



**HAL**  
open science

# Le rôle des cellules T régulatrices en transplantation hépatique.

Khaldoun Ghazal

► **To cite this version:**

Khaldoun Ghazal. Le rôle des cellules T régulatrices en transplantation hépatique.. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066225 . tel-01127077

**HAL Id: tel-01127077**

**<https://theses.hal.science/tel-01127077v1>**

Submitted on 6 Mar 2015

**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.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

*UMR\_S 938, CdR Sanit-Antoine/Equipe du Pr. Chantal HOUSSET*

## **LE RÔLE DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS EN TRANSPLANTATION HEPATIQUE**

Par Khaldoun Ghazal

Thèse de doctorat de Physiologie et physiopathologie

Dirigée par Dr. Filomena Conti

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2014

Devant un jury composé de :

**Pr CALMUS Yvon**  
**Pr DUVOUX Christophe**  
**Pr LE MOINE Alain**  
**Dr DELHEM Nadira**  
**Dr MATEO Véronique**  
**Dr CONTI Filomena**

**Président du Jury**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Examineur**  
**Directeur de thèse, Membre invité**



*À mes parents...*



## **Remerciements**

A **Filo**, pour sa présence, ses conseils, son écoute, sa patience, son soutien. Tout ce travail est principalement grâce à toi..

A **Yvon**, pour son soutien ainsi que sa présence.

A **Nadira**, pour ses conseils, son écoute, et toute les discussions que nous avons eu.

### **Merci à Messieurs-dames membre du jury**

Mme le docteur Filomena Conti, pour avoir dirigé cette thèse

Mr le Professeur Yvon Calmus, pour avoir accepté de juger et présider cette thèse

Mr le Professeur Christophe Duvoux, pour avoir accepté de rapporter cette thèse ainsi que de la juger

Mr le Professeur Alain Le Moine, pour avoir accepté de rapporter cette thèse ainsi que de la juger

Mme le Docteur Nadira Delhem, pour avoir accepté de juger cette thèse

Mme le Docteur Véronique Mateo, pour avoir accepté de juger cette thèse

**Merci aux Lillois**, pour votre amitié, votre soutien, pour tous ces moments que nous avons partagé... et plus particulièrement

Nadira, Olivier, Dzafer, Laurissa,...

Grand Merci à **Samia** et **Lynda** de mon équipe à Paris, pour tous ces moments inoubliables que nous avons vécu ensemble dans le bureau 403, vous étiez ma petite famille pendant ma thèse.

**Merci à tous les membres de mon équipe au CdR, en particulier Mme le Professeur Chantal Housset pour m’avoir accueilli dans votre équipe.**

**Merci à tous mes collègues à l’Hôpital Bicêtre pour votre soutien, aide et encouragement**

**Merci à Marie-Beatrice et Sophie de l’hôpital St-Antoine**

**Merci à mes amis, en particulier**

**Hadi**, tu as été comme mon frère depuis mon arrivé à Paris

**Maen et Nada**, J’ai de la chance de vous avoir comme amis

Et à une personne qui se connaîtra... :)

*« In generosity and helping others,  
be like a river...  
In compassion and grace,  
be like sun...  
In concealing others' faults,  
be like night...  
In anger and fury,  
be like dead...  
In modesty and humility,  
be like earth...  
In tolerance,  
be like a sea...  
Either exist as you are, or be as you look»*

*Rumi*

## Sommaire

Remerciements .....	2
Sommaire .....	5
Abréviation .....	7
Résumé .....	9
Abstract : .....	10
Introduction .....	11
<b>Le système immunitaire et les lymphocytes T: .....</b>	<b>12</b>
<b>Le développement et la sélection des Lymphocytes T.....</b>	<b>12</b>
<b>Le développement des Lymphocytes T CD3<sup>+</sup> .....</b>	<b>12</b>
<b>La sélection des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> .....</b>	<b>14</b>
<b>Le récepteur des lymphocytes T <math>\alpha\beta</math>.....</b>	<b>15</b>
<b>Le complexe TCR/CD3 et la transduction du signal.....</b>	<b>17</b>
<b>Les fonctions effectrices des lymphocytes T .....</b>	<b>19</b>
<b>Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> .....</b>	<b>19</b>
<b>Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>20</b>
<b>Les lymphocytes T régulateurs.....</b>	<b>23</b>
<b>Les lymphocytes T régulateurs naturels (Treg).....</b>	<b>23</b>
<b>Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg).....</b>	<b>24</b>
<b>Les cellules Tr1 .....</b>	<b>24</b>
<b>Les cellules Th3.....</b>	<b>25</b>
<b>LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS NATURELS: .....</b>	<b>27</b>
<b>La caractérisation.....</b>	<b>27</b>
<b>Le Phénotype des cellules Treg .....</b>	<b>27</b>
<b>La différenciation des Treg.....</b>	<b>29</b>
<b>Le rôle du signal de TCR .....</b>	<b>30</b>
<b>Les mécanismes d'action des Treg .....</b>	<b>32</b>
<b>La sécrétion de cytokines immunosuppressives .....</b>	<b>33</b>
<b>La cytolyse.....</b>	<b>34</b>
<b>Les perturbations métaboliques .....</b>	<b>34</b>
<b>La modulation des cellules dendritiques .....</b>	<b>36</b>
<b>LES FONCTIONS DES CELLULES T REGULATRICES .....</b>	<b>37</b>
<b>Les Treg et la tolérance foëto-maternelle .....</b>	<b>37</b>
<b>Les Treg et maladies auto-immunes.....</b>	<b>38</b>
<b>Les Treg et l'immunité anti-infectieuse .....</b>	<b>39</b>
<b>Les Treg et l'immunité anti-tumorale.....</b>	<b>41</b>
<b>Les Treg et la transplantation d'organe.....</b>	<b>44</b>
<b>Les cellules Treg et l'hépatite C.....</b>	<b>54</b>

<b>L'Hépatite C .....</b>	<b>54</b>
<b>L'épidémiologie .....</b>	<b>54</b>
<b>Le virus de l'hépatite C.....</b>	<b>56</b>
<b>L'histoire naturelle de l'infection .....</b>	<b>57</b>
<b>Le traitement de l'Hépatite C.....</b>	<b>59</b>
<b>La réponse immunitaire et le VHC .....</b>	<b>60</b>
<b>L'immunité innée et le VHC.....</b>	<b>60</b>
<b>L'immunité adaptative et le VHC .....</b>	<b>62</b>
<b>Les lymphocytes T régulateurs et le VHC : .....</b>	<b>66</b>
<b>La Transplantation Hépatique et la récurrence virale C: .....</b>	<b>68</b>
<b>Objectifs de la thèse: .....</b>	<b>71</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>73</b>
<b>Premier article :.....</b>	<b>74</b>
<b>Deuxième article :.....</b>	<b>85</b>
<b>Troisième article :.....</b>	<b>111</b>
<b>Quatrième article : .....</b>	<b>135</b>
<b>Discussion et Conclusion.....</b>	<b>145</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>151</b>
<b>Table des illustrations .....</b>	<b>173</b>

## Abréviation

AMPc	Adenosine Monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein-1
ARN	Acide ribonucléique
CD	Cluster of Differentiation
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CMH	Complexe Majeur de Histocompatibilité
CNS	Conserved Non-coding Sequences
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CRAC	Calcium Released Activated Calcium channel
CsA	Cyclosporine A
cTEC	Cortical Thymic Epithelial Cells
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
DAG	diacylglycérol
DC	Dendritic Cell
DN	double négative
DP	double positive
E2	17- $\beta$ -oestradiol
Foxp3	Forkhead box P3
Gal	Galactine
GATA3	GATA binding protein 3
GITR	Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor
HCVcc	VHC dérivé de culture cellulaire
HSV	Herpes Simplex Virus
IBD	Inflammatory Bowel Disease
ICER	Inducible cAMP Early Repressor
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IDO	Indolamine 2,3 dioxygénase
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IP3	inositol-1,4,5-triphosphate
IPEX	Immunodysregulation polyendocrinopathy X-linked syndrome
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
iTreg	Lymphocytes T régulateurs induits
JFH1	hépatite fulminante japonais 1
LAG	Lymphocyte-activation gene
LAT	Linker for Activation of T cells
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell
MMF	Mycophénolate mofétil

<b>MPA</b>	<b>Mycophenolic acid</b>
<b>mTEC</b>	<b>Medullar Thymic Epithelial Cells</b>
<b>mTOR</b>	<b>mamalian Target Of Rapamycin</b>
<b>N-FAT</b>	<b>Nuclear Factor of Activated T cells</b>
<b>NF-kB</b>	<b>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</b>
<b>NK</b>	<b>Natural Killer</b>
<b>NKT</b>	<b>Natural Killer T</b>
<b>Nrp-1</b>	<b>Neuropilin-1</b>
<b>nTreg</b>	<b>Lymphocytes T régulateurs naturels</b>
<b>PD1</b>	<b>Programmed Death 1</b>
<b>PiP2</b>	<b>phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</b>
<b>PKC</b>	<b>Phosphokinase C</b>
<b>PLC</b>	<b>progéniteur lymphoïde commun</b>
<b>PLC</b>	<b>Phospholipase C</b>
<b>PMC</b>	<b>progéniteur myéloïde commun</b>
<b>pT<math>\alpha</math></b>	<b>pré-chaine <math>\alpha</math></b>
<b>RAG</b>	<b>recombination-activating genes</b>
<b>ROR</b>	<b>RAR-related orphan receptor</b>
<b>SRBI</b>	<b>human scavenger receptor class B type I</b>
<b>STAT</b>	<b>Signal Transduction And Transcription</b>
<b>SVR</b>	<b>Sustained viral response</b>
<b>TAA</b>	<b>Tumor Associated Antigens</b>
<b>Tac</b>	<b>Tacrolimus</b>
<b>TCR</b>	<b>T Cell Receptor</b>
<b>Th</b>	<b>Lymphocytes T Helpers</b>
<b>TH</b>	<b>Transplantation hépatique</b>
<b>TNF</b>	<b>Tumor Necrosis factor</b>
<b>TNFR2</b>	<b>Tumor Necrosis factor receptor 2</b>
<b>Tr1</b>	<b>Tren induite de type 1</b>
<b>TRAIL</b>	<b>Tumor necroses factor Related Apoptosis Inducing Ligand</b>
<b>VHB</b>	<b>Virus de l'Hépatite B</b>
<b>VHC</b>	<b>Virus de l'Hépatite C</b>
<b>VIH</b>	<b>Virus de l'Immunodéficience Humaine</b>
<b>XLAAD</b>	<b>X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome</b>

## **Résumé**

Les résultats de la transplantation hépatique (TH) se sont considérablement améliorés et la survie à long terme fait partie des préoccupations des transplantateurs. Elle dépend de la survenue d'un rejet, de la récurrence de l'hépatite C, du traitement immunosuppresseur et de ses complications. Après une transplantation hépatique suite à une complication de l'hépatite C, l'infection du greffon par le virus de l'hépatite C (VHC) est constante, et l'évolution de l'hépatite chronique est plus rapide et plus agressive que chez les non transplantés.

L'implication des cellules T régulatrices (Treg) a été suggérée dans l'induction de tolérance après transplantation d'organe et dans la persistance de l'infection par le VHC en supprimant la réponse T VHC-spécifique. De plus, le nombre et la fonction des Treg sont très probablement influencés par le traitement immunosuppresseur.

Dans ce contexte, je me suis intéressé au rôle des Treg dans l'évolution de la transplantation hépatique, et les effets des différents traitements utilisés (immunosuppresseur et anti-VHC) sur cette population régulatrice.

Les résultats de ma thèse montrent que les Treg; en particulier les cellules régulatrices de type 1 (Tr1), seraient prédictifs de la réponse au traitement antiviral C (article 1), mais aussi que ces cellules pourraient être impliquées dans l'évolution de la récurrence virale C après TH (article 2). Les résultats révèlent aussi que les inhibiteurs de mTor (Sirolimus ou Everolimus) induisent une augmentation de taux des Treg chez les patients transplantés hépatiques après changement du traitement d'un anticalcineurine (Tacrolimus) (article 3), et que les anticalcinurines (Cyclosporine A et Tacrolimus) réagissent différemment sur l'activité suppressive des Treg in vitro (article 4).

En conclusion, dans cette thèse, nous précisons le rôle majeur des lymphocytes T régulateurs à la fois dans l'évolution de la récurrence virale C sur le greffon hépatique, mais également quels sont les traitements immunosuppresseurs qui auraient un effet favorable sur le développement des Treg.



## **Abstract**

The results of liver transplantation (LT) have improved significantly, but long-term graft survival is still a major concern for doctors. It depends on the rejection rates, the recurrence of hepatitis C, and the immunosuppressive treatment and its complications. After LT, the graft reinfection with HCV is constant, and the evolution of chronic hepatitis is faster and more aggressive when compared to the time course before transplantation.

It has been suggested the regulatory T cells (Treg) are involved in the induction of tolerance after organ transplantation, and in the persistence of HCV infection by suppressing the HCV-specific T responses. Furthermore, the number and function of Treg are very likely influenced by the immunosuppressive therapy used after transplantation.

In this context, my work focuses on the role of Treg cells in the evolution of liver transplantation, and the effects of different treatments used after LT (immunosuppressive and anti-HCV) on this population.

The results of my thesis show that the Treg cells (Type-1 regulatory cells; Tr1, in particular) are predictive of the response to the anti-HCV treatment after LT (article 1), and that Treg cells are associated with severe evolution of recurrent hepatitis C (article 2). The results reveal also that some mTOR inhibitors have a positive impact on the number of circulating Treg cells in patients who underwent a conversion of therapy from Tacrolimus to a mTOR inhibitor (article 3), and that calcinurine inhibitors (Cyclosporine A and Tacrolimus) have different effects on Treg suppressive activity in vitro (article 4).

In conclusion, in this thesis, we bring evidences on the involvement of Treg cells in HCV recurrence and treatment failure after liver transplantation and in their interaction with immunosuppressive drugs.

Key words : Liver Transplantation, Hepatitis C, Regulatory T cells, Tr1, Calcinurine inhibitors, mTOR inhibitors.

# **Introduction**

## **Le système immunitaire et les lymphocytes T**

Les lymphocytes T et B sont les deux axes principaux de la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale, et les lymphocytes T sont responsables de l'immunité adaptative; en effet, elles coordonnent, orchestrent et réalisent les réponses mises en œuvre pour éradiquer les agents pathogènes. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (CD : Cluster of Differentiation) auxiliaires ou helpers (Th) sont des intermédiaires de l'immunité; ils activent d'autres types cellulaires qui agiront de manière plus directe sur la réponse. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont directement cytotoxiques et détruisent les cellules exprimant les antigènes qu'elles reconnaissent.

### **Le développement et la sélection des Lymphocytes T**

#### **Le développement des Lymphocytes T CD3<sup>+</sup>**

Les cellules souches à l'origine des lymphocytes, comme pour toutes les cellules sanguines, se trouvent dans la moelle osseuse où démarre un long processus d'ontogénèse. Au cours de cette différenciation, une cellule souche hématopoïétique peut donner soit un progéniteur myéloïde commun (PMC), soit un progéniteur lymphoïde commun (PLC). Le PLC est une cellule multipotente capable de générer trois lignages lymphoïdes (B, T et Natural Killer ou NK) suivant les signaux qu'elle intègre. En ce qui concerne le lignage T, le PLC migre en périphérie et pénètre le thymus pour y poursuivre son processus de différenciation.

Cette phase de différenciation en cellules pro-T permet de constituer un stock de thymocytes immatures qui vont subir par la suite une sélection drastique tout en migrant du cortex à la médulla. En effet, seulement 2% d'entre eux sortiront du thymus pour constituer le pool périphérique de lymphocytes matures.

Le développement des lymphocytes T naïfs dans le thymus à partir de PLC est instrumenté par l'expression successive et ordonnée de différents marqueurs de surface dont les corécepteurs CD4 et le CD8 ainsi que le CD25 et CD44. La maturation des lymphocytes T est fractionnée en trois étapes principales sur la base de l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. Le premier est le stade double négative DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) où les lymphocytes n'expriment ni le CD4 ni le CD8. Au cours de ce stade, les lymphocytes CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> représentent 1 à 5% des lymphocytes totaux (Beals, Sheridan et al. 1997), et selon

l'expression de CD25 et de CD44, on peut distinguer quatre stades différents, de DN1 à DN4 (Godfrey, Kennedy et al. 1993). Seul le CD44 est exprimé à la surface des lymphocytes T durant le stade DN1. La transition de stade DN1 au stade DN2 ( $CD25^+CD44^+$ ) est accompagnée d'une forte prolifération. Durant les stades DN2 et DN3 ( $CD25^+CD44^-$ ) ont lieu les réarrangements des gènes V, D et J codant la chaîne  $\beta$  du TCR (T Cell Receptor). Si ce processus de recombinaison génique est productif et si la chaîne  $\beta$  est fonctionnelle, elle peut alors s'apparier avec un substitut de la chaîne  $\alpha$ , la pré-chaîne  $\alpha$  (pT $\alpha$ ) afin de former à la surface des thymocytes le complexe pré-TCR (Saint-Ruf, Ungewiss et al. 1994, von Boehmer 2005). La transduction du signal par ce complexe va permettre de lever le blocage au stade DN3 et le passage au stade DN4; qui est manifesté par la perte de CD25 puis la co-expression de CD4 et CD8 et une prolifération cellulaire intense, ce qui marque le début de stade double positive DP (Alam, Travers et al. 1996), soit 80 à 90% des thymocytes totaux (Sebzda, Mariathasan et al. 1999). A ce moment, vont commencer les recombinaisons génétiques concernant les segments V et J de la chaîne  $\alpha$  du TCR. Une chaîne  $\alpha$  fonctionnelle s'apparie avec la chaîne  $\beta$  du TCR permettant l'expression d'un TCR fonctionnel à la surface des cellules DP (Figure 1).

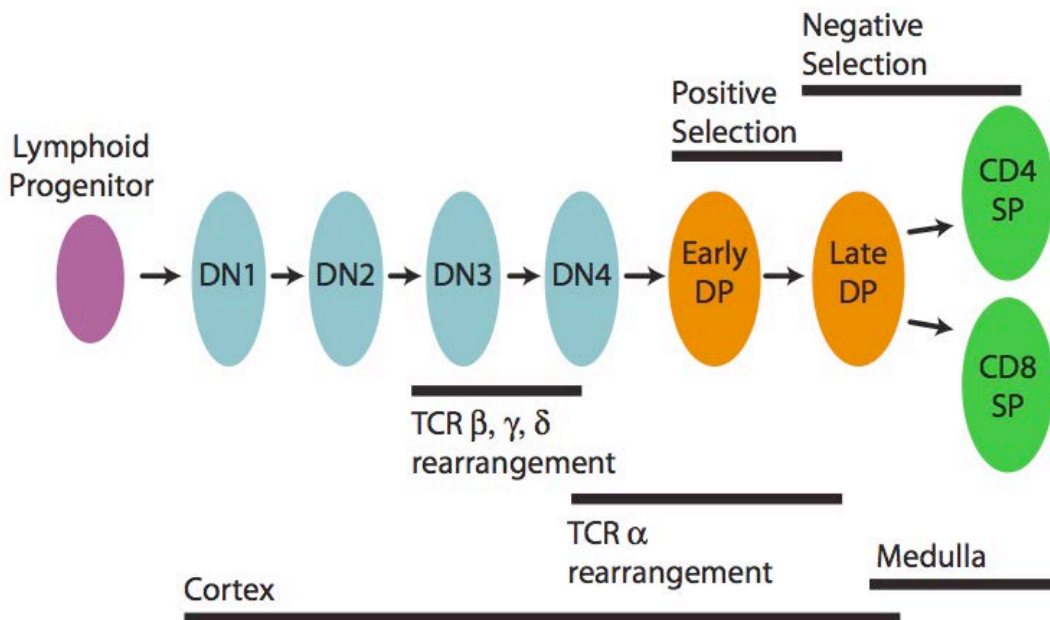


Figure 1 : les stades de développement thymique des lymphocytes T CD4 et CD8 : pendant leur développement aux stades double négatif et double positif, les thymocytes subissent un réarrangement génique afin d'exprimer un TCR  $\alpha\beta$  fonctionnel. Le passage au stade simple positif sera marqué par une sélection positive puis négative des cellules, basée sur les caractéristiques de leur TCR. (Yates 2014).

## **La sélection des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>**

La sélection des lymphocytes T qui vont quitter le thymus s'opère via deux mécanismes successifs, la sélection positive dans la partie corticale du thymus via cTEC (Cortical Thymic Epithelial Cells) suivie par une étape de sélection négative dans la médulla via mTEC (medullar Thymic Epithelial Cells) (Anderson and Takahama 2012).

L'expression du TCR  $\alpha\beta$  mature à la surface des lymphocytes marque le début de la sélection positive. Le TCR mature doit reconnaître des antigènes du soi présentés par un CMH (Complexe Majeur de Histocompatibilité). L'affinité de TCR vis-à-vis des CMH du soi/peptide antigénique aboutira à une élimination de près de 90% des lymphocytes DP incapable de les connaître avec une affinité suffisante pour intégrer les signaux de survie nécessaires.

Ensuite la sélection négative permet d'éliminer les thymocytes ayant un TCR qui reconnaît le complexe CMH/peptide antigénique du soi avec une trop forte affinité. Ces thymocytes exprimant un TCR potentiellement auto-réactif peuvent être à l'origine d'une réponse auto-immune (Yates 2014). La sélection négative met en jeu deux mécanismes : la délétion clonale, et l'anergie. La délétion clonale est impliquée si un thymocyte auto réactif reconnaît un antigène du soi présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) médullaire, alors que la reconnaissance par un thymocyte d'un peptide du soi à la surface d'une mTEC aboutira à son inactivation fonctionnelle : l'anergie.

Bien que la sélection thymique soit assez efficace, des lymphocytes auto réactifs peuvent échapper à cette double sélection et émergent dans la circulation sanguine et dans les tissus lymphoïdes périphériques. Des mécanismes de tolérance périphérique au soi permettent de palier à cet « échappement » (Kuklina 2013), des mécanismes de type actif via les lymphocytes T régulateurs (Treg) (Tang and Bluestone 2008), ainsi que de type passif aussi via l'ignorance, induction de l'apoptose ou l'anergie ont été décrits (Kuklina 2013) (Figure 2).

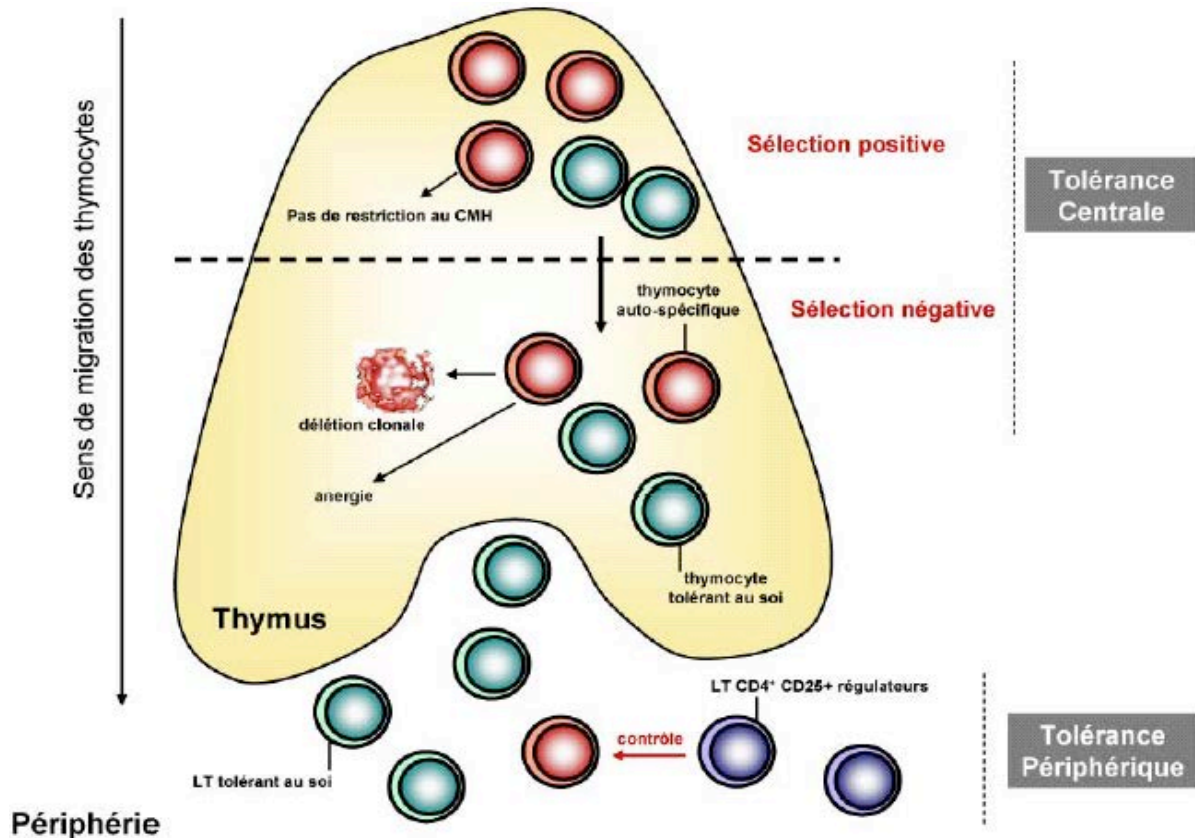


Figure 2 : Schématisation des processus de sélection thymique. Après le réarrangement des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR, les thymocytes vont subir une première sélection, la sélection positive, où la survie des thymocytes est conditionnée par la restriction au CMH. La sélection négative ensuite va permettre d'éliminer les thymocytes ayant une trop forte auto-spécificité (apoptose, anergie). Une fois la périphérie atteinte, une partie des LT potentiellement auto-réactifs 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 naïfs, ils n'ont jamais rencontré l'antigène dont ils sont spécifiques. Ils vont circuler en dehors du thymus entre les organes lymphoïdes secondaires dans l'attente de rencontrer l'antigène spécifique, ce qui leur permettra de proliférer, de se différencier, et d'acquérir des fonctions effectrices. Les thymocytes qui possèdent un TCR restreint par le CMH de classe II se développent en lymphocytes CD4+ et ceux qui possèdent un TCR restreint par le CMH de classe I se développent en lymphocytes CD8+ (Zinkernagel and Doherty 1997).

