurs, B, ...) en utilisant différentes techniques, culture cellulaire, test de prolifération et de suppression (radioactivité) ; (ii) en **Immunologie** : phénotypage (caractérisation) en cytométrie de flux (membranaire, intracellulaire), ELISA, Western Blot, immunohistochimie ; (iii) en **Biologie Moléculaire** : PCR quantitative en temps réel, extraction ARN, design de primers.

Par ailleurs, tout au long de mon doctorat, j'ai **utilisé des matières dangereuses** (radioactivité, produits chimiques toxiques et cancérigènes, virus, sang humain potentiellement contaminé). L'utilisation de ces ressources nécessite le respect **méticuleux** des règles d'hygiène et de sécurité (procédures de manipulation) et des règles d'**éthique (réglementation)** sur l'utilisation de produits issus de l'Homme).

##### *Gérer et réaliser un projet*

La gestion d'un projet nécessite une grande **rigueur organisationnelle** de manière à assurer le bon déroulement du projet et ce dans l'**échéance** impartie. Pour cela, j'ai **défini les ressources** nécessaires (humaines, matérielles, financières, temps,...), à court terme pour une expérience, ou à moyen et long terme dans l'évolution du projet et son cadrage sur 4 années. Cette méthode de travail **prévisionnelle** m'a ainsi permis de prendre du recul pour acquérir une vision synthétique et stratégique de mon projet et **gérer les priorités**.

Gérer ce projet a nécessité une grande **autonomie** dans l'évaluation et la planification des expériences, mais également de la **persévérance** et de l'**anticipation** dans la gestion

des problèmes qui peuvent être rencontrés, qu'ils soient techniques, financiers ou relationnels.

L'évolution de ce projet a demandé une **veille scientifique et technologique** régulière, de par la lecture de la bibliographie internationale, les discussions avec les différents partenaires (collaborateurs, commerciaux) et les congrès auxquels j'ai assisté. J'ai ainsi fait évoluer mon projet en lui donnant une nouvelle orientation et en ayant un **esprit critique** sur mes travaux.

L'aspect financier a occupé une place importante dans la réalisation de mon projet. J'ai **géré les financements** provenant de divers organismes en évaluant le coût de chaque expérience avant leur réalisation. J'ai aussi eu l'occasion, de rédiger des dossiers scientifiques de demande de financement pour le laboratoire.

*Travailler en équipe, Collaborer, Créer un réseau professionnel*

Je me suis rapidement intégrée au groupe et ai activement **participé à la vie du laboratoire**, (i) en terme d'organisation (gestion des commandes, des stocks, des délais de livraison et des relations avec les agents commerciaux pour négocier les prix des produits et obtenir des offres d'achats); (ii) sur le plan scientifique et technique, en intervenant régulièrement dans les projets de mes collègues, soit en tant que renfort technique mais plus particulièrement pour des conseils scientifiques et techniques dans leurs expérimentations.

Cette **entraide** fait partie intégrante du travail en équipe et est nécessaire à la mise en place d'un **environnement de travail** agréable. Elle a également souvent été réalisée en **inter-équipe**, au sein de l'UMR 8161 et avec les équipes de l'Institut Pasteur. Les personnes désireuses de réaliser des expériences en immunologie se sont souvent tournées vers moi afin d'obtenir des conseils techniques et scientifiques sur la méthodologie à adopter et m'ont parfois demandé de réaliser les expériences pour eux. Cette mise à disposition de mes compétences a été pour moi le point de départ de collaborations scientifiques et du réseau professionnel que je me suis créée.

Par ailleurs, j'ai également participé au renforcement de la collaboration avec les hépatologues, qui ont ainsi intégré mon projet.

De plus, j'ai la chance de connaître de nombreux étudiants des différents campus scientifiques lillois (Institut Pasteur, Lille1, Lille2-CHR). Ensemble, nous avons **créé l'association BioAddoct** (association des doctorants et docteurs en biologie et santé du nord de France) dont un des objectifs a été de mettre en place un réseau entre les doctorants et jeunes docteurs.

**Utiliser ces réseaux professionnels** a été très bénéfique tout au long de ma thèse, car connaissant les compétences de chacun il était facile de demander des conseils lorsque qu'un problème dans les manipulations se présentait.

Les collaborations établies étant très diverses, j'ai aussi régulièrement eu à **adapter** mon discours en fonction du type de collaborateur (médical, commercial, entraide)

*Gérer une équipe : Encadrer, Former*

Tout projet ne se réalise pas seul, c'est souvent le fruit d'un travail collectif, un travail d'équipe que le chef de projet doit gérer. En effet, tout au long de ma thèse, j'ai formé et encadré de nombreux **stagiaires** du BTS au Master 2 (Recherche et Professionnel). J'ai géré leurs emplois du temps et leur ai confié des « missions » selon leur niveau d'études. Je les ai également accompagnés dans la préparation du mémoire et de la soutenance de stage.

J'ai également eu la chance, lors de ma dernière année de thèse, de pouvoir encadrer entièrement le Master 2 Recherche que nous venions de recruter. Cette encadrement s'est aussi bien réalisé sur le plan technique (formation aux expérimentations), que sur le plan scientifique (analyse des résultats et évolution du sujet) ou prévisionnel (organisation du planning d'expérimentations).

Par ailleurs, ayant mis au point la technique d'isolement des Treg, j'ai eu la responsabilité de former **les nouveaux arrivants** de l'équipe, mais également les équipes techniques de nos collaborateurs.

L'ensemble de ces encadrements et formation a fait naître chez moi des capacités **pédagogiques** que je ne connaissais pas. Cette expérience m'a également permis d'améliorer mon **adaptabilité** face à un public au niveau d'étude et à l'expérience professionnelle variés.