### Le récepteur des lymphocytes T $\alpha\beta$

La connaissance d'un complexe CMH/peptide présente sur une CPA par un TCR spécifique

sur un lymphocyte va permettre l'activation et l'expansion clonale du lymphocyte T.

Le TCR est composé de deux chaînes transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$  d'une composition peptidiques glycolysées de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Les deux chaînes ont une structure similaire composée d'un domaine extracellulaire contenant une région variable (V), une région constante (C) et une région charnière. Puis, on trouve un domaine transmembranaire hydrophobe et un court domaine cytoplasmique. L'association des deux chaînes se fait via un pont di-sulfure (Kuhns, Davis et al. 2006). Le TCR seul n'est pas capable de transférer les informations quantitatives et qualitatives liées à l'antigène. En effet, le TRC ne possède pas de domaine cytoplasmique, une association aux molécules du CD3 est nécessaire. Le complexe TCR/CD3 ainsi formé va induire les voies de transduction du signal proximales et précoce ce qui va permettre l'activation de la cellule T (Kuhns, Davis et al. 2006).

La molécule CD3 est composée des sous-unités polypeptidiques non polymorphes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\zeta$  qui s'associent de manière non covalente pour former les trois dimères :  $CD3\delta\epsilon$ ,  $CD3\gamma\epsilon$ , et  $CD3\zeta\zeta$ . (Kuhns, Davis et al. 2006)(figure 3).

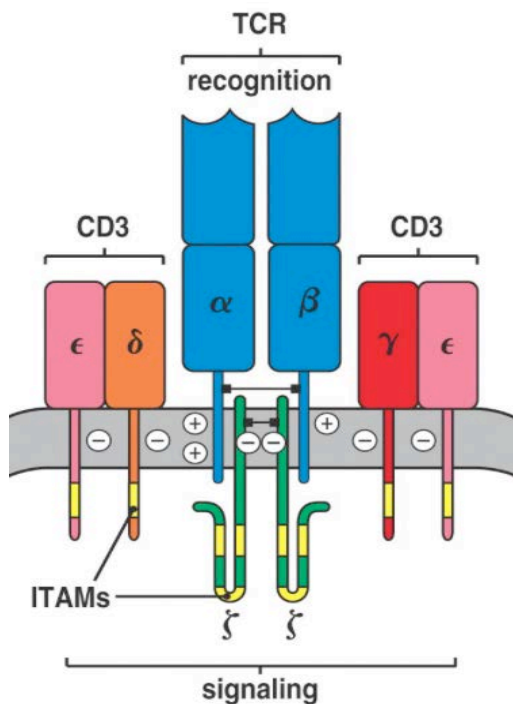


Figure 3 : organisation de complexe TCR/CD3 : le TCR est constitué de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . le TCR reconnaît les fragments peptidiques présentés par les CMH I ou II. Les informations quantitatives et qualitatives sont ensuite transmises via le CD3 portant des motifs ITAM, en cascade de signalisation intracellulaire (Kuhns, Davis et al. 2006).

## **Le complexe TCR/CD3 et la transduction du signal**

La transduction de signal au sein des cellules T commence par la reconnaissance de complexe CMH/peptide par le TCR à la surface de la cellule. Différents types de réponses peuvent être induites selon les facteurs de transcription activés par ces voies de signalisation (la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement d'une fonction cytotoxique).

La signalisation mise en place suite à l'interaction du TCR avec son ligand spécifique peut être divisée en trois phases séquentielles. Tout d'abord, l'activation et le recrutement rapide de protéines tyrosines kinases telles que le Lck et Fyn (des Src kinases) qui vont phosphoryler les tyrosines des motifs ITAM des domaines intra-cytoplasmiques des molécules CD3. La protéine tyrosine kinase ZAP-70 (Zeta-chaine associated protein kinase 70) va être recrutée par les tyrosines phosphorylées des motifs ITAM. La protéine ZAP-70 peut maintenant 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 transduction du signal. Les voies de signalisation suivantes sont mises en place : la voie de la Phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1), la voie de la Phosphokinase C $\theta$  (PKC $\theta$ ), la voie des MAPKinases et la voie de la Pi3K (Figure 4). Cela va permettre l'activation de facteurs de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), NF $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et AP-1 (Activator protein-1), induisant l'expression de certains gènes codants pour des cytokines, des chimiokines .... Figure 4.

La voie de la phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) :

Il existe deux isoformes de la PLC $\gamma$  : la PLC $\gamma$ 1 qui est l'isoforme le plus exprimé dans les lymphocytes T et la PLC $\gamma$ 2. Le recrutement de la PLC $\gamma$ 1 par le LAT lui permet d'hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PiP<sub>2</sub>), ce qui donne deux seconds messagers : l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG) (Bacchetta, Passerini et al. 2006). La signalisation va être divisée en trois voies distinctes :

**La voie calcique**, où l'IP<sub>3</sub> se fixe sur ces récepteurs à la surface du réticulum endoplasmique permettant le largage du calcium des stocks réticulaires dans le cytoplasme ce qui a pour conséquence l'ouverture des canaux calciques CRAC (Calcium Released Activated Calcium channel) au niveau de la membrane cytoplasmique et donc l'entrée de calcium du milieu extracellulaire permettant ainsi d'assurer une concentration élevée continue. Le calcium va se fixer sur la calmoduline, ce qui active la calcineurine. La calcineurine est une phosphatase qui



assure la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT, ce qui permet sa translocation nucléaire. Le NFAT induit l'expression de multiples gènes dont celui de l'IL-2 (Crispín José 2009 Autoimmune review) qui est essentielle dans l'induction de la réaction de rejet d'allogreffe, et qui est la cible thérapeutique des anti-calceineurines utilisés dans la prophylaxie du rejet allogénique (LEWIS 2001, FIRST 2004).

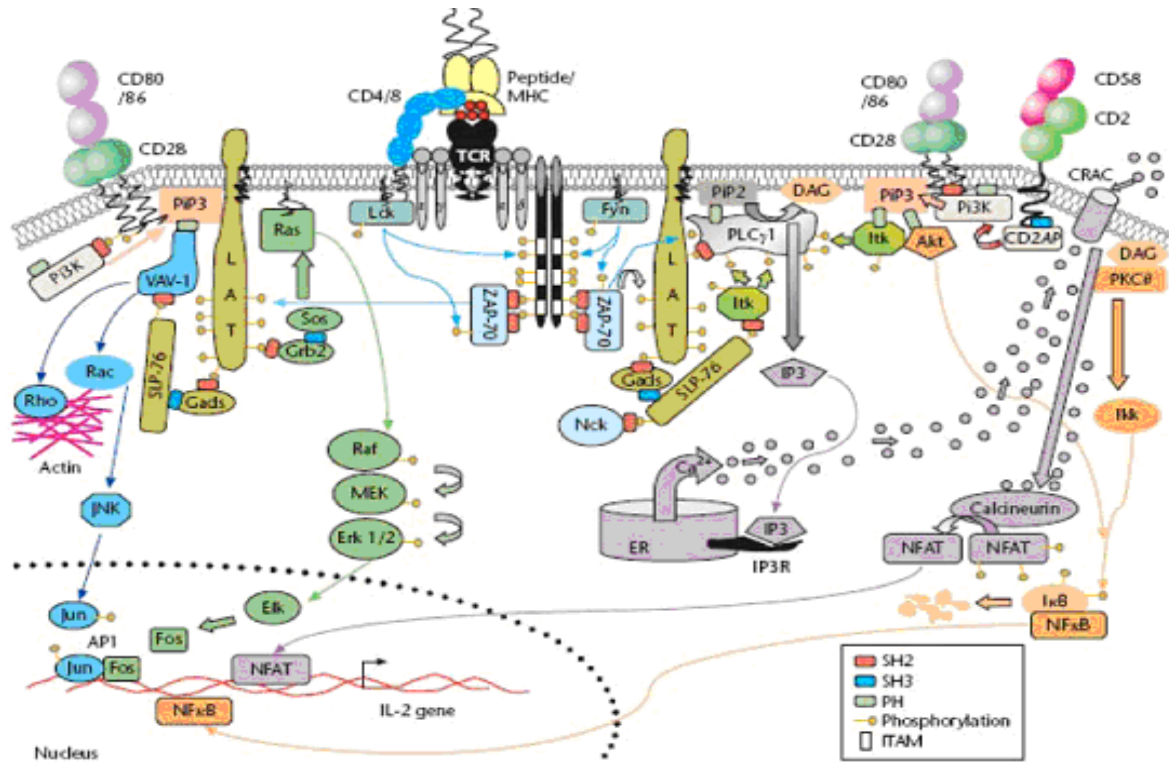


Figure 4 : Voies de transduction du signal dans les lymphocytes T après le TCR: Il existe quatre principales voies, chacune identifiée par une couleur différente : la voie JNK/Jun en bleu, la voie des MAPK en vert, la voie de la PKC $\theta$  en orange, et la voie Ca<sup>2+</sup>/calcineurine en violet. Les protéines adaptatrices sont en marron. Toutes ces voies de signalisation aboutissent vers le noyau de la cellule T où des facteurs de transcription vont pouvoir induire l'expression de certains gènes (exemple : l'IL-2).

**La voie de la PKC $\theta$**  initiée par le DAG en phosphorylant la PKC $\theta$ . La finalité de cette voie est la libération de NF $\kappa$ B qui est transloqué dans le noyau pour activer la transcription des cytokines (figures 4).

**La voie des MAPK** (Mitogen Activated Protein Kinase) où le DAG active RasGRP, Ras GRP active Ras, qui active une cascade de kinases qui engage Raf (ou MAPKKK), puis MEK (ou le MAPKK), puis Erk (Extracellular signal related kinase, ou MAPK) qui seront transloquées dans le noyau et activeront différents facteurs de transcription (Ebinu, Stang et al. 2000) (figure 4).

L'activation de toutes ces voies de signalisation permettra l'orientation de la différenciation des lymphocytes T vers des fonctions effectrices différentes.

## **Les fonctions effectrices des lymphocytes T**

### **Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont essentiels pour les défenses contre les pathogènes intracellulaires, comprenant virus, bactéries et parasites. Ils reconnaissent des peptides antigéniques présentés par des molécules du CMH de type I. Presque toutes les cellules nucléées expriment des molécules CMH du type I, si la cellule est infectée, ces molécules présentent les antigènes étrangers aux cellules CD8<sup>+</sup>. Les cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène vont être activées et différenciées en lymphocytes T cytotoxiques (CTL : Cytotoxic T Lymphocytes) en présence d'IL-2 produite par les cellules CD4<sup>+</sup> (Bevan 2004). Il a été montré *in vivo* que les CTL spécifiques des antigènes de tumeurs solides sont capables d'éliminer les cellules cancéreuses en infiltrant ces tumeurs (Boissonnas, Fetler et al. 2007). Plusieurs mécanismes cytotoxiques sont utilisés par les CTL. Ils secrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  qui causent la mort des cellules cibles. La sécrétion de l'IFN- $\gamma$  par les CTL est très importante dans le cadre de la réponse immunitaire anti-tumorale car cette cytokine joue un rôle anti-angiogénique ainsi que cytotatique sur la prolifération des cellules tumorales (Dunn, Koebel et al. 2006). Un deuxième mécanisme utilisé par les CTL est la sécrétion de perforine/granzyme (Afonina, Cullen et al. 2010). La perforine induit la mort des cellules cibles en créant des pores dans leurs membranes cellulaires (Bolitho, Voskoboinik et al. 2007) ce qui permet l'entrée des granzymes A et B qui induisent la mort cellulaire par apoptose (Afonina, Cullen et al. 2010). Le mécanisme d'apoptose induit par le granzyme A est indépendant des caspases, alors que celui utilisé par le granzyme B est dépendant des caspases (Rousalova and Krepela 2010). Un autre mécanisme utilisé par les CTL pour induire leur cytotoxicité est la voie Fas/Fas-Ligand (Fas-L) (Ostergaard, Kane et al. 1987). A l'état basal, Fas-L est très peu exprimé à la surface des CTL, mais son expression augmente quelques heures après stimulation du TCR. Fas-L se lie à son récepteur Fas (récepteur de mort appartenant à la superfamille des récepteurs de TNF) sur la cellule cible et induit l'activation de la caspase 8 et la mort de la cellule cible par apoptose (Scaffidi, Fulda et al. 1998).

## Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> forment une population hétérogène et jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires adaptatives. Ils sont appelés auxiliaires ou *Helpers* (Th) car ils aident au développement des réponses cellulaires impliquant les CTL, et aux réponses humorales impliquant des lymphocytes B.

Deux sous-populations de Th ont été mises en évidence en 1972, les Th1 et Th2 (Parish and Liew 1972). Puis en 1986, Mosmann a montré que leur hétérogénéité fonctionnelle est liée au profil de sécrétion de cytokines qui les caractérisent (Mosmann, Cherwinski et al. 1986).

Le lignage Th1 est impliqué dans la réponse adaptative contre les pathogènes intra- cellulaires (virus, bactéries), le profil de cytokines sécrétées est pro-inflammatoire: IL-2, interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Tumor Necrosis Factor type  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), lymphotoxine ou TNF- $\beta$ . Les Th1 agissent sur les cellules présentatrices d'antigène en augmentant leur capacité de présentation d'antigène, d'activation des lymphocytes naïfs, de phagocytose, et la production de médiateurs pro-inflammatoires. Les Th1 sont impliqués dans certaines maladies auto-immunes, inflammatoires chroniques, comme la maladie de Crohn ou l'athérosclérose (Murphy and Reiner 2002).

Les lymphocytes Th2 sont impliqués dans les réponses immunitaires extracellulaires (parasitoses) avec un profil de sécrétion cytokinique qui inclut : l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10, et l'IL-13. Ils sont aussi impliqués dans les réponses allergiques (Romagnani 2000). Ils activent les éosinophiles via l'IL-5 et l'IL-13 et jouent un rôle dans la différenciation des lymphocytes B. La sécrétion d'IL-10, d'IL-4, et d'IL-13 confie aux cellules de type Th2 un rôle inhibiteur des réponses pro-inflammatoires. Les Th1 et les Th2 vont, par la sécrétion de cytokines différentes, s'inhiber mutuellement, favorisant ainsi leur propre développement (O'Garra 1998). Après la phase de développement intra-thymique, les lymphocytes Th0 rejoignent les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques), où ils peuvent interagir avec des CPA comme des cellules dendritiques (DC : *Dendritic Cell*) présentatrices d'antigène. Ces Th0 produisent à la fois les cytokines Th1 et Th2 après stimulation. La reconnaissance du peptide antigénique présenté par le CMH de classe II des DC, permet alors au lymphocyte T CD4<sup>+</sup> de s'activer, de proliférer et d'acquérir ses fonctions effectrices.

Les facteurs environnementaux de type cytokines déterminent la différenciation en lymphocytes Th1 ou Th2. Par exemple, la différenciation en Th1 dépend de l'IFN- $\alpha$  sécrété

par les cellules NK (*Natural Killer*), et de l'IL-12 sécrétée par des DC en réponse à certains virus ou à une infection parasitaire. De plus, l'IL-12 inhibe l'expression du facteur de transcription Gata-3, le régulateur clé du développement Th2. Quant à l'IFN- $\gamma$ , il active, via STAT1 (*Signal Transduction And Transcription*), le facteur de transcription T-bet requis pour la polarisation Th1. L'IL-4, permet l'orientation vers un phénotype Th2. La source principale d'IL-4 semble être le lymphocyte T CD4+ lui-même, mais elle peut être également produite par d'autres cellules telles que les mastocytes, les basophiles et les cellules NKT (*Natural Killer T*). La signalisation induite par l'IL-4 permet, via STAT6, la transcription du facteur de transcription clé de la polarisation Th2 : Gata-3 (Zhu, Guo et al. 2001).

Des études ont montré l'existence d'une nouvelle sous-population de lymphocytes TCD4+ «helper», les lymphocytes Th17, qui produisent l'IL-17 (Dong 2006). Les cellules Th17 seraient un lignage à part entière et pas une variante des lignées Th1 ou Th2. En effet, l'absence d'IL-4 ou d'IFN- $\gamma$ , et des facteurs de transcription STAT-1 et STAT-6, donne lieu à la différenciation de précurseurs naïfs en lymphocytes Th17 (Harrington, Hatton et al. 2005, Park, Li et al. 2005). La combinaison entre l'IL-6 et le TGF- $\beta$  semble être cruciale pour le développement d'une réponse Th17 (Bettelli, Carrier et al. 2006, Mangan, Harrington et al. 2006). L'IL-23, cytokine qui appartient à la famille d'IL-12, est importante pour le maintien de la réponse Th17 chez la souris mais pas pour l'induction de ces cellules (Dong 2006). La découverte du facteur de transcription ROR $\gamma$ t qui peut être induit par l'IL-6 et le TGF- $\beta$ , et qui est spécifique des Th17, a permis de confirmer l'identité cellulaire de cette population (Ivanov, McKenzie et al. 2006). Chez l'homme, le rôle du TGF- $\beta$  dans le développement des Th17 est controversé, il semble que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 pourraient jouer un rôle dans la différenciation en lymphocyte Th17 (Cosmi, De Palma et al. 2008, Annunziato and Romagnani 2009). Les lymphocytes Th17 jouent un rôle dans la protection de l'hôte contre les pathogènes, dans le développement des manifestations auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose multiple (Ivanov, McKenzie et al. 2006). Ils semblent être responsables aussi de maladies inflammatoires chroniques (Romagnani 2000, Annunziato and Romagnani 2009). La différenciation des précurseurs T CD4+ se base sur la balance entre l'IL-6 et l'acide rétinoïque en présence de TGF- $\beta$  présents dans le microenvironnement, les Th17 et Treg-induites ont besoin de TGF- $\beta$  pour leur développement, le TGF- $\beta$  et l'acide rétinoïque seraient responsables

de l'induction de lymphocytes T régulateurs Foxp3<sup>+</sup> (iTreg), en revanche la présence d'IL-6 serait plutôt favorable à l'induction de la lignée Th17.

En situation physiologique, le TGF- $\beta$  prépondérant, favoriserait la génération de Treg afin d'assurer la tolérance périphérique au soi. Par contre, dans une situation physiopathologique et inflammatoire, l'IL-6 produite par les cellules de l'immunité innée favoriserait plutôt le développement d'effecteurs afin d'assurer une réponse immune optimale (Bettelli, Carrier et al. 2006).

Les cellules T régulatrices induites ainsi que les cellules Th17 ne sont pas au stade terminal de leur différenciation, mais elles ont la possibilité de se transformer en différentes sous-populations de cellules T CD4<sup>+</sup> en fonction de l'environnement cytokinique. Par exemple, les cellules T régulatrices traitées par de l'IL-6 peuvent exprimer de l'IL-17 et réguler à la baisse l'expression de Foxp3 (Xu, Kitani et al. 2007). Les cellules Th17 déjà développées peuvent se transformer en cellules Th1 productrices de l'IFN- $\gamma$  ou en cellules Th2 productrices de l'IL-4 lorsqu'elles sont stimulées par l'IL-12 ou l'IL-4, respectivement (Lee, Turner et al. 2009, Tournadre, Porcherot et al. 2009, Yi, Chen et al. 2009) ou en cellules iTreg Foxp3<sup>+</sup> quand elles sont mise en cultures avec des MDSC (Myeloid Derived Supressor Cells) *in vitro* via un mécanisme dépendant de l'acide rétinoïque (Hoechst, Gamrekelashvili et al. 2011).

Ces travaux sur les cellules CD4<sup>+</sup> montrent que ces cellules sont hétérogènes, et selon le type de pathogène et son interaction avec la CPA, le même lymphocyte T semble être capable de modifier la répartition de ces protéines de signalisation et d'évoluer vers un lignage T helper (Th1, Th2, ou Th17) ou T régulateur plus adapté au type de réponse immunitaire nécessaire (Chang, Palanivel et al. 2007).

## **Les lymphocytes T régulateurs**

Le système immunitaire a pour mission de protéger le corps contre les pathogènes, mais il doit permettre de discriminer le soi du non soi, et d'empêcher le développement de réponses auto-immunes.

Le travail de Nishizuka et al. est un des premiers suggérant la présence de mécanismes d'induction de tolérance du soi. Il montre que la thymectomie néonatale réalisée trois jours après la naissance chez la souris donne des anomalies ovariennes auto-immunes qui sont prévenues par la greffe d'un thymus de souris histocompatible (Nishizuka and Sakakura 1969). Les travaux de Tagushi et Nishizuka publiés en 1981 ont montré l'existence d'une sous-population de cellules T suppressives qui pourraient contrôler en périphérie le compartiment lymphocytaire autospécifique. Ils ont montré que le transfert de splénocytes aux souris thymectomisées induit une réversion des anomalies ovariennes (Taguchi and Nishizuka 1981).

Les différentes sous-populations T régulatrices :

Les cellules régulatrices possèdent une activité immunosuppressive, elles sont capables d'inhiber la réponse T auxiliaire et T cytotoxique, et possèdent un profil de cytokines différent de celui des Th1 et Th2.

Les cellules régulatrices sont classées en deux groupes : les lymphocytes T « naturels » et « induits ».

### **Les lymphocytes T régulateurs naturels (Treg)**

Les Treg sont des cellules T CD4<sup>+</sup> sélectionnées dans le thymus qui deviennent des cellules T régulatrices. Les Treg sont spécifiques des antigènes du soi et expriment la molécule CD25 (la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2) et le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3) à des niveaux très élevés mais le niveau d'expression du CD127 est faible. Le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>dim</sup>Foxp3<sup>+</sup> semble aussi être caractérisé par l'expression de CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen), GITR (Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor), CD45RO, CD62 ligand, CD103, CD152, et de la neurophiline.

## Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg)

Les iTreg sont le résultat de l'activation d'une cellule T mature en l'absence d'une exposition à un antigène ou en présence de certaines cytokines inhibitrices. Parmi ces cellules, on trouve les Treg de type 1 (Tr1) et les Th3 (Figure 5).

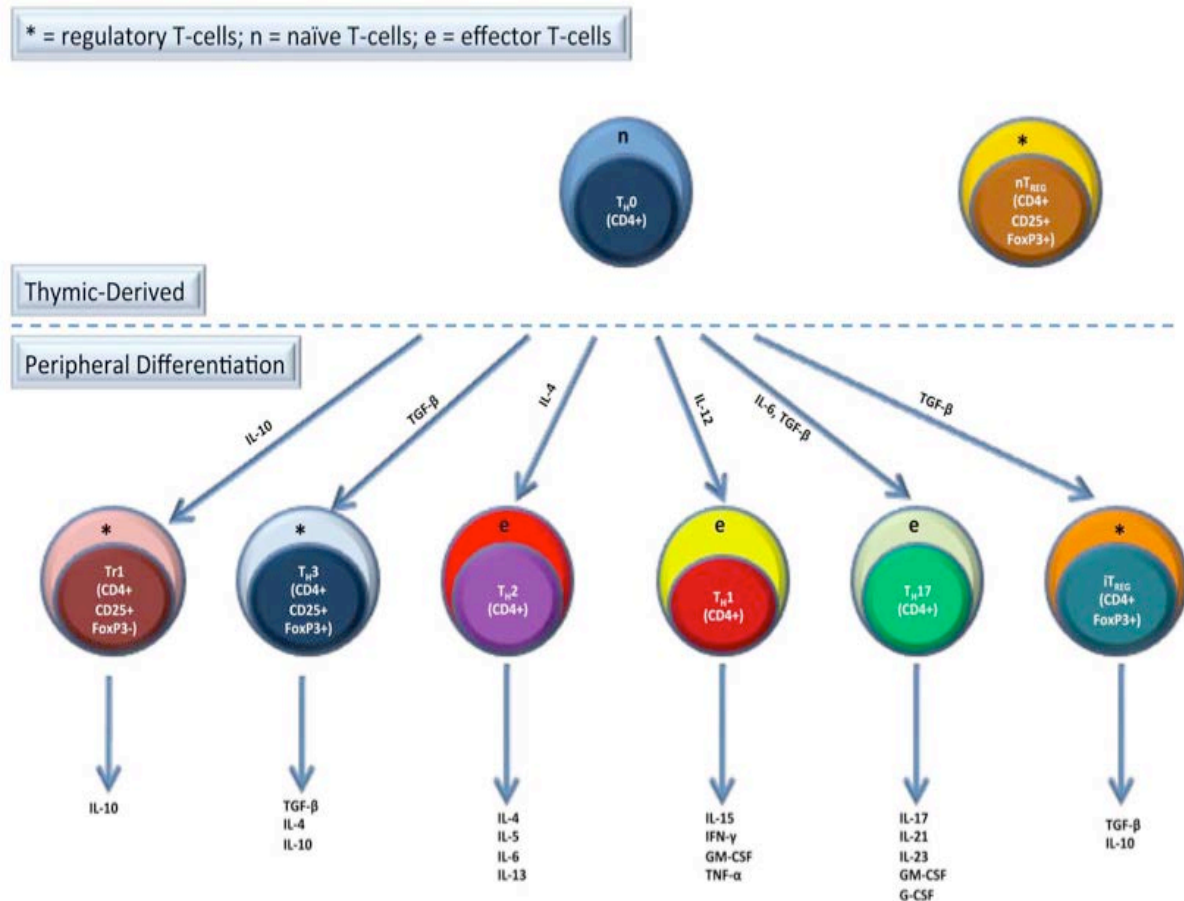


Figure 5 : Les origines des sous-populations régulatrices : les cellules T régulatrices sont : naturelles (Treg) ou induites comme les Tr1 (CD4+CD25+Foxp3-) ou les Th3 (CD4+CD25+Foxp3+). Ces cellules ont besoin de différentes cytokines pour leur différenciation (IL10 pour les Tr1, TGFβ pour les Th3) (Peterson 2012).

### Les cellules Tr1

Les cellules Tr1 ont un profil cytokinique caractérisé par la sécrétion de grandes quantités d'IL10, moins d'IL4 et d'IL17 (deux cytokines caractéristiques des réponses Th2 et Th17 respectivement), peu d'IL2, d'IL5 et des quantités variable d'IFNγ (Roncarolo, Gregori et al. 2006, Fujio, Okamura et al. 2010, Peterson 2012). L'expression de Foxp3 est faible et transitoire après activation des Tr1 (Roncarolo, Gregori et al. 2011). L'IL15 est le facteur de

prolifération principal pour les Tr1 (Roncarolo, Gregori et al. 2006, Fujio, Okamura et al. 2010). Les Tr1 expriment des marqueurs de type Th1 et Th2, comme le CXCR3, CCR5, CCR4, CCR3 et le CCR8. Des études ont suggéré que l'expression concomitante de CD49b et CD18 (intégrine  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  respectivement) permet de caractériser ces cellules (Charbonnier, van Duivenvoorde et al. 2006, Rahmoun, Foussat et al. 2006). Les cellules CD4 naïves peuvent devenir des Tr1 en présence de certaines drogues immunosuppressives ou d'une stimulation chronique par des antigènes infectieux, allergiques ou tumoraux (Groux 2003).

La stimulation des cellules Tr1 via leur TCR induit la sécrétion 1) d'IL10 (Groux, O'Garra et al. 1997) qui permettra l'inhibition des réponses Th1 et Th2 ainsi que des réponses mémoires, 2) de granzyme B qui tue les CPA myéloïdes (Magnani, Alberigo et al. 2011). Le rôle de l'IL10 dans l'immunosuppression peut être expliqué par des mécanismes directs et indirects : l'IL10 inhibe l'expression des molécules CMH type II, des molécules de co-stimulation, et d'adhésion, ainsi que la production de cytokines inflammatoires et la capacité stimulatrice des cellules présentatrices d'antigène (CPA); l'IL10 inhibe aussi la capacité des cellules T à produire certaines cytokines et à proliférer (Grutz 2005).

Les cellules Tr1 ne semblent pas proliférer *in vitro* ; ceci est peut être lié à l'effet autocrine de l'IL10 (Roncarolo, Gregori et al. 2006, Fujio, Okamura et al. 2010). La stimulation des Tr1 est spécifique de l'antigène, mais leur effet supresseur affecte toutes les cellules à proximité puisqu'elle est dépendante de la sécrétion de cytokines.

Comparativement aux Treg, qui semblent représenter la population régulatrice majoritaire, les Tr1 sont moins bien caractérisés. Ceci dépend probablement de leur découverte plus récente et de l'impossibilité de les d'isoler *ex-vivo*. Les études se basent sur la production d'IL10 pour valider un phénotype de Tr1 d'une cellule T CD4<sup>+</sup>. Récemment il a été montré que la co-expression de CD49b et le LAG3 (Lymphocyte activation Gene) représenterait un marquage spécifique des cellules Tr1 (Gagliani, Magnani et al. 2013).

### **Les cellules Th3**

Les Th3 sont générées à partir des cellules CD4<sup>+</sup> naïves en présence de TGF- $\beta$  (Figure 5) et jouent un rôle dans les mécanismes de tolérance orale (Wan and Flavell 2007) (Wan and Flavell 2007). Elles sont capables d'inhiber les réponses Th1 et Th2 (Weiner 2001). Elles secrètent du TGF- $\beta$ , de l'IL-10 (Beissert, Schwarz et al. 2006) et expriment Foxp3 (Korn, Bettelli et al. 2009). 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, Yuan et al. 2007).

# LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS NATURELS

## La caractérisation

### Le Phénotype des cellules Treg

C'est en 1995 que le marqueur de surface CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2) a été proposé comme un marqueur des Treg (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995), cependant les lymphocytes T conventionnels activés l'expriment aussi. Les arguments en faveur de CD25 comme marqueur des Treg étaient que les cellules T conventionnelles activées expriment CD25 à un niveau moins important que les cellules Treg que l'on appelle Treg CD25<sup>high</sup> (Kuniyasu, Takahashi et al. 2000). D'autre part, l'expression du CD25 par les cellules T conventionnelles est transitoire, elles l'expriment seulement lorsqu'elles sont activées, alors qu'elle est stable et constitutive pour les Treg (Fisson, Darrasse-Jèze et al. 2003). En 1998, la capacité suppressive de ces cellules était montrée *in vitro* (Thornton and Shevach 1998), des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en co-culture avec des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en présence d'anti-CD3, inhibaient la prolifération de ces cellules T conventionnelles CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et leur capacité à produire de l'IL-2 ; depuis, cette expérience est devenu le modèle classique pour évaluer la capacité suppressive des cellules Treg (J'utiliserai le terme Treg pour parler des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>).

Après CD25, d'autres marqueurs de Treg ont été mis en évidence ; CTLA-4 qui est exprimé de manière constitutive sur les Treg et qui participe à leur fonction suppressive *in vivo et in vitro* (Read, Malmström et al. 2000, Takahashi, Tagami et al. 2000), GITR aussi est une protéine membranaire qui est exprimée par les Treg (Shimizu, Yamazaki et al. 2002), d'autres molécules comme l'ICOS (Burmeister, Lischke et al. 2008), LAG-3 (Huang, Workman et al. 2004), CD39 (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007), sont aussi exprimées par les Treg. Mais encore aujourd'hui, il n'y a pas de marqueur spécifique; en effet, CD25, GITR, CTLA-4 sont également exprimés par les cellules T conventionnelles (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) activées (tableau 1).

**Tableau 1 : Phénotype des cellules Treg.**

<b>Marqueur (niveau d'expression)</b>	<b>Commentaire</b>	<b>Reference</b>
<b>CD25 (+++)</b>	<b>Cf texte</b>	<b>(Sakaguchi, Miyara et al. 2010)</b>
<b>CD127 (-/bas)</b>	<b>Les cellules Treg expriment peu ou pas le CD127</b>	<b>(Cozzo, Larkin et al. 2003)</b>
<b>Foxp3 (+++)</b>	<b>Cf texte</b>	<b>(Hori, Nomura et al. 2003)</b>
<b>CTLA4 (+++)</b>	<b>Important pour leur fonction</b>	<b>(Read, Malmström et al. 2000)</b>
<b>GITR (+++)</b>	<b>Exprimé de manière constitutive</b>	<b>(Shevach 2006)</b>
<b>ICOS (+++)</b>	<b>Le niveau d'expression permet de définir des sous-population les plus suppressives</b>	<b>(Burmeister, Lischke et al. 2008)</b>
<b>LAG-3 (+++)</b>	<b>Expression après activation</b>	<b>(Huang, Workman et al. 2004)</b>
<b>CD39 (++)</b>	<b>Participe à leur fonction suppressive</b>	<b>(Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007)</b>
<b>TNFR2 (++)</b>	<b>30-40% des Treg</b>	<b>(Chen, Subleski et al. 2010)</b>
<b>CD103 (+)</b>	<b>Treg eff/mém, Treg de peau et des muqueuses</b>	<b>(Lehmann, Huehn et al. 2002)</b>

### **Foxp3 : marqueur des Treg ?**

La recherche d'un marqueur spécifique des cellules Treg a fait une avancée très importante avec la découverte en 2001 du gène de Foxp3, et des fonctions liée à ce facteur de

transcription impliqué dans le développement et la fonction des Treg. La mutation du gène codant pour le facteur de transcription Foxp3 situé sur le chromosome X entraîne chez l'homme le syndrome IPEX (Immunodysregulation polyendocrinopathy X-linked syndrome) (Bennett, Christie et al. 2001), et chez la souris une atteinte auto-immune létale (souris Scurfy : modèle animal d'IPEX) (Brunkow, Jeffery et al. 2001). Les souris *scurfy* mâles sont atteintes de pathologies auto-immunes multi-organes létaux (Brunkow, Jeffery et al. 2001) mais les femelles hétérozygotes ne développent pas ces symptômes. Contrairement au modèle murin, les patients présentant le syndrome IPEX ont un taux de lymphocytes T CD4+CD25<sup>high</sup> identique aux donneurs sains. Les tests fonctionnels *in vitro* montrent que les Treg CD4+CD25<sup>high</sup> des patients IPEX (Foxp3-) présentent une diminution de leur potentiel suppresseur (Bacchetta, Passerini et al. 2006). En 2003 Hori et al. ont montré que l'expression de Foxp3 est spécifique des cellules CD4+CD25+ chez la souris, et que la transfection par le gène Foxp3 confère aux cellules T CD4+CD25- des propriétés régulatrices (Hori, Nomura et al. 2003).

Foxp3 permet d'identifier les Treg mais il est intracellulaire et donc l'isolement des cellules Treg Foxp3+ vivantes, et l'étude fonctionnelle de ces cellules n'est pas possible. Les caractéristiques des Treg sont partiellement dépendantes de Foxp3 (Fontenot and Rudensky 2005) et Foxp3 participe aux fonctions et à l'homéostasie des Treg sans être le seul facteur responsable (Gavin, Rasmussen et al. 2007, Lin, Haribhai et al. 2007, Wan and Flavell 2007). Mais Foxp3 n'est pas spécifique des Treg et peut augmenter de façon transitoire sur les lymphocytes T effecteurs activés, avec un niveau d'expression inférieur que sur les Treg (Gavin, Torgerson et al. 2006). La déplétion de Foxp3 dans ces cellules effectrices ne change pas leur caractéristique ni leur phénotype (Hsieh, Zheng et al. 2006), comme c'est le cas pour les Treg. Ceci soutient la spécificité de Foxp3 dans les Treg malgré la mise en évidence de son expression dans d'autres cellules du système immunitaire : les lymphocytes T activés (expression transitoire) (Miyara, Amoura et al. 2009), les cellules iNKT (Monteiro, Almeida et al. 2010).

### **La différenciation des Treg**

Les cellules Treg naturelles (Treg) se développent dans le thymus, alors que les Treg induits (iTreg) se développent en périphérie à partir des cellules T CD4+ naïves.

L'équipe de Shimon Sakaguchi en 1996 a évalué le développement intra-thymique des Treg, elle a montré que les souris thyméctomisées à J3 vont développer un syndrome auto-immun en raison de l'absence de Treg, et que des Treg apparaissent en périphérie dès J4 (Asano, Toda et al. 1996). Fontenot a confirmé que les Treg sont générés et se différencient dans le thymus comme un lignage indépendant (Fontenot, Rasmussen et al. 2005). Ce processus de différenciation commence avec l'induction de l'expression de Foxp3 dans une sous-population thymocytaire procédant un TCR  $\alpha\beta$  avec une affinité accrue pour les complexes CMH/peptides du soi (Apostolou, Sarukhan et al. 2002) (Figure 6).

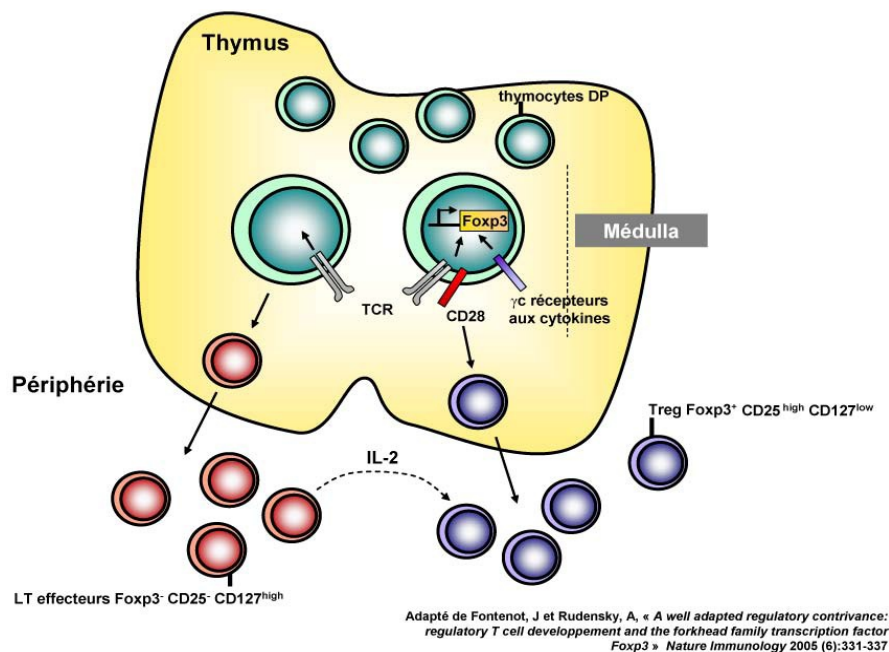


Figure 6 : Différenciation intra-thymique de Treg : La différenciation des Treg est un processus intra-thymique effectué tout au long de la vie d'un individu où de nouveaux émigrants thymiques reconstituent le pool périphérique de Treg. La spécification du lignage régulateur se produit suite à une induction de Foxp3 dans les thymocytes. L'induction de Foxp3 semble multifactorielle : 1- la haute affinité et le caractère auto-spécifique du TCR vont être un facteur important, 2- la co-stimulation via CD28 et la signalisation au travers des récepteurs aux cytokines ainsi que d'autres récepteurs inconnus à ce jour ont un rôle important dans l'induction de Foxp3. L'expression de Foxp3 dans les thymocytes est responsable de l'activation et la répression de plusieurs centaines de gènes, ce qui permettra 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 (Fontenot and Rudensky 2005).

### Le rôle du signal de TCR

Les cellules Treg possèdent une affinité accrue pour les complexes CMH/peptide du soi exprimés par les cellules mTEC du thymus. Des études ont montré que les souris déficientes pour l'expression de RAG2<sup>KO</sup> ne possèdent pas de Treg et qu'elles développent des lésions inflammatoires au niveau cérébral (Lafaille, Nagashima et al. 1994), par contre les souris possédant cette protéine ne déclenchent pas la maladie. La quantité d'antigène présente au

cours du développement thymique des Treg semble être importante. La diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II par les cellules mTEC ou de l'expression des antigènes au niveau thymique, semble favoriser le développement des Treg (Picca, Oh et al. 2009). Il a également été montré que les Treg, malgré leur résistance accrue à la délétion clonale, finissent par être éliminés lorsqu'ils sont exposés à une quantité importante d'antigène (van Santen, Benoist et al. 2004). Ces études suggèrent qu'une forte affinité pour les complexes CMH du soi et qu'une quantité limitée d'antigène, sont deux facteurs nécessaires pour le développement des Treg ainsi que pour exercer leur fonction physiologique : la tolérance périphérique au soi et la prévention du développement de manifestations auto-immunes. (Figure 7).

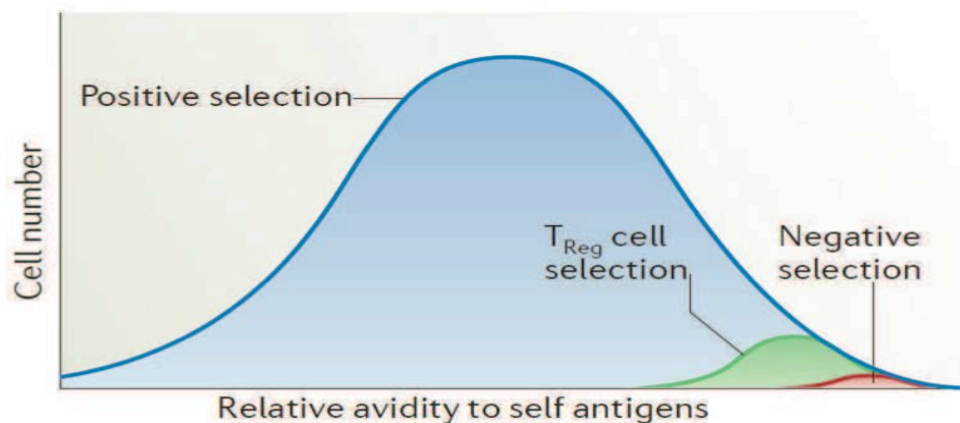


Figure 7 : L'importance du signal TCR dans la sélection des Treg : les Treg possèdent un TCR avec une avidité plus forte que celle des cellules T naïves pour les complexes CMH/peptide du soi exprimés dans le thymus mais cette avidité n'est pas assez forte pour que les Treg soient éliminés par le processus de sélection négative (Hsieh, Lee et al. 2012).

### Le rôle de la co-stimulation thymique et cytokinique

La signalisation par les récepteurs aux cytokines (chaines communes  $\gamma c$ ) ainsi que la co-stimulation via CD28 facilite l'induction de Foxp3 dans les thymocytes (Kim and Rudensky 2006). L'affinité augmentée du TCR associée à la co-stimulation par CD28, est importante pour augmenter la sensibilité des précurseurs des Treg à l'IL-2 qui représente le troisième signal nécessaire pour l'expression de Foxp3 (Lio and Hsieh 2008).

Le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*- $\beta$ ) est pléiotrope et possède un effet immunosuppresseur prononcé. C'est une cytokine importante pour le maintien en périphérie des Treg et pour la mise en place de leurs fonctions suppressives. En effet, les souris qui

n'expriment pas le récepteur de type II au TGF- $\beta$ , ont des cellules T incapables de répondre à cette cytokine et développent des pathologies auto-immunes. De plus, Le TGF- $\beta$  joue un rôle majeur dans l'homéostasie du compartiment T (Gorelik and Flavell 2000) et Marie *et al.* ont montré que la suppression de la signalisation TGF- $\beta$  dépendante dans les Treg induit une diminution du niveau d'expression de Foxp3 et de l'activité suppressive (Marie, Letterio et al. 2005). Le TGF- $\beta$  associé à une stimulation du TCR permet *in vitro* chez l'homme et la souris la conversion de lymphocytes naïfs T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> en Treg grâce à la formation de complexe Smad2-3/NFAT, qui se fixe sur le CNS1 du gène codant pour Foxp3 (Tone, Furuuchi et al. 2008, Zheng, Josefowicz et al. 2010). Le gène codant pour Foxp3 contient 4 régions importantes pour son expression : le promoteur et 3 régions non-codantes conservées, les CNS 1, 2 et 3 (Conerved Non-coding Sequences). Ces 3 CNS participent à la régulation de l'expression de Foxp3 : Les CNS2 et 3 sont impliqués dans les cellules Treg thymiques (CNS2 est relié à la stabilité de l'expression de Foxp3, CNS3 représente la région initiatrice du processus de différenciation thymique des Treg) (Zheng, Josefowicz et al. 2010), quand au CNS1, il est impliqué dans le développement des cellules iTreg (Zheng, Josefowicz et al. 2010).

La conversion de T effecteurs en Treg ou Ti-Treg (*TGF- $\beta$  induced Treg*) permet d'obtenir des cellules ayant des propriétés suppressives *in vitro et in vivo* sur modèles murins (Chen, Jin et al. 2003, Fantini, Dominitzki et al. 2007), et lors de transferts adoptifs, ces Ti-Treg persistent et assurent une fonction régulatrice à long terme (Selvaraj and Geiger 2007). Cette induction semble nécessiter la présence d'IL-2 qui est un paramètre important pour cette conversion en Ti-Treg induite par le TGF- $\beta$  (Davidson, DiPaolo et al. 2007).

## **Les mécanismes d'action des Treg**

Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les Treg. Nous pouvons les classer en quatre catégories :

- La sécrétion de cytokines immunosuppressives.
- La cytolyse.
- Les perturbations métaboliques.
- L'action sur les cellules dendritiques (DC).

## **La sécrétion de cytokines immunosuppressives**

### **-L'IL-10**

L'IL-10 est une cytokine sécrétée par plusieurs types cellulaires comme les T effecteurs, les cellules B, les DC, les Treg. Son rôle dans la suppression par les Treg est resté controversé longtemps à cause de sa non-implication dans la suppression *in vitro* de la prolifération des T effectrices (Shevach 2006). L'IL-10 produite par les Treg semble impliquée dans la prévention de maladies inflammatoires comme l'IBD (Inflammatory Bowel Disease), en effet, les Treg provenant de souris IL-10<sup>KO</sup> ne sont pas capable de prévenir cette pathologie induite par le transfert adoptif de cellules T naïves (Asseman, Mauze et al. 1999). L'IL-10 pourrait être bénéfique dans d'autres atteintes immunitaires telles que le rejet de greffe (Molitor-Dart, Andrassy et al. 2007).

### **- le TGF $\beta$**

Le TGF- $\beta$  produit par les Treg a un effet pléiotropique et joue un rôle direct et indirect dans l'immunosuppression. La déficience de TGF- $\beta$  ou de son récepteur provoque un syndrome lymphoprolifératif similaire à ce qui est induit chez les souris Foxp3<sup>null</sup> (Shull, Ormsby et al. 1992, Marie, Liggitt et al. 2006). Les Treg activés expriment le complexe LAP/TGF- $\beta$  et donc participent directement à la conversion des T conventionnels en iTreg (Anderson, Lira et al. 2008). Le TGF- $\beta$  induit et maintient l'expression de Foxp3 *in vivo et in vitro* dans les Treg et les iTreg (Li, Sanjabi et al. 2006).

### **- L'IL-35**

L'IL-35 est composée de deux sous unités : la chaîne  $\alpha$  de l'IL-12 et de la chaîne  $\beta$  de l'IL-27 (appelée Ebi3 : Epstein-Barr virus induced gene 3). Cette cytokine participe *in vivo et in vitro* aux actions suppressives des Treg (Collison, Workman et al. 2007). Il faut noter que les cellules Treg productrices d'IL-35 réagissent par contacts avec les cellules cibles, ce qui induit la production d'iTreg qui n'expriment pas Foxp3 et qui sont appelés « Tr35 ». Ces cellules Tr35 ont une action suppressive par contact direct et produisent de fortes quantités d'IL-35 qui a un effet suppresseur (Figure 8).



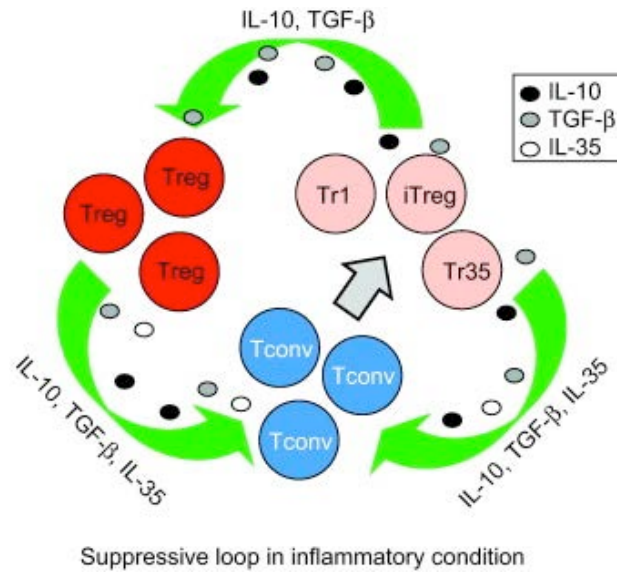


Figure 8. Boucles d'action des cytokines immunosuppressives produites par les Treg. (Yamaguchi, Wing et al. 2011).

### La cytolyse

Les Treg sont capables de produire du Granzyme B (GrzmB) qui a des effets cytolytiques. Il a été montré que la voie perforine/granzyme est directement utilisée par les Treg afin de lyser les cellules cibles (Cao, Cai et al. 2007), et que les Treg sont capables de tuer les DC qui se trouvent dans une tumeur et dans les ganglions drainants par la voie perforine/granzyme (Boissonnas, Scholer-Dahirel et al. 2010).