#### *Valoriser, Exposer des Travaux*

La **communication** et la valorisation de mon travail lors de réunions scientifiques en groupe restreint ou en congrès auprès d'un public spécialiste ou non averti, ont constitué une étape essentielle de mon projet. J'ai **exposé mes travaux** à plusieurs reprises, lors de congrès nationaux (français) et internationaux (anglais), sous la forme de présentations de posters ou de présentations orales dont une en anglais.

J'ai également eu l'occasion de participer à des manifestations rassemblant des doctorants de divers horizons scientifiques (« Doctoriales » : stage de sensibilisation des docteurs au monde de l'entreprise, « Journées André Werbert » : présentation des travaux des doctorants de 2<sup>ème</sup> année de thèse de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé). La **vulgarisation** et la **pédagogie** ont alors été essentielles pour véhiculer et valoriser les résultats de mes recherches, auprès d'un public non-spécialiste.

Au cours de ma thèse, j'ai pratiqué la **rédaction** et la **synthèse** en **français** et en **anglais** : résumés en vue d'une sélection de congrès, courriels aux partenaires pour les tenir informés de l'avancée de mes travaux ou leur demander des conseils, demandes de financement, demande d'outils techniques à d'autres équipes nationales et internationales. La rédaction d'articles scientifiques et de revues en anglais sont les éléments constituant la partie la plus importante de l'exercice de rédaction que j'ai réalisé.

#### *Gérer une plateforme de matériel commun*

Suite au départ de l'ingénieur responsable de la gestion de la plateforme de cytométrie (appareil commun de l'institut et utilisé par de nombreuses équipes), j'ai pris en charge cette gestion jusqu'à son remplacement. Ce remplacement a duré un an, au cours duquel il a fallu **assurer la maintenance** du matériel : gérer les stocks, les commandes à répartir sur les différentes équipes utilisatrices, mettre en place d'une nouvelle procédure d'élimination des déchets, sauvegarder régulièrement les données, mais aussi faire intervenir un réparateur pour les pannes multiples de l'appareil (prise de RDV, accueil sur site et suivi) et former de nouveaux utilisateurs à l'utilisation de protocoles préexistants.

Cette **responsabilité** a été très enrichissante et m'a appris à être polyvalente, à **gérer les urgences** plus sereinement, tout en menant de front mon projet de thèse.

## 2. Résultats et Impact de la thèse

*Pour le Laboratoire et les collaborateurs* : Mes travaux de thèse se sont soldés par la publication d'un article dans une revue internationale et la soumission actuelle d'un

second article. Par ailleurs, mes recherches ont été présentées à six reprises lors de congrès en France ou en Europe. Cette divulgation de mes travaux a permis au laboratoire et à nos collaborateurs d'être représenté dans le monde scientifique international dans les domaines de l'hépatologie et de l'immuno-régulation.

*Pour la Recherche :* La découverte de l'effet inhibiteur de la CsA sur l'activité suppressive des Treg a permis d'expliquer l'efficacité moindre de la CsA dans le traitement des rejets de greffe, et le fait qu'en présence de CsA, les patients présentent des récurrences moins sévères du CHC après la transplantation hépatique. Ce résultat est très important pour l'ensemble du monde médical, dans la mesure où il va permettre d'adopter le traitement immunosuppresseur qui maintient l'activité des Treg, ceci afin de réduire les risques de récurrences et de rejet après la greffe. Il en découlera certainement un impact économique, du fait de l'amélioration des traitements et donc de la santé des patients. Par ailleurs, mes travaux sur la voie de signalisation utilisée par la CsA pour inhiber les Treg contribuent à une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action intracellulaire.

### 3. Pistes professionnelles envisagées

La gestion de ce projet de thèse a été, pour moi, très enrichissante aussi bien d'un point de vue scientifique (dans des domaines variés) que d'un point de vue personnel. J'y ai appris beaucoup de choses sur moi et mes capacités à mener à bien un projet, travailler en équipe, mais surtout gérer une équipe de travail (stagiaires, techniciens), gérer les priorités et les imprévus (expériences qui ne fonctionnent pas, gestion financière, pannes de matériels, ...), organiser et planifier son emploi du temps méthodiquement et rigoureusement, ....

En parallèle, les formations que j'ai suivies au cours de mon doctorat (Projet Professionnel, Doctorales, Nouveau Chapitre de la Thèse) et les petits déjeuners professionnels (rencontre doctorants/docteurs actuellement dans le privé) organisés au sein de l'association BioAddoct, m'ont ouvert d'autres opportunités d'avenir professionnel.

J'ai ainsi pu découvrir que je pouvais travailler en dehors de la recherche pure et simple mais tout en restant en lien avec mes compétences scientifiques.

Dans ce sens, un projet professionnel principal a émergé. Ma priorité après la thèse sera la recherche d'un emploi de **chef de projet R&D** en immunologie dans une entreprise pharmaceutique.

Je n'écarte pas pour autant, si l'opportunité se présente, mon intérêt pour des emplois d'**Attaché de Recherche Clinique**, ou plus administratifs tels que dans la **valorisation** des recherches des laboratoires publics ou l'**organisation de congrès** scientifiques ou de conférences grands publics. Par ailleurs, la gestion administrative et technique de la plateforme de cytométrie de flux de l'Institut de Biologie de Lille m'a permis d'envisager l'éventualité de chercher un poste d'**ingénieur de recherche en cytométrie**. Si toutefois, mes recherches d'emploi restent infructueuses, je ne renonce pas à la recherche académique (il faudra ainsi passer les concours de chercheurs de l'INSERM et du CNRS).

Par ailleurs, je reste persuadée que l'ensemble de mes compétences est transférable dans tous les domaines de travail, même dans un autre domaine que la biologie.