Les Treg expriment aussi à leur surface des molécules apoptotiques comme :

1) la galactine-1 (Gal-1) qui, lorsqu'elle se fixe à ses ligands CD7, CD43 et CD45, induit l'apoptose des cellules cibles (Garin, Chu et al. 2007).

2) la TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand) qui se lie au DR5 (Death Receptor 5) et induit l'apoptose des cellules cibles (Ren, Ye et al. 2007).

3) le Fas-Ligand (CD95L), qui est une protéine de la famille TNF, et qui induit l'apoptose en se liant à son récepteur (Strauss, Bergmann et al. 2009).

### Les perturbations métaboliques

Les Treg induisent des perturbations métaboliques par plusieurs mécanismes (Figure 9) :

## La consommation d'IL-2

Les Treg expriment fortement le CD25 mais elles ne produisent pas d'IL-2 ce qui les rend dépendants de l'IL-2 environnementale produite par d'autres cellules. Pour cela, elles sont donc en compétition pour l'IL-2 avec les T effecteurs qui peuvent être détruites par apoptose (Pandiyani, Zheng et al. 2007) (Figure 9).

## Le transfert de l'AMP cyclique

Les Treg possèdent des quantités importantes de l'AMPc dans leur cytoplasme et sont capables de le transférer aux cellules T conventionnelles par les jonctions GAP. L'AMPc dans le cytoplasme des T conventionnels induit une accumulation d'ICER (Inducible cAMP Early Repressor) dans le noyau, ce qui a pour conséquence une diminution de production d'IL-2 et une prolifération réduite de ces dernières (Bopp, Becker et al. 2007) (Figure 9).

## Les CD39 et CD73

L'adénosine peut se fixer sur le récepteur A<sub>2A</sub> exprimé à la surface des cellules T conventionnelles et inhibent leur activation et prolifération *in vivo et in vitro*. Le CD39 et CD73 sont deux ecto-enzyme exprimées préférentiellement à la surface des Treg, le CD39 transforme l'ATP en AMP, et le CD73 transforme l'AMP en adénosine qui va se fixer sur son récepteur A<sub>2A</sub> inhibant ainsi l'activation et la prolifération des cellules T conventionnelles (Deaglio, Dwyer et al. 2007) (Figure 9).

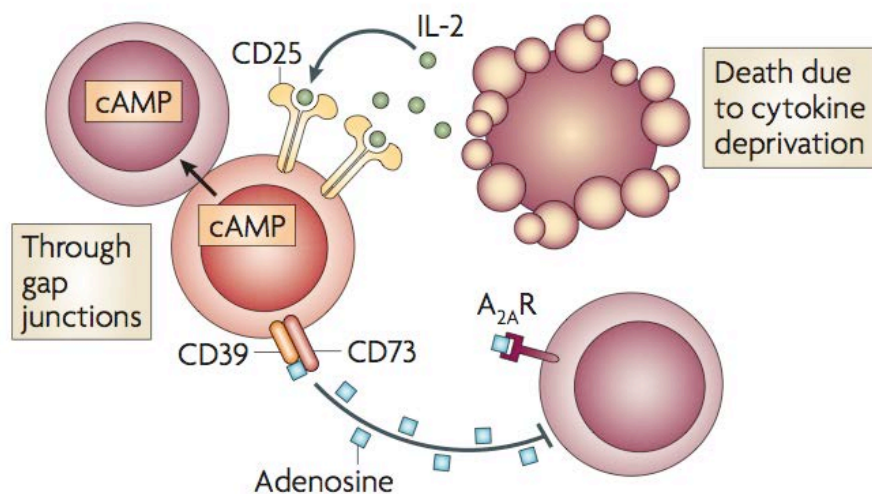


Figure 9 : Les perturbations métaboliques provoquées par les Treg sur leurs cibles : les Treg sont capables de perturber leurs cellules cibles via : la consommation de l'IL-2 disponible dans le milieu, le

transfert de l'AMPc dans le cytoplasme de leur cible ou en catalysant l'ATP en adénosine. Tout cela aboutit à une diminution de l'activation et de la prolifération des cellules cibles (Vignali, Collison et al. 2008).

### **La modulation des cellules dendritiques**

Les DC sont essentielles pour développer une réponse immunitaire efficace. Les Treg en réagissant avec les DC inhibent indirectement la réponse immunitaire. Ceci est effectué par plusieurs mécanismes :

- Le CTLA-4 qui est fortement exprimé par les Treg, se lie aux CD80/CD86 et transmet un signal inhibiteur contrairement au CD28 (Wing, Onishi et al. 2008).
- LAG-3 est un homologue de CD4 qui se lie comme le CD4 à la molécule du CMH de classe II avec une affinité plus importante, ce qui augmente le temps d'interaction entre les Treg et les DC, et diminue la maturation des DC et leur capacité à la présentation antigénique (Liang, Workman et al. 2008).
- la Neuropilin-1 (Nrp-1) exprimée à la surface des Treg, comme LAG-3 semble prolonger le temps d'interaction avec les DC en se liant au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et aux sémaphorines de classe 3 (Sarris, Andersen et al. 2008).

La Figure 10 présente plusieurs mécanismes d'action des Treg. Certains mécanismes peuvent être dépendants du type de cible cellulaire régulée ainsi que de l'environnement dans lequel l'action est exercée et surtout de la fonction de la cellule régulée (Figure 10).

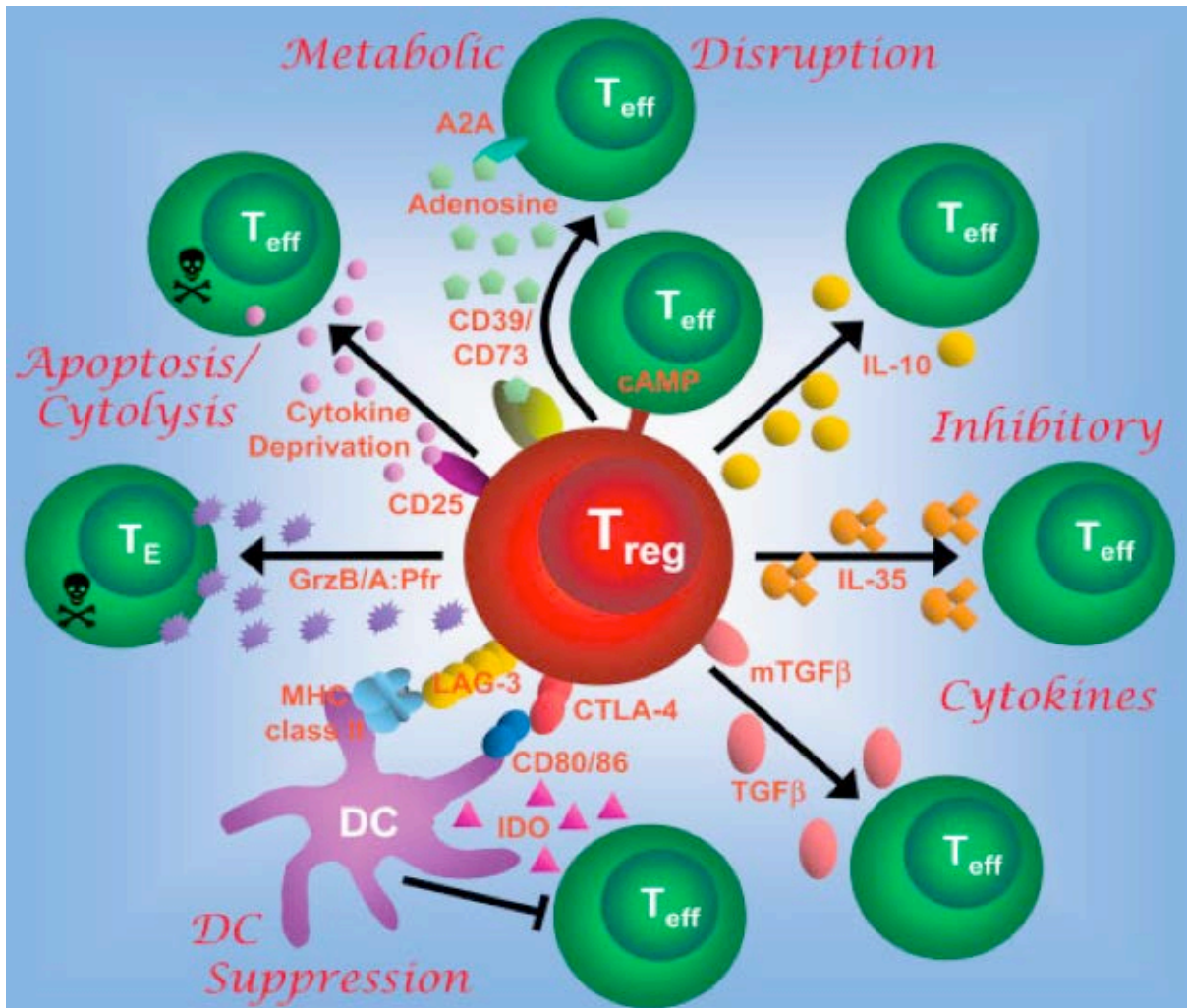


Figure 10. Les différents mécanismes d'action des cellules Treg. Les Treg exercent leur fonction suppressive via plusieurs mécanismes : sécrétion des cytokines suppressives, cytolysse, perturbations métaboliques et inhibition des DC. (Vignali, Collison et al. 2008).

## LES FONCTIONS DES CELLULES T REGULATRICES

Les Treg jouent un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme par leur capacité de maintenir une tolérance périphérique au soi. Il existe d'autres situations physiologiques ou pathologiques dans lesquelles les Treg vont intervenir, en particulier les Treg vont jouer un rôle positif dans la tolérance fœto-maternelle, la tolérance d'allogreffe, le contrôle des maladies auto-immunes, la modulation des réponses anti-infectieuses ou un rôle négatif dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

### Les Treg et la tolérance fœto-maternelle

La grossesse pourrait être considérée du point de vu immunologique comme une greffe semi-allogénique. Le système immunitaire de la mère doit s'adapter à la présence de non soi

pendant toute la période de la gestation du fœtus. Ces antigènes du non soi correspondent en réalité aux antigènes paternels (Tafari, Alferink et al. 1995). Différents mécanismes sont impliqués pour inhiber les agressions du système immunitaire maternel contre les allo-antigènes du fœtus. Tout d'abord, il y a la barrière physique placentaire qui constitue une interface sélective entre le fœtus et la mère. Sur cette barrière, on peut trouver les molécules HLA-G (molécule de CMH de classe 1 non classique) qui inhibent l'activation des cellules NK. On trouve aussi les molécules de FasL exprimées par les cellules trophoblastiques, et qui induisent l'apoptose des lymphocytes T maternels allo-spécifiques (Aluvihare, Kallikourdis et al. 2004). Mais ces mécanismes restent locaux et ne permettent pas d'expliquer la tolérance systémique aux allo-antigènes paternels.

Le rôle des Treg dans ce processus de tolérance fœto-maternelle a été souligné grâce à plusieurs observations. Le travail d'Aluvihare et al en 2004 a montré que lorsqu'une souris femelle (déficiente en lymphocytes T) est reconstituée avec des cellules T dépourvues de Treg, et est accouplée avec un mâle allogénique, il y a une résorption des embryons à mi-gestation. Cette observation ne se reproduit pas lorsque la femelle est accouplée avec un mâle syngénique (Aluvihare, Kallikourdis et al. 2004). Il a été noté aussi une expansion forte des Treg chez ces souris lors de la gestation (Aluvihare, Kallikourdis et al. 2004), le même résultat est observé chez la femme pendant la grossesse (Dimova, Nagaeva et al. 2011). *In vitro* aussi, il a été montré que des doses physiologiques d'E2 (17- $\beta$ -oestradiol) pourraient induire une conversion des cellules CD4+CD25<sup>-</sup> en CD4+CD25<sup>+</sup> fonctionnelles qui expriment Foxp3 et l'IL-10 (Tai, Wang et al. 2008).

La présence précoce d'antigènes fœto-paternels au cours de la grossesse permettrait la génération de Treg (Zhao, Zeng et al. 2007) et leur relargage continu dans la circulation sanguine maternelle (Zenclussen, Thuere et al. 2010). Au contraire, la diminution du nombre des Treg ou la présence d'un défaut de leur activité conduit à l'infertilité, à des pré-éclampsies, et à des fausses couches.

Pour conclure, toutes ces données soulignent un rôle clef des Treg dans la tolérance fœto-maternelle et dans le développement de l'embryon.

### **Les Treg et maladies auto-immunes**

L'implication des Treg dans les maladies auto-immunes a été bien définie, en effet l'absence de ces cellules chez l'homme et la souris, liée à une mutation du gène de Foxp3, entraîne un

syndrome auto-immun légal (Bennett, Christie et al. 2001, Brunkow, Jeffery et al. 2001).

Des Treg non-fonctionnels ont été retrouvés chez les patients atteints de certaines maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques (Viglietta, Baecher-Allan et al. 2004), l'arthrite rhumatoïde (Ehrenstein, Evans et al. 2004), le diabète de type 1 (Lindley, Dayan et al. 2005), la myasthénie grave auto-immune (Balandina, Lecart et al. 2005), le psoriasis (Sugiyama, Gyulai et al. 2005), et le lupus (Lyssuk, Torgashina et al. 2007). Ce défaut fonctionnel des Treg se présente 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 des 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, Tough et al. 2009). Il a également été observé une diminution du nombre de Treg au cours du lupus (Miyara, Amoura et al. 2009) et de la sclérose en plaques (Matarese, Carrieri et al. 2005). Donc la présence des Treg non-fonctionnel et/ou la diminution de leur nombre sont associées au développement des maladies auto-immunes. Cette meilleure compréhension de l'implication des Treg dans les maladies auto-immunes ouvre le champ à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### **Les Treg et l'immunité anti-infectieuse**

Les Treg jouent un rôle variable et controversé contre les agents pathogènes. En effet, ce rôle peut être délétère pour la mise en place d'une réponse anti-infectieuse, ou protecteur pour l'organisme. Les résultats obtenus sont conditionnés par deux éléments essentiels : le type de pathogène provoquant l'infection (bactérie, virus, parasite, ou champignon), et le type de l'infection, aiguë ou chronique. Les Treg sont protecteurs en cas d'infection avec l'HSV2 (Herpes Simplex Virus 2), et le LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus). Dans le cas de l'HSV2, la déplétion des Treg avant une infection vaginale chez la souris est associée à une mortalité accélérée, à un recrutement plus tardif des cellules effectrices sur site de l'infection et des ganglions drainant avec une augmentation de la charge virale sur le site de

l'infection (Lund, Hsing et al. 2008). Quant à l'infection systémique par le virus LCMV, la déplétion des Treg entraîne une réduction des concentrations des chimiokines dans les ganglions lymphatiques et une augmentation de la charge virale (Lund, Hsing et al. 2008). Les Treg sont aussi impliqués dans l'infection de HCV puisqu'ils protègent le foie des lésions hépatiques dues à la réponse immunitaire dirigée contre le virus (expliqué plus loin dans le chapitre suivant). En cas d'infection par *Candida albicans* (champignon), le co-transfert de T effecteurs et de Treg augmente la clairance du champignon (Pandiyani, Conti et al. 2011), et dans le cas de *Plasmodium berghei* (parasite) ou l'expansion des Treg protège également d'une maladie sévère (Haque, Best et al. 2010).

Mais les Treg peuvent également jouer un rôle négatif comme dans les infections bactériennes par *Listeria Monocytogene* ou par *Salmonella Enterica*, puisque l'expansion des Treg augmente la charge pathogénique (Rowe, Ertelt et al. 2011). Un rôle négatif a été observé lors d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis*, si des Treg spécifiques sont transférés, il y a diminution de l'expansion des T effectrices associée à une augmentation de la pathogénicité (Scott-Browne, Shafiani et al. 2007).

Le rôle protecteur des Treg est plus souvent associé aux infections chroniques où la présence d'un pool de Treg important est nécessaire pour diminuer les dégâts induits par l'activation chronique des mécanismes de la réponse immunitaire. L'infection gastro-intestinale par *Helicobacter hepaticus*, qui va causer une inflammation intestinale, est un exemple bien documenté à ce jour du rôle protecteur des Treg. Le transfert de lymphocytes T CD4+ totaux chez une souris infectée par *Helicobacter hepaticus* permettra d'induire une réponse immunitaire plus faible contre le pathogène évitant le développement de la colite, en comparaison au transfert de T CD4+ isolées de souris IL10<sup>-/-</sup>. Les auteurs de ce travail montrent l'importance de la génération d'un pool de Treg antigène spécifique capable de moduler la réponse immunitaire antibactérienne via un mécanisme dépendant de l'IL-10 (Kullberg, Jankovic et al. 2002). La modulation de la réponse anti-infectieuse par les Treg peut aussi favoriser la pérennité de l'agent pathogène infectieux et participer à l'évolution vers la chronicité de la maladie. L'équipe de Belkaid *et al.* a montré que la persistance de *Leishmania major* au niveau cutané chez la souris, après résolution de la phase « aigüe » de l'infection, est due à l'action des Treg. Au cours du processus infectieux, les Treg s'accumulent au niveau du derme des souris infectées et inhibent les réponses effectrices visant à éliminer le parasite. Mais c'est également l'action suppressive des Treg qui permet,

par 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 *Leishmania 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, Piccirillo et al. 2002).

### Les Treg et l'immunité anti-tumorale

L'implication des Treg dans le cancer, et en particulier dans l'échappement tumoral a été évaluée. Deux études ont montré chez les souris que la croissance tumorale est retardée d'une déplétion des Treg induites par les anticorps anti-CD25 (Onizuka, Tawara et al. 1999) et que le volume de la tumeur est corrélé avec le nombre de Treg (Shimizu, Yamazaki et al. 1999). Une diminution de la réponse immunitaire anti tumorale a été observée après un transfert adoptif de Treg (Turk, Guevara-Patino et al. 2004). De nombreuses études chez l'homme aussi ont mis en évidence un nombre augmenté de Treg dans le sang de patients atteints de cancer mais aussi dans les ganglions drainants ou au sein des masses tumorales (Tableau 2).

**Tableau 2 : les Treg dans différentes tumeurs humaines :**

Type de tumeur	Cancers	Treg	References
Tumeurs Solides	Poumon	↗ sang, +++TILs	(Woo, Chu et al. 2001)
	Gastro-œsophagien	↗ sang, +++TILs, dLNs	(Sasada, Kimura et al. 2003)
	Mélanome	↗ sang, dLNs	(Viguiet, Lemaitre et al. 2004)
	CHC	↗ sang, +++TILs	(Ormandy, Hillemann et al. 2005)
	Prostate	↗ sang, +++TILs	(Miller, Lundberg et al.



			2006)
	Sein	↗ sang, +++TILs, dLNs	(Liyanage, Moore et al. 2002)
Tumeurs hématologiques	Lymphome Hodgkinien	↗ sang, +++TILs	(Marshall, Christie et al. 2004)
	Lymphome non- Hodgkinien	↗ sang, +++TILs	(Yang, Novak et al. 2006)
	Lymphome cutané T	↘ capacité suppressive	(Tiemessen, Mitchell et al. 2006)
	Myélome multiple	↘ sang	(Prabhala, Neri et al. 2006)

↗: augmentation, ↘:diminution, TIL : Tumor infiltrating lymphocytis, dLNs : draining lymph nodes.

On peut remarquer que dans les tumeurs solides, les treg sont augmentés dans le sang ou parmi les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL). En revanche, dans les tumeurs hématologiques, il y a une baisse de la proportion des Treg ou de leur capacité suppressive.

L'infiltration des Treg au sein des tumeurs solides semble avoir une valeur pronostique. En général, un taux plus important de Treg est associé à un mauvais pronostic. Dans le mélanome (Miracco, Mourmouras et al. 2007) ou le cancer gastro-oesophagien (Mizukami, Kono et al. 2008), les Treg sont associés à une progression accélérée de la tumeur. Les Treg sont également associés à une mortalité augmentée dans le mélanome, le cancer de l'ovaire, le cancer gastro-oesophagien, et le cancer du pancréas (Curiel, Coukos et al. 2004, Hiraoka, Onozato et al. 2006, Kono, Kawaida et al. 2006, Miracco, Mourmouras et al. 2007). Mais cela reste dépendant du type de tumeur et de sa localisation. C'est le cas du cancer colorectal, où une proportion élevée de Treg dans la tumeur est de bon pronostic, alors qu'elle est de mauvais pronostic quand les Treg sont augmentés dans les tissus sains (Salama, Phillips et al. 2009).

Les tumeurs secrètent des chimiokines, comme le CCL22, le CCL5 et le CCL17 qui sont

capables de recruter les Treg au sein du microenvironnement tumoral (Curiel, Coukos et al. 2004, Ishida, Ishii et al. 2006, Tan, Goedegebuure et al. 2009) grâce aux récepteurs des chimiokines exprimés par les Treg (Wei, Kryczek et al. 2006). Mais l'accumulation des Treg dans les tumeurs ou dans les ganglions drainant la tumeur peut être liée à une induction locale. Plusieurs données indiquent que les Treg qui se trouvent dans le microenvironnement tumoral sont des iTreg. En effet, les cellules tumorales produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  (Seo, Hayakawa et al. 2001, Liu, Wong et al. 2007), ces deux cytokines sont capables d'induire des iTreg. D'autre part, les cellules tumorales produisent aussi de la cycloxygénase-2 (COX-2), qui permet de synthétiser de la prostaglandine E2 (PGE2), la PGE2 à son tour induit Foxp3 dans les lymphocytes T naïfs et soutient les fonctions suppressives des Treg (Sharma, Yang et al. 2005). D'autres types cellulaires pourraient être à l'origine de l'induction de iTreg, comme les cellules DC tolérogènes via la production d'IDO (Indolamine 2,3 dioxygénase) (Baban, Chandler et al. 2009), ou les cellules myéloïdes suppressives (MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cell) via la production de TGF- $\beta$  et d'acide rétinoïque (Huang, Pan et al. 2006).

Cependant, les Treg infiltrant les tumeurs peuvent également être d'origine thymique. En 2011, Hindley et al ont montré que les Treg et les lymphocytes infiltrant la tumeur avaient des répertoires TCR largement distincts, ce qui suggère l'origine thymique des Treg (Hindley, Ferreira et al. 2011). Les Treg sont sélectionnés dans le thymus après une exposition aux Antigènes du soi, en plus, des antigènes tumoraux ou TAA (Tumor Associated Antigens) qui sont majoritairement des antigènes du soi (Khong and Restifo 2002). En 2013, l'étude de Zhu et al. a proposé l'implication de la protéine AIRE dans la génération des Treg spécifiques des TAAs (Zhu, Nagavalli et al. 2013). En fait, cette étude montre chez la souris que, l'expression d'AIRE modifie le pourcentage des Treg spécifiques des TAA qui pourraient être sous le contrôle d'AIRE, renforçant l'hypothèse que les Treg infiltrant les tumeurs soient d'origine thymique (Zhu, Nagavalli et al. 2013). En synthèse, les Treg infiltrant les tumeurs peuvent être d'origine thymique ou périphérique.

Les Treg sont capables d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale. Ils exercent leur fonction suppressive sur plusieurs types cellulaires comme les CD4+, les CD8+, les DC, et les NK. La déplétion des Treg induit une fonction augmentée des lymphocytes CD4+ (Clarke, Betts et al. 2006). L'effet des Treg sur les CD4+ peut, comme toujours, être directe par la sécrétion d'IL10 et de TGF $\beta$  (Loser, Apelt et al. 2007) ou indirecte par l'induction de

Tr1 (Strauss, Bergmann et al. 2007). L'inhibition des CD4+ a pour conséquence une diminution de production d'IFN $\gamma$  (l'IFN $\gamma$  a des effets anti-angiogéniques) (Casares, Arribillaga et al. 2003), et une diminution de l'aide nécessaire pour activer des cellules CD8+ par ces Th. La déplétion des Treg *in vivo* induit une expansion des cellules CD8+ spécifiques de tumeurs et productrices d'IFN $\gamma$ . Les Treg peuvent aussi réagir sur les CD8+ via le PD-L1 qui inhibe la prolifération et les fonctions effectrices des CD8+ en se liant à son récepteur PD-1 à leur surface (Wang, Lau et al. 2009). Ils sont aussi capables de lyser les CD8+ par un mécanisme dépendant de granzyme B (Cao, Cai et al. 2007), et de lyser les DC ce qui diminue le « priming » des CD8+ spécifiques dans les ganglions drainant les sites tumoraux (Boissonnas, Scholer-Dahirel et al. 2010). Les Treg affectent aussi les cellules NK (Figure 11), qui sont connues pour leur efficacité anti-tumorale, elles sont lysées via la voie Perforine/granzyme ou inhibées par le TGF $\beta$  (Cao, Cai et al. 2007). De plus, les Treg peuvent inhiber la fonction des NK en les privant d'IL-2 (Gasteiger, Hemmers et al. 2013).

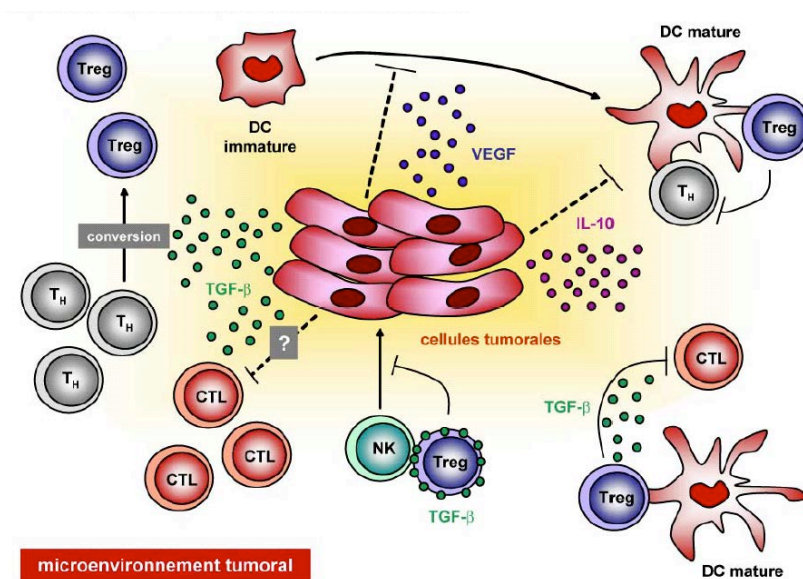


Figure 11 : Interaction des Treg dans l'immuno-surveillance anti-tumorale : Les Treg inhibent la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Dans le microenvironnement tumoral, le TGF- $\beta$  produit 1) par les Treg, a un effet suppresser sur les fonctions cytolytiques des NK et des CTL, 2) par la tumeur : conversion de lymphocytes TCD4+ CD25- Foxp3- en Treg. Le VEGF produit par les cellules tumorales va bloquer le processus de maturation des DC.

## Les Treg et la transplantation d'organe

Pour traiter l'insuffisance fonctionnelle terminale d'un organe, la transplantation est une solution thérapeutique largement utilisée. Cependant la réponse cellulaire allogénique déclenchée par le système immunitaire du receveur contre le greffon est responsable du rejet

qui reste un obstacle majeur au succès de ce type de thérapie. Après une greffe du foie, deux types de rejet ont clairement été démontrés, le rejet aigu et le rejet chronique.

**Le rejet aigu :** c'était le type de rejet le plus fréquent jusqu'à la découverte des traitements immunosuppresseurs. Le rejet aigu est généralement observé dans les jours ou les semaines qui suivent la transplantation, et les mécanismes, qui y sont impliqués, sont nombreux et font intervenir un grand nombre de cellules immunitaires spécialisées, telles que les lymphocytes T, granulocytes et macrophages aboutissant à la destruction de l'organe. En un mot, les alloantigènes sont présentés par le CMH aux lymphocytes T CD4, ils sont activés et sécrètent des cytokines dont l'IL2 qui est responsable de l'activation clonale des lymphocytes T, mais aussi de l'activation des cellules B et autres cellules inflammatoires ; sans traitement immunosuppresseur, les lésions évolueront vers la perte du greffon (Figure 12). Le diagnostic de rejet aigu en transplantation hépatique est histologique, les lésions caractéristiques sont un infiltrat inflammatoire portal, de l'endothélite et des lésions inflammatoires des canalicules biliaires.

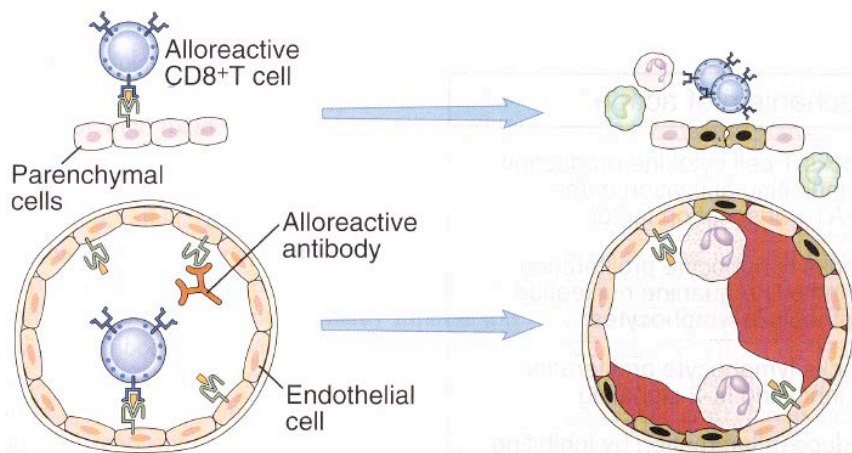


Figure 12: mécanisme du rejet aigu cellulaire : les lymphocytes T du receveur reconnaissent les Ag allogéniques du donneur dans le contexte du CMH (du receveur ou du donneur).

**Le rejet chronique :** Le rejet chronique est dû à des causes multiples mais avant tout immunologiques, il est responsable d'une altération irréversible et progressive de la fonction du greffon. Histologiquement, il est caractérisé par une endartérite spumeuse des artères hépatiques de gros calibre, par la disparition de canaux biliaires intra-hépatiques, par un infiltrat inflammatoire peu abondant et par une fibrose progressive (Figure 13).

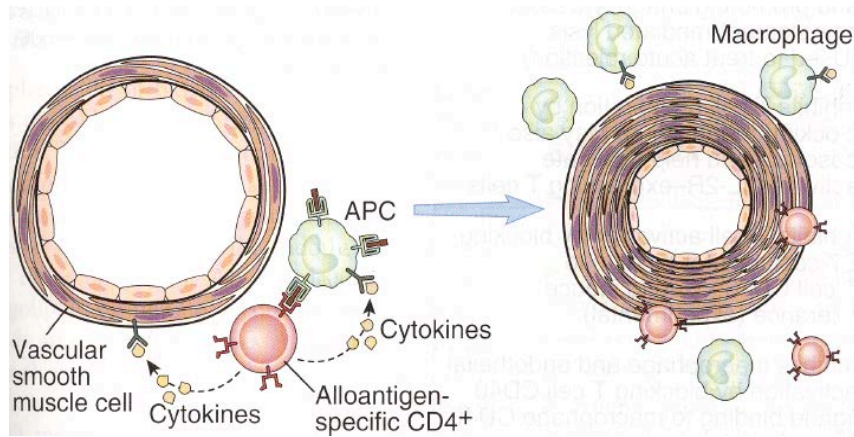
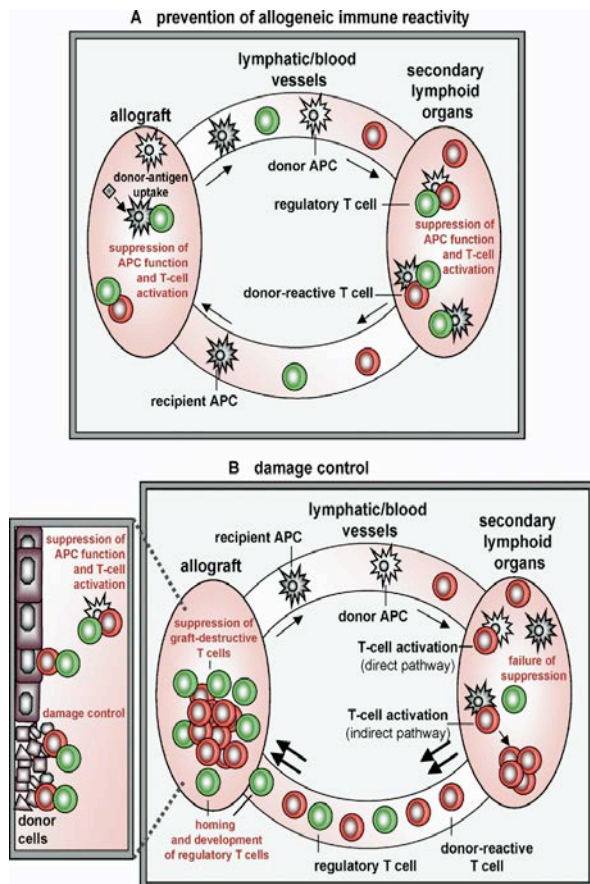


Figure 13: mécanisme du rejet chronique: infiltration de paroi vasculaire par des cellules inflammatoires et productions de cytokines et de facteurs de croissance induisant une prolifération incontrôlée de paroi vasculaire et obturation des vaisseaux. Le rejet du foie peut survenir à tout moment après la greffe, c'est pourquoi les valeurs des enzymes hépatiques doivent être contrôlées régulièrement.

De nombreuses molécules ciblant les populations cellulaires responsables du rejet ont donc été développées pour diminuer l'incidence du rejet d'organe. Le principal inconvénient des drogues immunosuppressives ou des anticorps monoclonaux disponibles en clinique réside dans la difficulté d'un ciblage spécifique des populations lymphocytaires allo-réactives, l'induction d'effets iatrogènes néfastes sur l'immunité des patients transplantés, ainsi que d'autres types d'effets secondaires. L'effort de recherche a permis de mettre au point de nouvelles molécules plus adaptées aux différents types de greffes améliorant ainsi la qualité de vie des patients. Cependant de nombreuses barrières existent toujours dans l'induction d'un état de tolérance à long terme sans altérer la fonction immunitaire du receveur et, plus généralement, l'homéostasie de l'organisme.

Le rejet, médié par la réaction immunitaire cellulaire, reste une cause de dysfonction du greffon dans toutes les transplantations d'organe solide. Le développement spontané d'un état de tolérance envers le greffon chez certains receveurs indique que, comme le rejet qui est médié par des mécanismes actifs immunitaires, l'acceptation du greffon est aussi développée par des mécanismes actifs immunorégulateurs. Un de ces mécanismes pourrait être lié aux Treg, qui ont la capacité de supprimer la réponse de l'hôte envers le greffon. En effet, un nombre plus élevé de Treg a été observé dans le sang et au sein greffon de patients ayant toléré leur greffe (Meloni, Vitulo et al. 2004, Akl, Jones et al. 2008). En revanche, en cas de rejet aigu, un nombre moins important de Treg est observé (Ochando, Yopp et al. 2005). Cette diminution de Treg est associée à la présence de lymphocytes T mémoires qui reconnaissent les allo-antigènes du donneur (Yang, Brook et al. 2007). Les Treg doivent exercer leur

activité immunosuppressive au niveau du greffon et au niveau des ganglions lymphatiques drainant le site de la transplantation (Figure 14) (Dijke, Weimar et al. 2008).



**Figure 14 : Schéma de la fonction des Treg au cours de la transplantation.**

(A) Les cellules Treg (en vert) contrôlent la réponse immunitaire allogène en circulant continuellement entre l'organe transplanté, le sang et les organes lymphoïdes secondaires, où elles 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, Weimar et al. 2008).

Plusieurs études en cliniques indiquent l'existence d'une corrélation entre la fréquence des Treg chez le receveur et la tolérance opérationnelle :

- En transplantation hépatique (TH) : les patients présentant un rejet aigu ont moins de Treg que les patients sans rejet (Demirkiran, Kok et al. 2006, Martinez-Llordella, Puig-Pey et al. 2007), de plus *in vitro*, seuls les Treg Foxp3+ isolés de patients tolérants, sont capables de réguler la réponse spécifique du donneur (Burrell, Nakayama et al. 2012).
- En transplantation rénale : La fréquence des Treg circulants est diminuée lors du rejet aigu par rapport aux patients sans rejet (Kim, Oh et al. 2009). Les patients tolérants ont aussi plus de Treg FoxP3+ dans le sang périphérique que les patients

atteints de rejet chronique, ils ont aussi plus de cellules FOXP3 dans le greffon (Akl, Jones et al. 2008).

- En transplantation pulmonaire : le lavage broncho-alvéolaire des patients avec une fonction stable contient un pourcentage de Treg plus élevé que les patients qui développent une bronchiolite oblitérante, c'est-à-dire une manifestation du rejet chronique (Meloni, Vitulo et al. 2004).
- En transplantation cardiaque : il y a une corrélation entre un taux plus élevé de Foxp3 et une incidence plus faible du rejet aigu (Vlad, Ho et al. 2007).

D'autres études ont montré que la transplantation allogénique peut être responsable de la génération d'iTreg alloréactifs, ou faire proliférer les Treg déjà existantes chez l'hôte (Steger, Kingsley et al. 2006). Cette génération d'iTreg pourrait être le résultat de l'exposition prolongée aux alloantigènes du donneur, ce qui permettra une meilleure tolérance de l'allogreffe. Tous ces travaux montrent que la fréquence et la fonction des Treg sont importantes pour distinguer les patients cliniquement stables des patients présentant un rejet (aigu ou chronique). La surveillance de ces cellules permettrait d'identifier les patients dont la réponse allo-réactive est contrôlée.

### **Les Treg et les traitements immunosuppresseurs**

Un aspect très important concernant les Treg dans le cadre de la transplantation d'organe est l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs pour contrôler l'activation des lymphocytes T alloréactifs et pour prévenir le rejet aigu et chronique car ces médicaments peuvent affecter aussi le nombre et la fonction des Treg chez le receveur. Ces agents ont de nombreux effets secondaires comme le risque infectieux, le risque accru de développer un cancer ... (Taylor, Watson et al. 2005). L'idéal pour un patient est de développer une tolérance opérationnelle qui permettra l'arrêt du traitement immunosuppresseur et d'éviter leurs effets secondaires tout en favorisant le développement des Treg. Plusieurs immunosuppresseurs ont été introduits en cliniques depuis les années 1980, ce qui a permis de développer la transplantation d'organe solide avec de bons résultats (Figure 15).



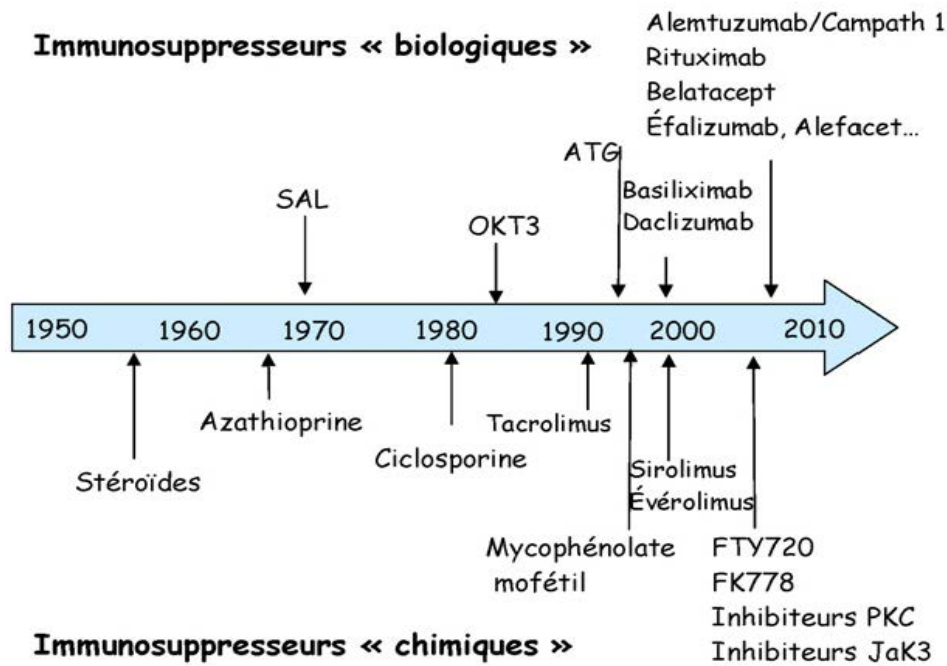


Figure 15 : Historique d'introduction des traitements immunosuppresseurs : La cyclosporine A a été introduit dans les années 80 ce qui a révolutionné la transplantation d'organes solides. L'immunosuppression classique après la transplantation hépatique est actuellement basée sur l'utilisation d'un anti-calcineurines (Tacrolimus ou Cyclosporine) ou un ihibiteur de mTOR (Everolimus) associé à des corticoïdes la première année, et au mycophénolate mofétil (MMF) (Calmus 2009).

Le traitement immunosuppresseur doit contrôler les différentes phases de l'allo-activation : phase de reconnaissance, de différenciation, de prolifération, d'infiltration et de destruction du greffon. Il y a le plus souvent une association de plusieurs médicaments aux mécanismes d'action différents mais complémentaires qui agissent à quatre niveaux de la réaction immunitaire: l'inhibition des 3 signaux d'activation lymphocytaire et de la prolifération (Figure 16, Tableau 3). Les transplantés hépatiques, reçoivent généralement un traitement basé sur une combinaison de 3 médicaments immunosuppresseurs : le Tacrolimus (Tac), le Mycophénolate mofétil (MMF), et des corticoïdes qui seront arrêtés dans les premiers mois post-TH (Verdonk, van den Berg et al. 2007).



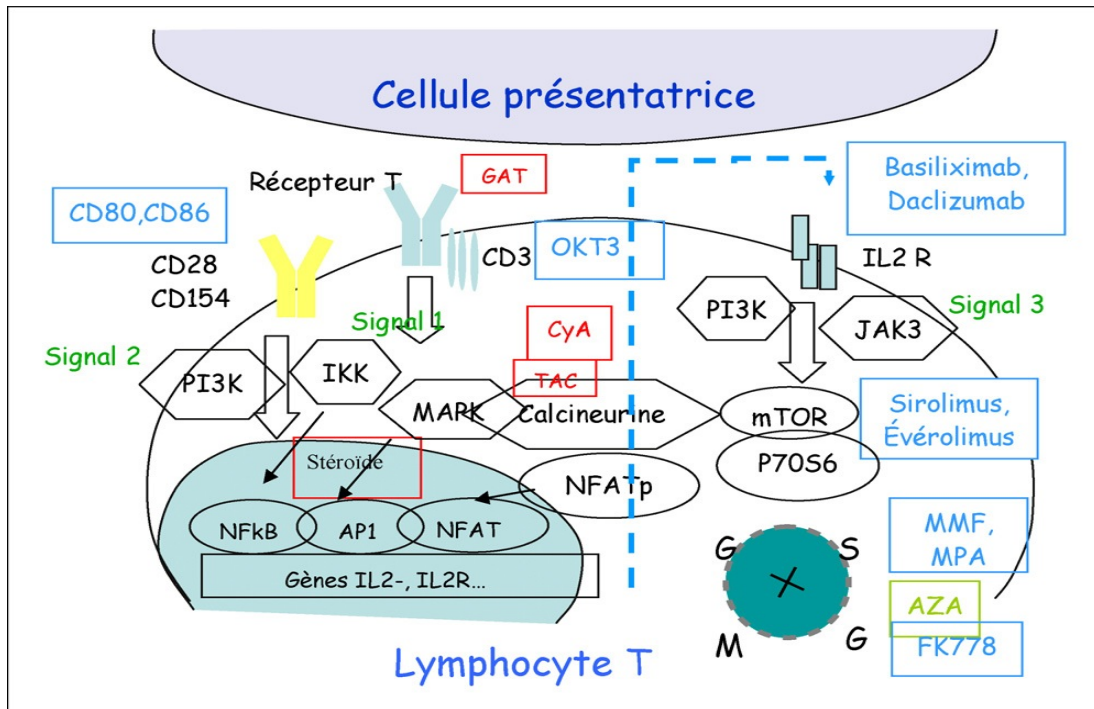


Figure 16 : mécanismes d'action des différents traitements immunosuppresseurs : les ACN inhibent la production de cytokines, en particulier d'IL2, les corticoïdes inhibent la production d'IL1 et d'IL6, le MMF et l'azathioprine inhibent l'entrée dans le cycle cellulaire et donc la prolifération des lymphocytes T, les inhibiteurs de mTOR inhibent transduction du signal de l'IL2 (Calmus 2009).

**Tableau 3 : Les différents traitements immunosuppresseurs et leurs mécanismes d'action :**

	Mécanisme d'action	Reference
<b>1- Les Anti-Calcineurine (ACN)</b>		
<b>A) Ciclosporine A (CsA)</b>	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	(Stepkowski 2000)
<b>B) Tacrolimus (Tac ou FK506)</b>	blocage de la prolifération des cellules T et de la transcription du gène de l'IL2, conduisant à une réduction marquée de l'activité des lymphocytes T effecteurs	(Lazarous and Kerdel 2002)

<b>2- Les inhibiteurs de mTOR (<i>mammalian Target of Rapamycin</i>)</b>		
<b>A) Sirolimus (Rapamycine)</b>	La rapamycine se lie dans le cytosol à la FK Binding Protein, et ce complexe inhibe la protéine mTOR complexe 1 et 2, qui est la voie de transduction du signal de l'IL2, ce qui conduit à un blocage des lymphocytes T et B en transition G1/S du cycle cellulaire.	(Rodriguez-Peralvarez, De la Mata et al. 2014)
<b>B) Everolimus</b>	Comme le Sirolimus.	(Rodriguez-Peralvarez, De la Mata et al. 2014)
<b>3- Le Mycophénolate mofétil (MMF)</b>	une pro-drogue inactive, métabolisée dans le foie en ester de l'acide mycophénolique (MPA) qui inhibe la synthèse des bases puriques de l'ADN et donc bloque le cycle cellulaire au stade S.	(Stepkowski 2000)
<b>4- Les Corticoïdes</b>	Effet sur plusieurs composants de la réponse immunitaire et inflammatoire :  Une inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoire (l'IL2, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ ) et donc une inhibition de la fonction des lymphocytes T helpers, suppresseurs et cytotoxiques, et des macrophages.	(Roumestan, Gougat et al. 2004)
<b>5- L'anti Thymocyte globuline (ATG)</b>	Déplétion des cellules T (thérapie d'induction).	(Yu, Fang et al. 2012)
<b>6- Les anti récepteur de l'IL-2 (Basiliximab)</b>	Blocage du signal du récepteur de l'IL-2 qui est essentiel pour la survie et la prolifération des lymphocytes T.	(Calmus 2009)

Les effets des différents traitements immunosuppresseurs sur les Treg ont été évalués dans différentes études. Certains de ces médicaments ont un effet délétère sur les Treg, d'autres ont un effet favorable à la prolifération et à la fonction suppressive de ces cellules, ce qui représente un intérêt pour les patients transplantés en favorisant la survie du greffon. En effet, **la CsA** réduit significativement le nombre des Treg et inhibe leur fonction suppressive dans des modèles murins (Kawai, Kitade et al. 2005, Wang, Zhao et al. 2006, Zeiser, Nguyen et al. 2006). Chez l'homme, l'administration d'un anticalcineurine (CsA/Tacrolimus), en transplantation rénale, induit une diminution des Treg en périphérie (San Segundo, Ruiz et al. 2006). Par contre, l'effet de la CsA sur l'activité suppressive est controversé, certaines études montrent une diminution de l'activité suppressive et d'autres trouvent que les Treg ont une activité comparable à celle observée chez les patients traités par Sirolimus (Lopez-Hoyos, Segundo et al. 2009). Quand au **Tac**, qui est largement utilisé, un nombre diminué de Treg a été observé chez les patients transplantés hépatiques qui recevaient une bithérapie comprenant Tac et MMF en comparaison par les patients sous Sirolimus seul (Levitsky, Miller et al. 2009), cet effet du Tac semble être dose-dépendant puisque les Treg augmentaient à faible dose (3 à 7 ng/ml) (Wang, Shi et al. 2009). Les **inhibiteurs de mTOR** semblent avoir un effet favorable à la prolifération des Treg ; l'équipe de Roncarolo a observé que le Sirolimus en présence de forte dose de d'IL2 induisait la prolifération des Treg murins *in vitro*, ces cellules avaient une activité suppressive supérieure à celle des Treg fraîchement isolés (Battaglia, Stabilini et al. 2005). Ces données ont été confirmées chez l'homme sur des cellules provenant des donneurs sains ou souffrant de diabète de type 1 (Battaglia, Stabilini et al. 2006). Plusieurs études *in-vivo* ont montré une augmentation des Treg chez les receveurs, soit d'une transplantation rénale sous Sirolimus par rapport aux patients sous Tac, MMF (Hendriks, Velthuis et al. 2009), ou CsA (Ruggenenti, Perico et al. 2007), soit d'une transplantation pulmonaire (Lange, Tran et al. 2010). Le **MMF** a un effet bénéfique sur les Treg et induit une augmentation des Treg dans la rate et les ganglions drainant une greffe du pancréas dans un modèle murin (Gregori, Casorati et al. 2001). L'effet positif sur les Treg du MMF a également été observé chez l'homme, ou la conversion d'un inhibiteur de la calcineurine au MMF après TH induit une augmentation des Treg (Demirkiran, Sewgobind et al. 2009). Le MMF pourrait jouer sur la balance Treg/Th17 favorisant les Treg, puisque son métabolite le MPA inhibe *in vitro* la production d'IL1 $\beta$  par les monocytes et de TIM-1 par les lymphocytes CD4+ qui sont importants pour la différenciation des cellules Th17 (Abadja, Videcoq et al. 2009). Les **corticoïdes** augmentent la fréquence des Treg dans plusieurs contextes cliniques telle que la sclérose multiple (Braith, Harikrishnan et al. 2009), l'asthme

(Zhang, Qian et al. 2008), ou le lupus érythémateux (Azab, Bassyouni et al. 2008). Mais l'effet des corticoïdes sur la fonction des Treg est controversé, la dexaméthasone induit *in vitro* des cellules CD25<sup>high</sup> aux caractéristiques phénotypiques des Treg, mais sans activité suppressive, et les Treg isolés de patients atteints de SLE et traités par corticoïdes, ont une activité suppressive similaire à celle des Treg isolés de patients non traités (Prado, Gomez et al. 2011).

## **Les cellules Treg et l'hépatite C**

### **L'Hépatite C**

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un agent étiologique majeur d'hépatite. L'agent responsable d'hépatites post-transfusionnelles dites « non A-non B » est resté pendant longtemps inconnu, jusqu'à la mise en évidence de son génome en 1989. Plus de 170 millions de personnes sont infectées dans le monde, très inégalement réparties. La guérison spontanée de l'infection est rare et, après la phase de primo-infection par le VHC, le plus souvent asymptomatique, l'évolution se fait vers une hépatite chronique dans 70 à 80% des cas avec un risque majeur de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (CHC). En revanche, il est possible d'obtenir une guérison chez la moitié des patients infectés en les traitant par une association d'interféron- $\alpha$  et de ribavirine ; actuellement il semble que de nouveaux agents antiviraux directs permettront la guérison d'un pourcentage plus important de patients (Conteduca, Sansonno et al. 2014).

### **L'épidémiologie**

La transmission se fait essentiellement par le sang ou les produits dérivés ou tout support associé à une effraction de la barrière cutanée. La mise en place des tests de dépistage des anticorps anti-VHC pour les dons de sang (1991 dans la majorité des pays développés), l'hépatite C post-transfusionnelle a pratiquement disparu. Aujourd'hui, la toxicomanie par voie intraveineuse est le facteur de risque le plus important de contamination. Les pratiques de piercing et de tatouage réalisées dans des conditions d'hygiène peu satisfaisantes, seraient également responsables de contamination. La transmission nosocomiale du VHC est aussi documentée à la suite d'endoscopies ou de dialyse, même si les précautions prises en milieu médical en limitent la portée. Les transmissions sexuelles ainsi que de la mère à l'enfant sont exceptionnelles, sauf en cas de coïnfection par le VIH. Cependant le mode d'exposition chez 20% des patients reste inconnu.

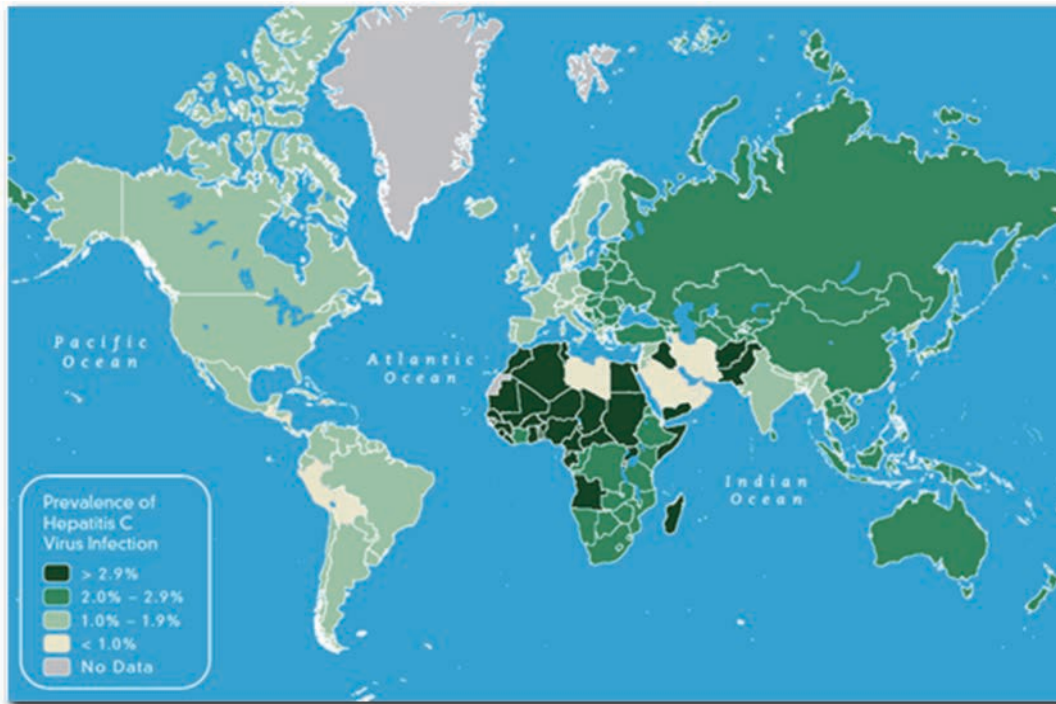


Figure 17 : Prévalence du virus de l'hépatite C par pays en 2011. La prévalence de l'infection par le VHC est plus importante en Asie, Afrique sub-saharienne et en Amérique de sud-est. Source : Centers for control disease and prevention (<http://www.cdc.gov/hepatitis/C>).

La prévalence de l'infection par le VHC est variable dans le monde (Figure17). Elle est faible dans certains pays (<0.5%), comme les pays nordiques, elle est intermédiaire dans d'autres (1%), comme la France (Figure 18), mais peut-être très élevée (>2.9%) dans certaines régions d'Afrique (comme l'Egypte) ou d'Asie.

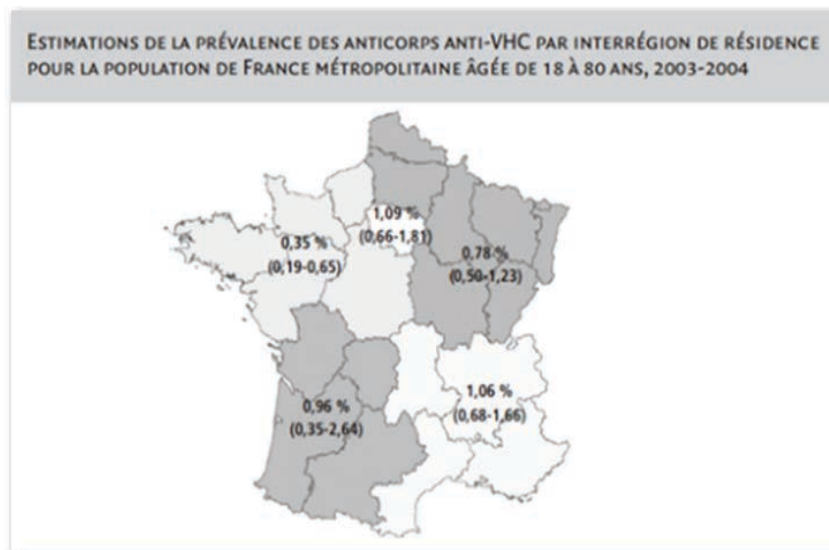


Figure 18 : Prévalence des hépatites B et C en France en 2004. INVS, rapport, mars 2007, p.30.

La comparaison des génomes de souches provenant de différentes régions géographiques a permis de les classer en plus de dix génotypes dont six sont d'importance médicale (génotype 1 à 6). Les génotypes sont différenciés en sous-types identifiés par une lettre minuscule (ex : 1a, 1b ...). La gravité de l'infection et la réponse au traitement sont dépendantes du génotype. La figure 19 représente la distribution globale des génotypes du VHC dans le monde.

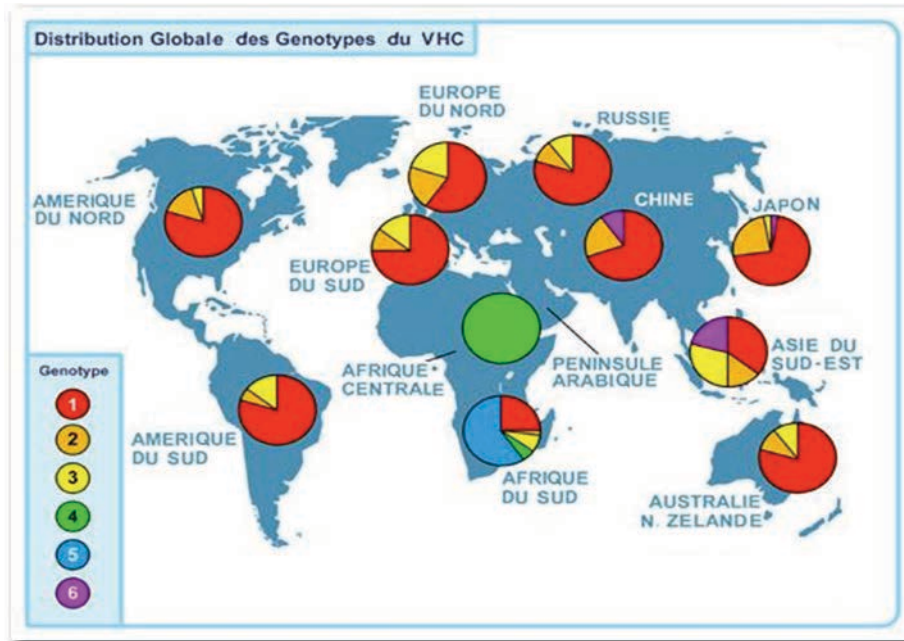


Figure 19 : Distribution mondiale des génotypes du VHC. Au niveau mondial, on trouve une prédominance de du génotype 1 du VHC, mais en Afrique les génotypes 4 et 5 sont majoritaires. Source : *Organization Mondiale de la santé (OMS)*.

## Le virus de l'hépatite C

Le VHC est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité positive, classé dans la famille des Flaviviridae, genre Hepacivirus. L'enveloppe porte deux glycoprotéines E1 et E2 et renferme une nucléocapside icosaédrique (Figure 20).

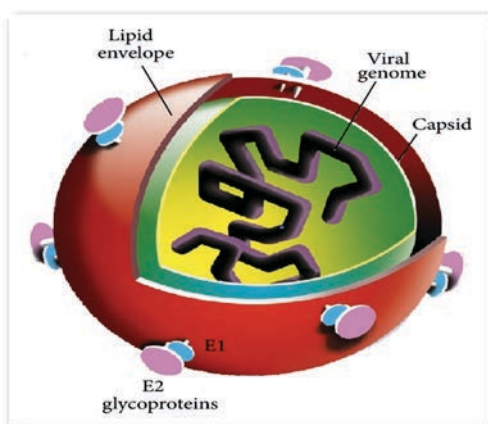


Figure 20 - Structure du VHC : La molécule d'ARN viral est contenue dans une capsid protéique icosaédrique entourée d'une double couche phospholipidique portant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Le génome du VHC est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive, d'une longueur approximative de 9600 nucléotides (nt). (Pecher 2012).

Le cycle de multiplication virale est encore mal connu, car il n'existe pas de système *in vitro* de culture efficace pour l'étudier. Grâce au système de pseudo particules virales, plusieurs cofacteurs cellulaires indispensables à l'entrée du VHC dans la cellule ont été identifiés : des cofacteurs non spécifiques d'entrée, le Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) et les glycosaminoglycan ainsi que quatre cofacteurs spécifiques d'attachements, la tétrasparine CD81, le human scavenger receptor class B type I (SRBI) et les protéines de jonction claudine et occludine. Comme c'est le cas pour les autres virus à ARN, l'ARN polymérase ARN dépendante virale ne possède pas de système de réparation des erreurs de lecture et elle est à l'origine de l'extrême variabilité du virus. Le virus circule dans l'organisme sous forme de quasi-espèces qui correspondent à des variantes virales proches (ils sont différents par quelque nucléotides) et se multiplie essentiellement dans les hépatocytes. D'autres types cellulaires sont susceptibles d'héberger le virus comme les cellules mononuclées sanguines ou les cellules neuro-épithéliales. Le chimpanzé est le seul modèle animal où le virus peut se répliquer naturellement, néanmoins ce modèle présente plusieurs inconvénients : ce singe développe rarement une infection chronique, il est très coûteux, et est de manipulation délicate nécessitant une infrastructure spécialisée. Récemment, des modèles de souris greffées avec les hépatocytes humains, comme le modèle uPA-SCID (urokinase-type Plasminogen Activator/Sever Combined ImmunoDefficiency), ont été développés permettant l'étude de l'infection par le VHC. En 2003, un clone de VHC de génotype 2a a été isolé à partir d'un patient japonais présentant un cas rare d'hépatite fulminante C. Ce clone a été désigné comme JFH1 (hépatite fulminante japonais 1) et le réplicon construit à partir de cette souche est capable de se répliquer dans les cellules Huh-7 (lignée de cellules de CHC) sans avoir besoin de mutations adaptatives (Sabahi 2009). Par la suite, il a été constaté que la transfection de l'ARN de JFH1 dans les cellules Huh7 a abouti à la production de novo de virus infectieux : HCVcc (VHC dérivé de culture cellulaire) qui est capable d'infecter des cellules Huh7 naïves.

### **L'histoire naturelle de l'infection**

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

- L'infection aiguë par le VHC est, dans 80% des cas, parfaitement asymptomatique, et fait suite à une période d'incubation d'environ 6 à 8 semaines également asymptomatique.



- Au terme de la phase aiguë, l'infection virale évolue vers la chronicité dans 50 à 80% des cas malgré le développement des réponses immunitaires humorale et cellulaire.
- 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. En cas de cirrhose, l'incidence annuelle du CHC est de l'ordre de 3 à 5% par an. La grande variabilité du virus (quasi-espèces) lui permet d'échapper au système immunitaire. Les lésions hépatiques ne sont pas dues à un effet cytopathique du virus, mais à la réponse immunitaire et en particulier à la destruction des hépatocytes par les lymphocytes T cytotoxiques.

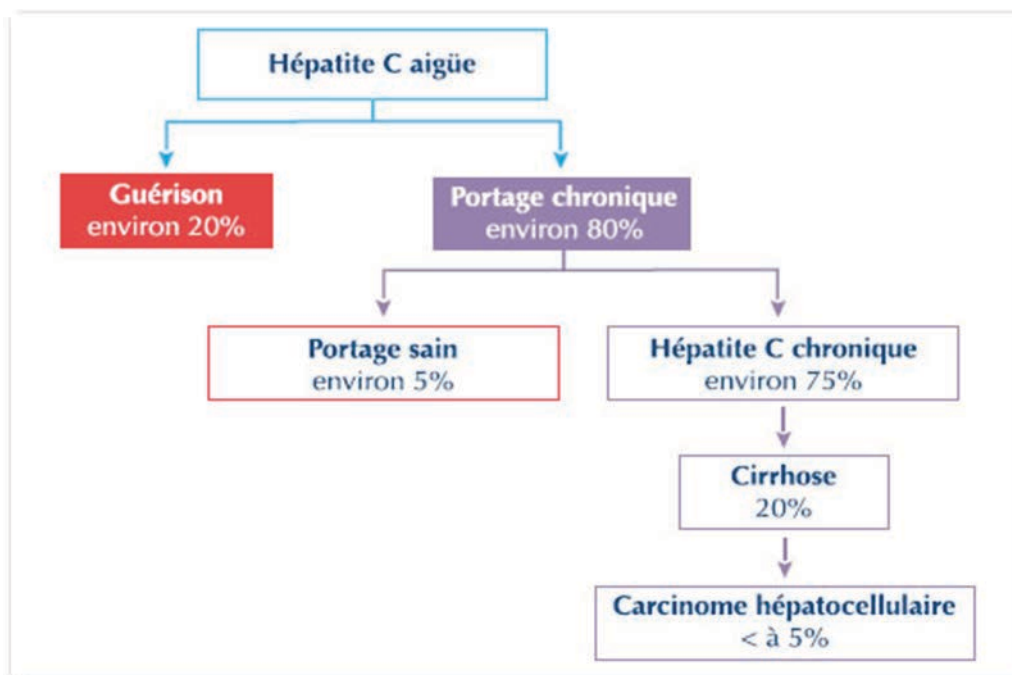


Figure 21 : L'histoire naturelle d'Hépatite C : une majorité des patients infectés développe une Hépatite chronique qui, dans 20% des cas, évolue vers une cirrhose. L'incidence de CHC sur un foie cirrhotique s'élève à 5%. Source : [www.ccr.fr/sites/hepatite\\_C/site/index.htm](http://www.ccr.fr/sites/hepatite_C/site/index.htm)

L'évolution vers la chronicité et la cirrhose se fait en plusieurs étapes, avec tout d'abord le développement d'une hépatite chronique qui peut devenir symptomatique. Cette hépatite chronique devient active dans 30% des cas, pour lesquels l'inflammation hépatique conduit au développement d'une cirrhose. Enfin, chez 5 à 10% des patients la cirrhose va évoluer vers le carcinome hépatocellulaire, qui représente le stade ultime de la pathologie.

Différentes études cliniques ont permis de mieux comprendre cette disparité de risques au cours de l'histoire naturelle de l'infection virale qui est liée à différents facteurs de risques

externes, en particulier à une consommation excessive d'alcool, une co-infection par le VIH ou un traitement immunosuppresseur.

### Le traitement de l'Hépatite C

L'hépatite C ne nécessite pas toujours un traitement. Les 6 génotypes répondent différemment au traitement. Un dépistage précis est donc nécessaire avant de commencer le traitement pour déterminer l'approche la plus appropriée pour le patient. Le traitement de l'hépatite C chronique reposait, jusqu'à maintenant, sur l'association d'un IFN- $\alpha$  humain recombinant (2a ou 2b) pégylé associé à la ribavirine. L'interféron n'est pas largement accessible dans le monde, il n'est pas toujours bien toléré ; certains génotype viraux (génotype 2 et 3) répondent mieux que d'autres (génotype 1 et 4), et moins de la moitié des patients infectés par le VHC de génotype 1 vont développer une réponse virale soutenue (SVR, *Sustained Viral Response*) (Figure 22).

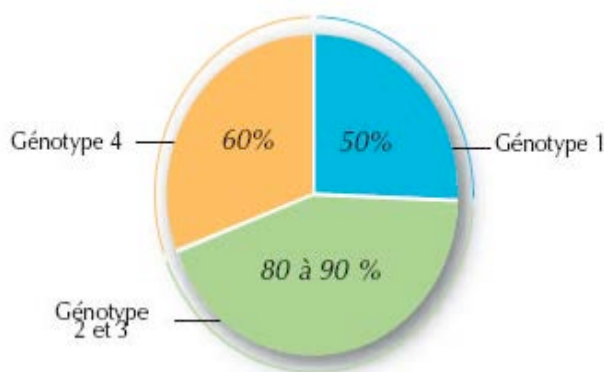


Figure 22 : Réponse à la bithérapie IFN $\alpha$  / Ribavirine, selon le génotype viral. Les génotypes 2 et 3 sont les plus répondeurs au traitement et le génotype 1, le moins répondeur. *Source: www.ccr.fr/sites/hepatite\_C/site/index.htm*

Deux nouveaux antiviraux des antiprotéases, le bocéprévir et le télaprévir ont permis de traiter davantage de patients non répondeurs au traitement actuel avec une amélioration de la réponse virologique soutenue (SVR, *Sustained Viral reponse*) de 20 à 30% chez les patients non répondeurs ou rechuteurs après un premier traitement standard par interféron et ribavirine. Le taux de SVR s'élève à 70-80% chez les patients de génotype 1 naïf, comparé aux 50% qu'on traite avec la bithérapie actuelle, mais les effets secondaires étaient nombreux.

Une nouvelle génération d'antiviraux est aujourd'hui disponible. Il s'agit de médicaments mieux tolérés que les thérapies existantes, et qui ont, pour certains, une activité pan-génotypique. Les premières molécules ont été développées, en association avec la ribavirine,

avec ou sans interféron pégylé selon le génotype viral, comme le Sofosbuvir qui est un analogue nucléotidique spécifique du virus de l'hépatite C (inhibiteur de la polymérase NS5B). L'association de ces trois molécules permet d'obtenir une réponse virologique soutenue (RVS) à 12 ou 24 semaines après l'arrêt du traitement de l'ordre de 90%.

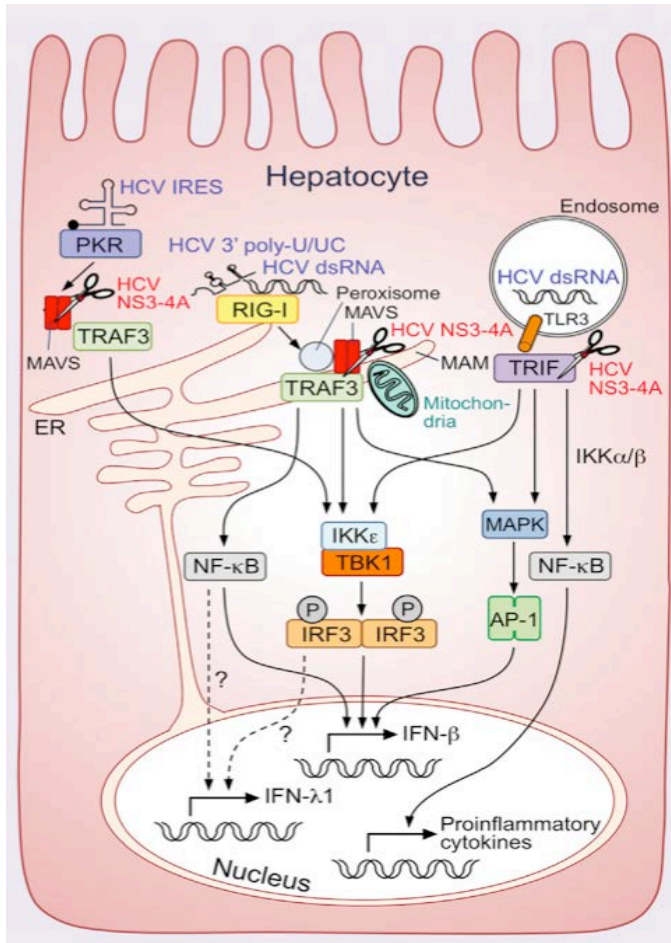
Ce premier médicament devrait être rapidement suivi d'autres molécules, notamment simeprévir (inhibiteur de la protéase NS3/A4) et lédirasvir et daclatasvir (inhibiteurs de la protéine NS5A), dasabuvir (inhibiteurs non nucléosidique de la NS5B). Une association de ces médicaments peut être utilisée sans interféron voire sans ribavirine. Le siméprévir et le daclatasvir sont déjà disponibles dans le cadre d'Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU), en association au sofosbuvir, pour le traitement des patients présentant une maladie à un stade avancé et pour lesquels il n'existe pas d'alternative appropriée (Afdhal, Reddy et al. 2014, Afdhal, Zeuzem et al. 2014, Kowdley, Gordon et al. 2014, Sulkowski, Gardiner et al. 2014).

## **La réponse immunitaire et le VHC**

La première ligne de défense immunitaire contre le VHC repose sur l'immunité innée intrinsèque des hépatocytes. Cette réponse immunitaire innée sert à reconnaître le VHC comme du non-soi et induit des défenses antivirales locales dans les cellules et le parenchyme infecté qui peut recruter et moduler les actions des cellules du système immunitaire inné et adaptatif. L'immunité Innée hépatique est donc essentielle pour contrôler le résultat de l'infection par le VHC et de l'immunité.

### **L'immunité innée et le VHC**

La reconnaissance du VHC au sein des hépatocytes est achevée via les senseurs de l'ARN viral : le RIG-1 (retinoic acid-inducible gene-1) et le PKR (RNA dependent Protein Kinase) qui détectent l'ARN viral dans le cytoplasme, et le TLR-3 (Toll Like Receptor-3) qui détecte l'ARN viral extracellulaire libéré par les autres hépatocytes infectés. Ceci induit des cascades de signalisation à l'intérieur de l'hépatocyte aboutissant à la synthèse des IFN type 1 et 3 (Les IFN de type I sont connus pour avoir un effet antiviral direct), ainsi que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , CXCL10) (Park and Rehmann 2014). Mais le VHC échappe à ces réponses innées via son NS3-4A, serine protéase qui bloque l'induction de l'INF- $\beta$  et les ISG (Inteferon Stimulated Gens) (Cheng, Zhong et al. 2006) (Figure 23).



**Figure 23 :** Reconnaissance de l'ARN viral dans les hépatocytes : l'ARN viral est reconnu par le PKR, RIG-1 et le TLR-3. Le signal de RIG-1 et PKR est transmis via TRAF-3, et le signal de TLR-3 est transmis via TRIF. Le TRAF-3 et le TRIF sont clivés par la protéase virale NS3-4A, ce qui bloque la production de l'IFN-β et γ, et les cytokines pro-inflammatoires TNF-α et CXCL-10 (Park and Rehermann 2014).

Mais 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, et les cellules dendritiques, ces cellules sont capables de produire les IFN de type 1 et 3. Une étude récente, évaluant des biopsies hépatiques de patients HCV+, a montré que les cellules de Kupffer secrètent de l'IFN-β (Lau, Negash et al. 2013). Les cellules NK représentent 40% des lymphocytes totaux dans le foie sain. Cependant, le VHC interférerait 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). L'IFN est essentiel pour développer une réponse adaptative de Type Th1, et la production insuffisante d'IFN par les cellules NK induit une diminution des Th1 en faveur d'une réponse Th2, permettant ainsi la persistance virale et la chronicité de la pathologie (Tseng and Klimpel 2002). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) intra-hépatiques produisent de l'IFN-α. Elles ne répondent pas directement au VHC *in-vitro* (Shiina and Rehermann 2008), mais elles reçoivent des exosomes contenant l'ARN viral à partir des hépatocytes infectés (Takahashi, Asabe et al. 2010). Ce mécanisme nécessite un contact direct entre les deux types cellulaires

et l'activation du TLR-7 des pDC pour produire de l'IFN- $\alpha$  (Dreux, Garaigorta et al. 2012). Ce mécanisme décrit *in vitro* doit être confirmé dans le foie infecté. Les cellules non-parenchymateuses telles que les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) pourraient produire de l'IFN- $\gamma$  après contact avec les hépatocytes infectés *in-vitro* via un mécanisme dépendant à l'activation de TLR-3 et TRIF (Toll/IL-1 receptor domaine-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) (Zhang, Kodys et al. 2013). Il est concevable que les IFN- $\alpha/\beta/\gamma$  produits par des cellules non parenchymateuses participent à l'induction des ISG via l'interaction avec le récepteur de l'IFN- $\alpha/\beta$  et de l'IFN- $\lambda$  qui active la voie de signalisation Jak-STAT dans les hépatocytes (Metz, Reuter et al. 2013).

Le VHC est également capable d'altérer la fonction des cellules dendritiques conventionnelles (cDC). En effet, Krishnadas *et al.* ont 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 co-stimulation et du CMH, en diminuant la sécrétion d'IL-12 et en induisant l'expression de molécules pro-apoptotiques (Krishnadas, Ahn et al. 2010). Le VHC par l'altération de la fonction des cDC conduit à une activation insuffisante des cellules T spécifiques du VHC et donc un retard dans la mise en place de la réponse adaptative.

L'altération de différents types cellulaires du système immunitaire inné semble conduire à la persistance du VHC. Cependant, ces cellules ne peuvent pas contrôler la réplication et la dissémination virale mais elles permettent le développement des réponses T CD4+ helper et T CD8+ cytotoxiques spécifiques du virus.

### **L'immunité adaptative et le VHC**

Une caractéristique unique de l'infection par le VHC est l'apparition tardive de la réponse immunitaire adaptative, qui n'est généralement pas détectable avant 8 à 12 semaines après l'infection, qu'il s'agisse d'une infection à guérison spontanée ou d'une évolution vers la chronicité.

### **L'immunité humorale**

La réponse immunitaire humorale n'est pas capable de lutter contre l'infection par le VHC. Cet échec peut s'expliquer, au moins en partie, par un taux de mutation important concernant les antigènes du virus. Les anticorps anti-VHC deviennent détectables après le développement

d'une réponse cellulaire anti-VHC, et le taux d'anticorps ne semble pas être corrélé avec les chances de guérison. Après une guérison spontanée de l'infection, les anticorps spécifiques du virus ne donnent pas de protection permanente (Rehermann 2013) (Figure 24).

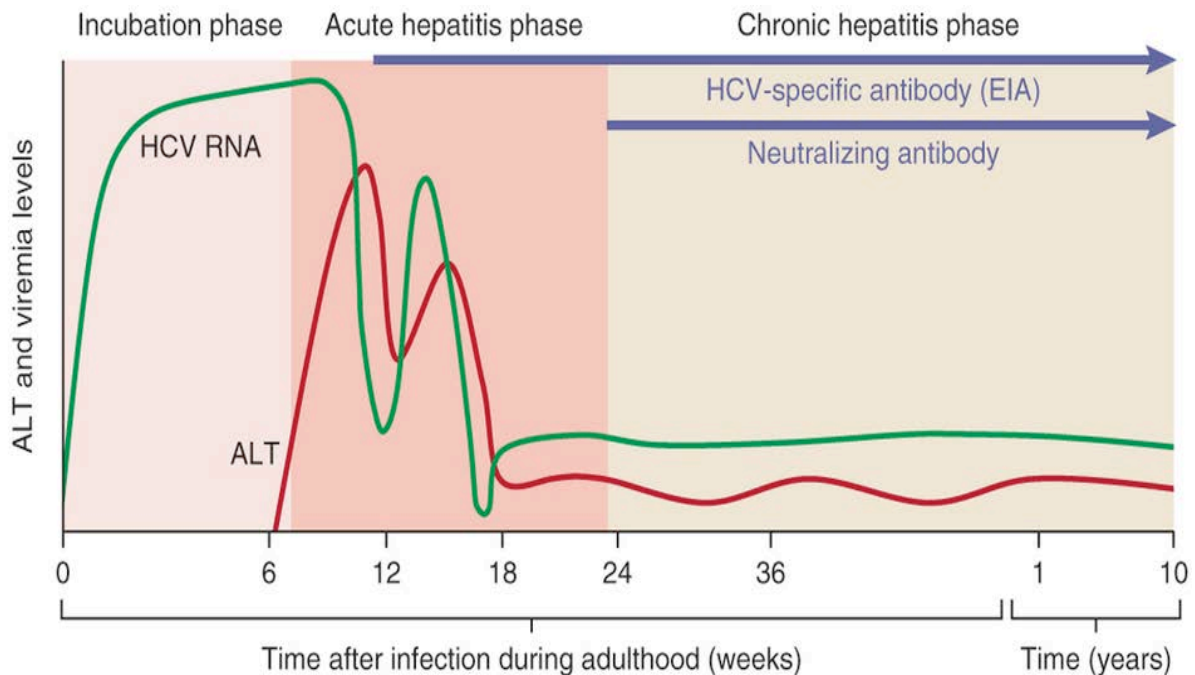


Figure 24 : Schéma de la réponse immunitaire humorale au cours des phases aiguë et chronique de l'infection par le VHC : Le taux d'ARN sérique du VHC atteint un pic durant la phase d'incubation (durant cette phase les enzymes hépatiques ALT sont normales), puis commence à décroître au cours de la phase aiguë de l'infection (moment où les ALAT sont à leur plus haut niveau). Au cours de la phase chronique de l'hépatite, le taux d'ARN du VHC reste élevé. 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 2013).

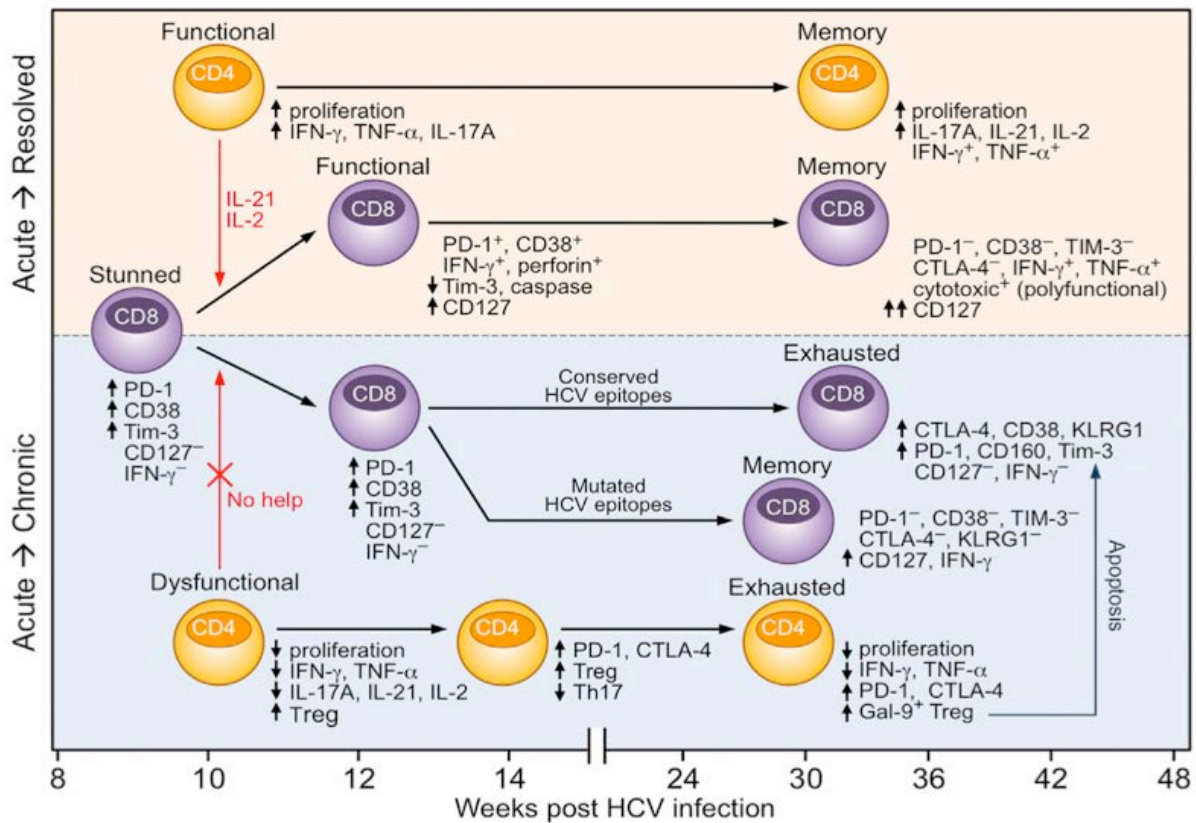
### L'immunité cellulaire

Le haut niveau de réplication du VHC lui permet d'échapper à la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Une réponse efficace contre le VHC est difficile à obtenir, compte tenu des constantes modifications du génome du VHC. Une pression de sélection est appliquée par le système immunitaire sur les variantes virales, elle est plus forte durant la phase aiguë de l'infection et diminue lors de la phase chronique (Rehermann 2009). Le turnover des virions est rapide (une  $\frac{1}{2}$  vie d'environ 3h et approximativement  $10^{12}$  virus produits par jour chez une personne infectée). On estime qu'il existe plus de 100 quasi-espèces du VHC. Une variabilité aussi importante requiert une surveillance immunitaire efficace, afin de permettre le

développement d'une réponse antivirale contre les nouveaux variants (Castello, Scala et al. 2010).

Au cours de la phase aigüe de l'infection, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la réplication virale chez les patients qui ont une guérison spontanée ; en effet, ces patients ont une meilleure prolifération des lymphocytes T ainsi qu'une meilleure production d'IL-2, d'IFN<sub>γ</sub>, et de TNF-α que les patients qui vont développer une infection chronique (Urbani, Amadei et al. 2006, Smyk-Pearson, Tester et al. 2008). Par contre, même après un contrôle précoce de l'infection par les cellules CD4<sup>+</sup>, la perte de cette réponse CD4<sup>+</sup> a été associée à une réapparition de la virémie et au développement d'une infection chronique (Gerlach, Diepolder et al. 1999, Semmo, Day et al. 2005). En effet, les phénomènes de guérison spontanée sont associés à la présence d'une forte activité Th1 dirigée contre différentes protéines virales (Core, NS3, NS4 et NS5), ainsi qu'à une forte activité Th17 (Kared, Fabre et al. 2013). Au contraire, une réponse CD4 (Th1, Th17) inexistante ou de faible amplitude, et une augmentation de l'expression des molécules de la régulation de la réponse immunitaire comme le TIM-3 (T-cell Immunoglobuline domain and Mucin domain 3), le PD-1, et le CTLA-4 sont associées à un mauvais pronostic, ou à une rechute (Gerlach, Diepolder et al. 1999). Il a été noté chez ces patients une augmentation des Treg qui expriment le Galectine-9 (Gal-9) et une augmentation des concentrations plasmatiques de Gal-9 (Kared, Fabre et al. 2013), sachant que la liaison de Gal-9 avec TIM-3 inhiberait les cellules Th17 productrices de l'IL-21. (Figure 25). Les cellules CD8, quant à elles, ne sont pas impliquées dans l'éradication de virus au début de la phase aigüe de l'infection (Thimme, Oldach et al. 2001, Urbani, Amadei et al. 2006).





**Figure 25 : Réponses immunitaires adaptatives associées à des évolutions différentes de l'infection virale :** une réponse CD4+ forte et maintenue semble être un facteur crucial pour le résultat de l'infection par VHC. (Haut) en présence de cette réponse, les cellules CD8+ acquièrent des fonctions effectrices multiples. (Bas) en l'absence ou la perte d'une réponse CD4+ forte, les cellules CD8+ vont développer des phénotypes épuisés, qui sont attribués à la stimulation chronique et spécifique des Ag (Park and Rehermann 2014).

L'infection chronique par le VHC est associée à une activation continue et une altération de fonction des lymphocytes T spécifiques du virus (Wedemeyer, He et al. 2002, Cox, Mosbrugger et al. 2005). Ceci est lié à la stimulation antigénique chronique qui induit une activation persistante des cellules T et est suivi par une perte de leur fonction, elles perdent au début leur capacité à sécréter de l'IL-2, suivie par une perte de la cytotoxicité, de la production de TNF- $\alpha$ , et enfin de la production de l'IFN- $\gamma$  (Wherry, Blattman et al. 2003). De la même manière, les cellules CD4+ et CD8+ spécifiques du VHC perdent presque toutes leurs fonctions effectrices sauf une faible production de l'IFN- $\gamma$  (Urbani, Amadei et al. 2006). Les cellules T expriment le PD-1 suite à la stimulation antigénique chronique par le VHC et sa liaison avec son ligand PD-L1 exprimée par plusieurs types cellulaires dans le foie tels que les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kuppfer, les cellules étoilées, et les hépatocytes exposés à l'IFN de type-1. Cette liaison PD-1 et PD-L1 a pour conséquence d'inhiber les fonctions effectrices et d'induire l'apoptose des lymphocytes T (Kasprowicz,



Schulze Zur Wiesch et al. 2008). Mais cette perte de fonction semble être réversible *in vitro* en utilisant des anticorps bloquant PD-1 sur les lymphocytes spécifiques du VHC isolés à partir du sang de patients (Nakamoto, Kaplan et al. 2008), ou en bloquant CTLA-4 en plus du PD-1 sur les lymphocytes intra-hépatiques isolées de biopsies provenant de patients chroniquement infectés par le VHC (Nakamoto, Cho et al. 2009).

Serra et al. ont suggéré que l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe E2 avec la molécule CD81 des lymphocytes T, conduisait au développement d'une réponse cellulaire Th2, aux dépens de la réponse Th1. Ceci pourrait aussi expliquer la persistance virale et l'inflammation hépatique observée chez les patients chroniquement infectés par le VHC (Serra, Nuti et al. 2008).

Par ailleurs, une présentation chronique des antigènes du VHC par les cellules B et les monocytes infectés pourrait participer à la tolérance immunitaire du VHC et donc à sa persistance (Castello, Scala et al. 2010). En effet, la quantité d'IL-10, cytokine immunosuppressive, est augmentée lors de l'infection chronique par le VHC (Piazzolla, Tortorella 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 stimulation par 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 diminue 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 antivirale (Rehermann 2009).

### **Les lymphocytes T régulateurs et le VHC :**

Souvent, le VHC persiste malgré une réponse immunitaire importante à la fois humorale et cellulaire. Les mécanismes responsables du dysfonctionnement de la réponse immunitaire et par conséquent, la chronicité de l'infection, commencent à être élucidés, et des études ont suggéré une contribution des Treg CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Sugimoto, Ikeda et al. 2003, Aandahl, Michaelsson et al. 2004, Accapezzato, Francavilla et al. 2004).

Les Treg sont importants pour contrôler la balance entre une réponse immunitaire inflammatoire nocive et une réponse antivirale efficace capable d'éliminer l'infection virale. Les Treg contrôlent la réponse immunitaire par plusieurs mécanismes tels que l'inhibition de

la maturation des CPA, et l'activation des cellules effectrices (Shevach 2009). L'infection par le VHC augmente le pourcentage de Treg périphériques indépendamment de l'évolution de l'infection (Manigold, Shin et al. 2006), mais cette augmentation est plus importante au cours de l'infection chronique (Sugimoto, Ikeda et al. 2003, Boettler, Spangenberg et al. 2005, Rushbrook, Ward et al. 2005).

Les Treg périphériques, chez des patients présentant une infection chronique par le VHC et un taux d'Alanine Amino Transfères (ALT) normal versus élevé, ont été analysés et leur activité suppressive sur les cellules CD4<sup>+</sup> spécifiques du VHC évaluée. Ces Treg produisent une quantité importante de TGF- $\beta$ , peu d'IL-10, et pas d'IL-2 ni d'IFN- $\gamma$  (Bolacchi, Sinistro et al. 2006, Itose, Kanto et al. 2009). La déplétion des Treg des PBMC *in vitro* augmente la prolifération de cellules spécifiques du VHC chez les patients ayant un niveau normal d'ALT (Sugimoto, Ikeda et al. 2003, Cabrera, Tu et al. 2004, Boettler, Spangenberg et al. 2005, Bolacchi, Sinistro et al. 2006, Itose, Kanto et al. 2009), alors que, l'addition de Treg purifiés dans la culture cellulaire supprime l'effet des cellules T effectrices de manière dose-dépendante. Ceci suggère un rôle important des Treg au cours de l'évolution vers la chronicité. Une augmentation significative des marqueurs des Treg et des Tr1, proportionnelle à la fibrose hépatique, a été observée chez les patients VHC<sup>+</sup> cirrhotiques ou présentant un CHC quand ils étaient comparés aux patients sans lésions hépatiques (Delhem, Cottrez et al. 2008).

Une étude récente vient confirmer le rôle de l'environnement dans le développement et la fonction des Treg. En effet, les foies cirrhotiques de patients VHC positifs ou présentant un CHC sont, respectivement, modérément et très infiltrés par les Treg, en revanche, les foies patients non-cirrhotiques contiennent seulement de faibles quantités de Treg qui expriment peu d'OX40 et qui produisent plus d'IFN- $\gamma$ . Cette différence d'infiltration semble contrôlée par l'expression d'OX40 par les Treg et de son ligand. Cette capacité d'adaptation des Treg pourrait favoriser l'évolution vers la chronicité de l'infection VHC, mais aussi limiter les dégâts tissulaires médiés par la réponse immunitaire après le contrôle de l'infection (Piconese, Timperi et al. 2014). Une autre étude évalue l'importance des interactions entre le VHC et les cellules hépatiques sur le développement des Treg qui favoriseraient l'évolution vers la chronicité. Les hépatocytes infectés par le VHC et mis en co-culture avec des cellules CD4<sup>+</sup>, induisent le développement des Treg exprimant Gal-9 et le TGF- $\beta$  qui en se liant à TIM-3 sur

les cellules CD4<sup>+</sup> favorisent le développement des Treg et inhibent les cellules Th1 (Ji, Ma et al. 2013).

Le VHC pourrait aussi être directement responsable du recrutement des Treg sur le site de l'infection, car les chimiokines CCL17 et CCL22 sont augmentées dans le foie des patients chroniquement infectés par le VHC et ayant un CHC (Riezu-Boj, Larrea et al. 2010).

La présence d'autres sous-population régulatrices au sein du foie pourrait aussi jouer un rôle dans la maîtrise de la réponse immunitaire et la protection du parenchyme hépatique d'un coté, et dans la persistance de l'infection virale de l'autre coté. C'est le cas des cellules régulatrices CD8<sup>+</sup> qui produisent de l'IL-10 mais pas d'IFN $\gamma$  et qui ont été identifiées dans le foie de patients chroniquement infectés par le VHC (Abel, Sene et al. 2006, Rehermann 2009).

Beaucoup d'études montrent l'implication des Treg dans le développement de l'infection par le VHC. La présence soutenue de ces cellules chez les patients chroniquement infectés par rapport aux patients qui ont résolu l'infection ainsi que l'augmentation de leur fréquence dans le micro environnement cirrhotique ou tumoral, sont des arguments en faveur d'un rôle de ces cellules dans la progression de la maladie hépatique (Park and Rehermann 2014).

## **La Transplantation Hépatique et la récurrence virale C**

La TH est l'unique traitement de la cirrhose décompensée, en particulier virale C et un des meilleurs traitements du CHC. Cependant, la persistance du VHC et l'infection du greffon après TH est universelle (Balbi, Leal et al. 2009). La récurrence de la fibrose est accélérée, conduisant à la cirrhose dans 10 à 30 % des cas, 5 ans après la TH (Curry 2004). L'impact de la persistance du VHC sur les résultats à long terme, après TH est très variable. Une étude récente a montré que la survie est réduite s'il y a une récurrence histologique de l'hépatite C dans les 6 mois qui suivent la transplantation. Il a également été montré que la survie à cinq ans des patients et du greffon est inférieure chez les patients transplantés pour VHC, par rapport aux patients transplantés pour une autre cause. De plus l'infection virale, persistante après TH est à l'origine de la réinfection du greffon, et est caractérisée par une progression rapide et importante de la fibrose et un développement accéléré de la cirrhose. La sévérité de la réinfection du greffon semble plus importante en cas de génotype-1b. Plusieurs études ont tenté d'expliquer les facteurs immuns impliqués dans la progression accélérée des lésions en

cas de récurrence. Les cellules immunitaires peuvent être à l'origine de la réinfection du greffon car elles pourraient représenter un réservoir pour le VHC (Pham and Michalak 2008). Plusieurs facteurs sont associés à la sévérité de la récurrence après TH (Rodriguez-Luna and Douglas 2004). Ces facteurs peuvent être classés dans trois groupes :

- Facteurs liés au receveur : l'âge, le sexe féminin, la race, la sévérité de la pathologie avant TH, la co-infection par VIH ou VHB, et le niveau de la réponse immunitaire.
- Facteurs liés au donneur : l'âge du donneur.
- Facteurs liés au virus : la virémie au moment de la transplantation et le génotype du virus (pronostic moins bon est associé au génotype 1).

Mais, les mécanismes responsables de la fibrogenèse accélérée après TH sont mal compris. Plusieurs études ont tenté d'expliquer ce phénomène, et une attention particulière a été retenue envers le système immunitaire naturel et acquis, suggérant que la récurrence de la maladie hépatique est associée à une diminution des cellules dendritiques myéloïdes et une réponse T CD4, T CD8 déficiente, de plus, le traitement immunosuppresseur représente un facteur de risque supplémentaire (Demirkiran, Kok et al. 2006). La défaillance de la réponse cellulaire CD4 et CD8 antivirale est probablement associée à une action des Treg. Nous avons vu que les organismes pathogènes sont capables d'exploiter les Treg afin de créer un environnement immunologique favorable à l'échappement de la réponse immunitaire, et au développement des infections chroniques.

Il a été montré que les Treg sont augmentés chez les patients atteints de récurrence virale C par rapport aux transplantés VHC-. En effet, ces patients qui ont la récurrence virale C représentent des taux de Treg similaires à ceux observés chez les patients chroniquement infectés par le VHC non transplantés, sans faire de distinction selon le degré de sévérité de la récurrence. (Perrella, Arenga et al. 2009). Notre équipe a montré que les Treg sont significativement augmentés après TH chez les patients VHC positifs par rapport aux patients VHC négatifs. De plus, nous avons montré que les cellules Tr1 (CD49b, CD18) sont significativement surexprimées chez les patients présentant une récurrence sévère par rapport aux patients avec récurrence minimale ou VHC négatif (Carpentier, Conti et al. 2009) dans le foie et en périphérie, à 5 ans après TH, mais aussi à un an après la TH et cela pourrait donc être prédictif de la progression de la maladie. L'IL10 aussi est augmentée dans le foie et le sérum des patients avec une évolution sévère. Ceci suggère un rôle des Treg et Tr1 dans l'échec de la réponse

immunitaire après TH, des Treg fonctionnels peuvent donc jouer un rôle dans le contrôle de la réponse antivirale Th1 (Cabrera, Tu et al. 2004, Perrella, Arenga et al. 2009).

En résumé, le système immunorégulateur, probablement sous l'influence des traitements immunosuppresseurs, est altéré au cours de la récurrence virale C après TH ce qui influence la progression de la maladie virale. Il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes d'action des Treg chez les patients transplantés hépatiques pour cirrhose virale C afin de pouvoir mieux contrôler la récurrence de la maladie après TH.

## **Objectifs de la thèse**

Les résultats de la TH se sont considérablement améliorés et la survie à long terme fait partie des préoccupations des transplantateurs. Elle dépend de la survenue de rejet, de la récurrence de l'hépatite C, du traitement immunosuppresseur et de ses complications. Le portage du VHC est fréquent chez les candidats à la TH, et près de 30% des patients sont porteurs au moment de l'inscription en liste d'attente en Europe. Après TH, l'infection du greffon par le VHC est constante, et l'évolution de l'hépatite chronique est plus rapide et plus agressive que chez les non transplantés, et la survie de ces patients est diminuée par rapport aux autres indications. Le rejet aussi, reste une cause de dysfonction du greffon dans toutes les transplantations d'organe solide. Le développement spontané d'un état de tolérance chez certains receveurs indique qu'il existe des mécanismes immunorégulateurs naturels.

L'implication des Treg a été suggérée à la fois dans la persistance de l'infection par le VHC en supprimant la réponse T VHC-spécifique, et dans l'induction de tolérance après transplantation d'organe. De plus, le nombre et la fonction des Treg sont très probablement influencés par le traitement immunosuppresseur, et en particulier par les inhibiteurs de la calcineurine. Leur rôle après TH pourrait, d'une part être bénéfique dans l'induction de tolérance ce qui permettrait la diminution voire l'arrêt des immunosuppresseurs, mais d'autre part, être délétère en favorisant l'infection VHC et la progression de la fibrogénèse. L'évaluation des Treg et en particulier des Tr1a été peu étudiée après TH au cours de la récurrence virale C.

Dans ce contexte multifactoriel, mon travail de thèse se focalise sur le rôle des cellules Treg dans l'évolution de l'hépatite C, et sur les effets des différents traitements utilisés (immunosuppresseur et anti VHC) sur les cellules Treg et leurs fonctions régulatrices.

Dans la première étape de mon travail de thèse, je me suis intéressé au rôle des Treg et en particulier des Tr1 au cours de la réponse au traitement antiviral après TH.

J'ai ensuite étudié l'implication des Treg, des Tr1, des Th1 et TH17 dans la progression de la récurrence virale C après TH, en les évaluant précocement après TH et en suivant les patients au moins un an pour évaluer la progression de la maladie.

Dans un troisième travail, j'ai analysé l'effet des inhibiteurs de mTOR (Sirolimus ou

Everolimus) sur la population Treg comparé aux traitements par anticalcineurine.

Enfin dans le dernier travail, je me suis intéressé à l'effet *in vitro* de la CsA et du Tac sur les Treg.

# Résultats



## **Premier article :**

La cirrhose post-hépatique C est une des principales indications de la TH. Il a été démontré que Th1 et les CTL sont impliqués dans les lésions hépatiques médiées par le VHC (Kamal, Graham et al. 2004). La réinfection du greffon est universelle après TH, et les lésions du greffon évoluent de façon accélérée, conduisant à la cirrhose chez 30% des patients dans les cinq ans (Curry 2004), la survie des patients est réduite par rapport aux autres indications (Berenguer 2002). Les mécanismes responsables de l'accélération des lésions hépatiques induites par le VHC après TH sont mal compris.

La clairance virale semble être associée à des réponses CD4+ et CD8+ antivirales persistantes (Thimme, Oldach et al. 2001), mais les micro-organismes pathogènes sont capables de profiter des cellules Treg pour créer un environnement favorable à l'échappement à la réponse immunitaire. Beaucoup d'attention a été portée récemment sur la contribution des Treg à l'hépatite C. Il a été montré que les Treg sont capables d'inhiber la réponse immunitaire antivirale et donc pourraient favoriser la persistance virale (Boettler, Spangenberg et al. 2005, Rushbrook, Ward et al. 2005). Chez les patients chroniquement infectés, les cellules Tr1 qui sécrètent l'IL10, se trouvent dans la circulation avec les cellules Th1 qui produisent l'IFN $\gamma$ , les deux types cellulaires reconnaissent les mêmes épitopes viraux (MacDonald, Duffy et al. 2002), ce qui suggère que les cellules Tr1 pourraient également être impliquées dans la pathogenèse du VHC.

Notre équipe a déjà évalué l'expression et l'activité des Treg, ainsi que leur possible implication dans la progression accélérée de la récurrence du VHC après TH. Les résultats de ce premier travail avaient suggéré que les Treg étaient significativement augmentés dans la récurrence de l'hépatite C, et que les cellules Tr1 étaient spécifiquement augmentées dans les formes sévères. De plus, les taux sériques d'IL-10, caractéristique du sous-type Tr1, étaient augmentés chez les patients avant une récurrence sévère, comparés aux patients ayant une récurrence modérée du VHC et pouvaient donc être prédictifs de l'évolution de la récurrence (Carpentier, Conti et al. 2009).

Dans ce travail, nous avons analysé la corrélation entre les Treg (et en particulier des cellules Tr1) et la réponse au traitement antiviral après TH. Pour la première fois, nous avons montré que les niveaux de Tr1, évalués par l'expression du marqueur de surface CD49b dans le sérum, les PBMC, ou le foie avant l'introduction de la thérapie antivirale, étaient

significativement plus faibles chez les patients qui auront une réponse virologique soutenue (RVS). Comme la détermination de CD49b dans le sérum semble être un facteur prédictif de la réponse au traitement, ce nouvel outil pourrait être utile dans la sélection des patients transplantés hépatiques qui auraient besoin d'un traitement antiviral plus précoce et plus intense.

Research Article

## CD49b, a Major Marker of Regulatory T-Cells Type 1, Predicts the Response to Antiviral Therapy of Recurrent Hepatitis C after Liver Transplantation

Stenard Fabien,<sup>1,2</sup> Morales Olivier,<sup>3</sup> Ghazal Khaldoun,<sup>2</sup> Viallon Vivian,<sup>4</sup>  
Aoudjehane Lynda,<sup>2</sup> Ouaguia Laurissa,<sup>3</sup> Goormachtigh Gautier,<sup>3</sup> Calmus Yvon,<sup>1,2</sup>  
Delhem Nadira,<sup>3</sup> and Conti Filomena<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre de Transplantation Hépatique, Pôle Digestif, APHP, Hôpital Saint Antoine, 184 Rue de Faubourg Saint Antoine, 75012 Paris, France

<sup>2</sup> UPMC Université Paris 6, Inserm, UMR\_S938, Centre de Recherche Saint Antoine, 75012 Paris, France

<sup>3</sup> UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, 59028 Lille, France

<sup>4</sup> Unité de Biostatistique, Hôpital Cochin, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Correspondence should be addressed to Delhem Nadira; [nadira.delhem@ibl.fr](mailto:nadira.delhem@ibl.fr) and Conti Filomena; [filomena.conti@sat.aphp.fr](mailto:filomena.conti@sat.aphp.fr)

Received 30 April 2013; Revised 8 October 2013; Accepted 14 October 2013; Published 19 January 2014

Academic Editor: Kenichi Harada

Copyright © 2014 Stenard Fabien et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The TRANSPEG study was a prospective study to assess the efficacy of antiviral therapy in patients with a recurrent hepatitis C virus (HCV) after liver transplantation. The influence of regulatory T-cells (Tregs) on the response to antiviral therapy was analyzed. Patients were considered as a function of their sustained virological response (SVR) at 18 months after treatment initiation. A transcriptomic analysis was performed to assess Treg markers (Tr1 and FoxP3<sup>+</sup>) in serum, PBMC, and liver biopsies. 100 patients had been included in the TRANSPEG study. Data from 27 of these patients were available. The results showed that the expression of CD49b (a predominant marker of Tr1) before the introduction of antiviral therapy was significantly associated with SVR. Responders displayed lower serum levels of CD49b than nonresponders ( $P < 0.02$ ). These findings were confirmed in PBMC and liver biopsies even if in a nonsignificant manner for the limited number of samples. The assessment of CD49b levels is thus predictive of the response to antiviral therapy. This data suggests that CD49b may be a marker of the failure of the immune response and antiviral therapy during HCV recurrence. The assessment of CD49b could help to select patients who require earlier and more intensive antiviral therapy.

### 1. Introduction

Cirrhosis due to hepatitis C virus (HCV) is becoming the main indication for liver transplantation (LT). Cumulative studies have revealed that HCV is not directly cytopathic to hepatocytes [1]. It has been demonstrated that T helper-1 lymphocyte (Th1) or cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses are critically involved in HCV-mediated liver injury [2]. HCV infection of the graft is universal, and graft damage is often accelerated, leading to cirrhosis in 30% of patients within five years [3], and reduced patient survival compared to other indications [4, 5]. The mechanisms of accelerated HCV-induced liver damage after LT are poorly understood.

Viral clearance seems to be associated with persistent CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> antiviral responses [6]. Strong Th1 activity, specific to Core, NS3, NS4, and NS5 proteins, is associated with spontaneous recovery [7], whereas a weak or non-persistent CD4 response is associated with a poor outcome [8]. The role of CD8<sup>+</sup> T cells during acute infection has been clearly demonstrated [9]. Much attention has recently focused on regulatory T-cells (Tregs) and their contribution to HCV disease. The classic CD25<sup>+</sup> Treg population, which accounts for 5–10% of peripheral CD4<sup>+</sup> T-cells, constitutively expresses CD25 [10] and can suppress host immune responses in the setting of autoimmune diseases, transplantation, and antitumour immunity [11, 12]. Treg also constitutively

expresses surface markers such as the glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related Gene, GITR (CD133) [13], cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 CTLA4 (CD152) [14], and the transcription factor Foxp3, which is characteristic of this subpopulation [15]. Other subpopulations of regulatory T-cell subsets, such as IL-10-secreting Tr1 cells that express CD18 and CD49b [16, 17], and TGF- $\beta$ -secreting Th3 cells [18] have also been described.

There is some evidence to suggest that pathogens can exploit Treg to create a favourable immunological environment in order to escape an adequate immune response. In chronic HCV infection, the activation of virus-specific T-cells may be suppressed by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, which might contribute to the inadequate immune response to HCV. An increased frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells was recently found in the blood of patients with persistent HCV infection, compared with those who had cleared HCV [19, 20]. The *in vitro* depletion of CD25<sup>+</sup> T-cells results in increased HCV-specific T-cell responsiveness. It has been proposed that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells contribute to HCV persistence by suppressing HCV-specific T-cell responses [21, 22]. Some studies have also shown a correlation between a reduced HCV-specific T-cell response and the secretion of TGF- $\beta$  by liver-infiltrating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cells [19], and regulatory T-cells are able to inhibit HCV-specific T-cell activity, independently of IL-10 and TGF- $\beta$  [20, 21]. However, it has also been shown that functional Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs are detectable during both persistent HCV infection and after recovery, suggesting that they are part of the normal immune response to this pathogen [22]. In chronically infected patients, IL-10 secreting Tr1 cells circulate concomitantly with interferon (IFN)  $\gamma$ -secreting Th1 cells, and these two subtypes of CD4 T-cells recognize the same epitopes on HCV core protein [23], suggesting that Tr1 cells may also be implicated in HCV pathogenesis. In the postorgan transplant setting, numerous experimental studies have demonstrated that Tregs induce allograft tolerance [24, 25]. Tregs are influenced by immunosuppressive therapy; in particular, calcineurin inhibitors reduce Treg function *in vitro* [26]. It has also been shown that Treg levels fall significantly after LT, especially during allograft rejection [16, 27], and that the reduction in circulating Tregs is counterbalanced by an intragraft accumulation [28]. We recently evaluated the expression and activity of regulatory T-cells and their potential involvement in the accelerated progression of recurrent hepatitis C after LT. Our results suggested that classical CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs were significantly enhanced in recurrent hepatitis C and that Tr1 cells were specifically enhanced in severe recurrent hepatitis C [29]. We also found that serum IL-10 levels, characteristic of the Tr1 subset, were enhanced in patients prior to a severe recurrence, when compared with patients experiencing a mild recurrence of HCV [29].

In the present study, we further analyzed the potential correlation between regulatory T-cells (and particularly Tr1 cells) and the response to antiviral therapy after LT. For the first time, we have shown that Tr1 levels, as evaluated by the expression of the CD49b surface marker in serum, PBMC, or liver before the introduction of antiviral therapy,

were significantly lower in patients who would develop a sustained virological response (SVR). Since the determination of CD49b in serum seems to be predictive of treatment response, this new tool may be useful in the selection of liver transplant patients with HCV recurrence who are candidates for more intensive antiviral therapy.

## 2. Patients and Methods

**2.1. Patients.** Our study population was a cohort of 27 patients who had been included in the TRANSPEG study, which was a prospective, multicentre study (15 French centres) to assess the efficacy of antiviral therapy after LT, designed to determine whether 52 weeks of ribavirin maintenance monotherapy following 52 weeks of combination therapy procured an additional beneficial effect in recurrent HCV infection [30]; 101 adult recipients were enrolled, and all had proven chronic hepatitis with detectable serum HCV. Patients had to receive a stable calcineurin inhibitors immunosuppressive regimen. The 27 patients of 2 centres were included in this ancillary study.

The patients received peginterferon alfa-2a and ribavirin; after 52 weeks patients were randomized to receive either ribavirin or a placebo for further 52 weeks. All patients were followed up for 24 weeks after the end of therapy (Figure 1). The main time points in the analysis were baseline, 52 weeks (end of combination therapy), 78 weeks (6 months after the end of combination therapy), and 130 weeks (end of followup). The primary efficacy endpoint was a sustained virological response (SVR), defined as undetectable serum HCV, 6 months after the end of therapy.

The TRANSPEG study and the present ancillary study were approved by the Ethics Committee (CCPPRB) of Rennes (France). All patients gave their written informed consent before undergoing any protocol-related procedures.

Serum samples, available only from 27 patients enrolled in the TRANSPEG study, were evaluated for Treg transcriptomic analysis, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and liver biopsies were also available from some of these patients.

**2.2. Transcriptomic Analysis.** Transcriptomic analysis was performed on serum samples, PBMCs, and biopsies; using this technique on a large panel of genes, we had previously found a correlation between the liver, PBMC, and serum regarding the transcription of 219 genes [31]. Serum samples were analyzed at baseline, before the beginning of the treatment, at 12 months (end of the course of ribavirin and pegylated interferon), at 18 months, and at 30 months (6 months after the end of second therapeutic cycle) (Figure 1).

**2.3. RNA Extraction.** Total RNA was extracted from frozen liver biopsy samples and PBMCs using the RNeasy midi kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), as described by the manufacturer. In summary, samples were first lysed and then homogenized. Ethanol was added to the lysate to provide ideal binding conditions. The lysate was then loaded onto

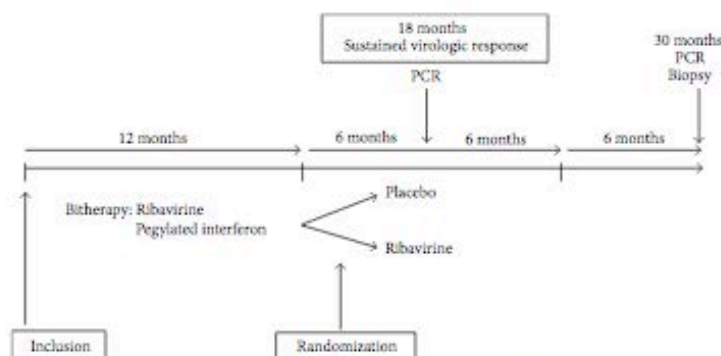


FIGURE 1: Design of the TRANSPEG study. All patients received Peginterferon alfa-2a and ribavirin. After 52 weeks of combination therapy, the patients were randomized to receive either ribavirin at the same dosage or a placebo for a further 52 weeks. All patients were followed up for 24 weeks after the end of treatment. The main time points in the analysis were: baseline, 52 weeks (end of combination therapy), 78 weeks (6 months after the end of combination therapy), and 130 weeks (end of follow-up). The primary efficacy endpoint was (1) sustained virological response, defined as undetectable serum HCV RNA. The secondary endpoints were changes from baseline histology findings as assessed by (2) the METAVIR activity and fibrosis score at 52, 78, and 130 weeks; (3) alanine aminotransferase (ALT) values over time; (4) the number of rejection episodes and the severity of rejection; (5) the occurrence of other severe antiviral-related adverse effects.

the RNeasy silica membrane for RNA binding, and all contaminants were efficiently washed away. Pure, concentrated RNA was eluted in water and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Serum mRNA extraction was achieved using the QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), as described by the manufacturer. Briefly, a serum sample was incubated with AVL buffer supplemented with Carrier RNA. After the addition of ethanol, the sample was applied to the QIAamp spin column and centrifuged. The column was then cleaned, and mRNA was eluted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to analysis.

**2.4. Reverse Transcription.** RNA was supplemented with the following mixture [oligo dT (Roche, Meylan, France) + RNAsin (PROMEGA, Charbonnières; France) +  $\text{H}_2\text{O}$ ], and then incubated at  $70^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. After further 5 minutes at room temperature, the following mixture [buffer 5X (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) + DTT (Invitrogen) + dNTPs 10 mM + RNeasy (PROMEGA) + Superscript (Invitrogen)] was added. This reaction was followed by an initial incubation step at  $45^{\circ}\text{C}$  for 60 minutes and a second incubation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. Finally,  $\text{H}_2\text{O}$  was added to obtain a concentration of 10 ng total RNA/ $\mu\text{L}$ .

**2.5. ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System.** The quantification of transcripts from liver, serum, and PBMC samples was performed using real-time quantitative RT-PCR with the ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, CA, USA). All primers were designed for real-time PCR (Table 1) and purchased from MWG-Biotech (Germany). The mix was optimized for real-time PCR analysis using SYBR Green 1 Dye, AmpliTaq Gold DNA polymerase, dNTPs with UTP, Passive Reference 1 required for signal normalization, and optimized buffer components,

in a total volume of 50  $\mu\text{L}$ . Each sample was run in a 96-well plate containing 94 primers by performing initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes, after which PCR reactions were cycled 40 times as follows: 15 seconds at  $95^{\circ}\text{C}$  and 1 minute at  $60^{\circ}\text{C}$ . Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. Melting curve analysis was performed immediately after amplification, in accordance with the manufacturer's instructions. The amplification of liver cDNA was successfully repeated twice with cDNA from the same extraction.

**2.6. Light Cycler-Based PCR Assay.** Genes whose expression level reached significance between the two groups of patients (SVR versus non-SVR) were further analyzed using light cycler-based PCR assay.

cDNA was synthesized from total RNA at a concentration of 100 ng/ $\mu\text{L}$  using oligo dT primers and superscript reverse transcriptase (GIBCO BRL). The quantification of transcripts from samples was confirmed by real-time quantitative RT-PCR using the light cycler system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The PCR mixture contained the following: Taq polymerase, 1X of LightCycler-DNA master SYBRGreen 1 (Roche Diagnostics), 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{mol/L}$  of each primer, and 1  $\mu\text{L}$  of the cDNA preparation (patient cDNA samples), in a total volume of 20  $\mu\text{L}$ . Thirty-two samples were run in parallel by performing an initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 8 minutes, and then the PCR reactions were cycled 35 to 40 times as follows: 15 seconds at  $95^{\circ}\text{C}$ , 7 seconds at the appropriate annealing temperature (Table 2), and 18 to 64 seconds at  $72^{\circ}\text{C}$  according to the length of the target sequence annealing (40 s at  $58^{\circ}\text{C}$ ). Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. A melting curve analysis was performed immediately after amplification, following the manufacturer's instructions.



TABLE 1: Primer sequence used in real-time RT-PCR.

Genes	Primers
<i>FOXP3</i>	5'-TCACCTACGCCACGGTCAT-3' 5'-CACAAAGCACTTGTGCAG-3'
<i>CD18</i>	5'-ATGCTTGATGACCTCAGGAATG-3' 5'-ACGGTCTTGTCCACGAAGGA-3'
<i>CD49b</i>	5'-CAACGGGTGTGTGTTCTGACA-3' 5'-TCATCACACACAACCACAACATC-3'
<i>IL-10</i>	5'-GAGAACCAAGACCAGACAT-3' 5'-CCACGGCCTTGCTCTTGT-3'
<i>IL-10 ra</i>	5'-CCGAGAGTATGAGATTGCCATTC-3' 5'-CAGATGGTTTCCACCTGGACACA-3'
<i>CD40</i>	5'-TCCAGAACCACCCACTGCAT-3' 5'-CACC CGCAAGGAAGGCATT-3'
<i>CD40L</i>	5'-GAAAGAAAACAGCTTTGA-3' 5'-TTTTTCAGCCCACTGTAACA-3'
<i>GITR</i>	5'-TGTGTCCAGCCTGAATTCCA-3' 5'-CCGAGGCACAGTCGATACAC-3'
<i>CTLA-4</i>	5'-TTCTTCTTTCATCCCTGTCTTC-3' 5'-GAGATGCATACTCACACAAA-3'
<i>PD-1</i>	5'-GCTACAACCTGGGCTGGCG-3' 5'-ATGTGTTGGAGAAGCTG-3'
<i>IL-2</i>	5'-ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTAC-3' 5'-TCCAGAGGTTTGAGTCTTCTCTAGA-3'
<i>IFN-γ</i>	5'-ATGTAGCGGATAATGGAATC-3' 5'-GACATTCAAAGTCAGTTACC-3'
<i>TGF-β</i>	5'-CGAGCCTGAGGCCGACTAC-3' 5'-CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA-3'
<i>CD25</i>	5'-GGGACTGCTCACGTTTCATCA-3' 5'-TTCAACATGGTTTCTTCTTGTAG-3'
<i>CD4</i>	5'-GGAAATCAGGGCTCCTTCT-3' 5'-TGGTCCCAAAGGCTTCTTCT-3'
<i>IL-4</i>	5'-CACAAAGCAGCTGATCCGATTC-3' 5'-TCCAAGAAGTTTCCAACGTA-3'
<i>β-ACTINE</i>	5'-AGCCACACGCAGCTCATTG-3' 5'-CACGGCATCGTCACCAACT-3'

2.7. *Primers.* All primers were designed for real-time PCR use and were purchased from MWG-Biotech (Table 2). The housekeeping genes  $\beta$ -Actin, Ubiquitin, HPRT, and G3PDH were used as controls. Genes representative of the Treg population were chosen, such as CD4, a glycoprotein predominantly found on the surface of helper T-cells, CD25, the alpha subunit of Interleukin-2 receptor, FoxP3, a member of the forkhead/winged-helix family of transcriptional regulators [32], CD127, the interleukin 7 receptor [33] that is specific to naturally occurring Treg ( $CD4^+ CD25^{high} CD127^- Foxp3^+$ ), CD18, the integrin beta chain beta 2 [18], and CD49b, an integrin alpha subunit specific of Tr1 cells [34].

2.8. *Cytometric Bead Array (CBA).* To detect cytokines in the serum samples from our patients, the BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA) was used, as described by the manufacturer. The CBA assay permits simultaneous cytometric quantification of multiple cytokines in a sample by capturing them to spectrally distinct beads. Seven bead populations with distinct

TABLE 2: Demographic data of the cohort.

Characteristics	Distribution
Cohort study	27 patients
Inclusion date	August 2002 to January 2004
Time after transplant (year)*	3 (1, 8)
Age at selection*	56 (27, 68)
Gender	
Male	20
Female	7
	Gen 1: $n = 18$ (67%), Gen 2: $n = 1$ (4%)
HCV genotype**	Gen 3: $n = 5$ (18%), Gen 4: $n = 3$ (11%)
Immunosuppression	Tacrolimus: $n = 16$ (59%) Cyclosporine: $n = 11$ (41%)
	F1: $n = 15$ F2: $n = 8$ F3: $n = 3$ F4: $n = 1$
Metavir F score at inclusion	
Prothrombin time (%)	
Mean	90 $\pm$ 9
Median (min; max)	90 (59; 107)
AST/ALT (UI/L)	
(mean)	75 $\pm$ 45/100 $\pm$ 60
(median, min; max)	58 (24; 196)/82 (32; 293)
Bilirubin blood level at inclusion ( $\mu$ mol/L)	15.7 $\pm$ 10.2
Viral load (log)	6.59 $\pm$ 0.24

\*Median value (min, max)

\*\* $n$  = number of patients.

fluorescence intensities were coated with capture antibodies specific for IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-17A proteins. Human TH1/TH2/TH17 cytokine standards were reconstituted for 15 min in assay diluents, according to the manufacturer's immunofluorescence staining protocol. For all cytokine calibrator standards, serial dilutions were performed so that the serum was mixed with each human cytokine-capture bead combination, and then further incubated together with both the PE detection reagent and standard dilutions for 3 h at room temperature. The samples were then analyzed with a CANTO flow cytometer [35], using FCAP Array software to generate the results. Specific controls containing FITC- and PE-conjugated antibodies were supplied by the manufacturer [35] and were performed before each experiment.

2.9. *Data Interpretation and Statistics.* PCR results were analyzed using the "Relative Gene Expression Method," as described elsewhere [33]. Briefly, individual CT values were normalized using the average CT values for housekeeping genes ( $\Delta CT = CT - CT_{HKG}$ ). Average  $\Delta CT$  values for each group were then compared with the  $\Delta CT$  values of the control group (S group) using Wilcoxon-Mann-Whitney statistics. Statistical tests associated with  $P$  values lower than 0.05 were considered to be significant. For relevant genes, binary prognostic tests for the response to antiviral therapy

were constructed. To do this, optimum cut-off values were determined according to Youden's index. The sensitivity and specificity of these tests were then computed. It should be recalled that in this setting, sensitivity was defined as the probability of a positive test at J0 for responders (at M18), while specificity was the probability of a negative test at J0 for nonresponders (at M18). Statistical analyses were performed using SAS software, version 9.1.

### 3. Results

**3.1. Characteristics of the Study Population.** The study cohort comprised 27 patients from the 101 patients included in the TRANSPEG study that was designed to evaluate antiviral therapy in recurrent hepatitis C. Serum samples for the Treg analysis, and clinical data collected during the TRANSPEG study, were available for all of these 27 patients. Table 2 shows the demographic parameters of this population of 20 men and 7 women, with a median age of 56 years. METAVIR scores for fibrosis were distributed as follows: F1 in 15 patients, F2 in 8 patients, and F3, F4 in 3 and 1 patients, respectively. The patients were split into two groups in terms of their response to the primary criteria of the Transpeg protocol, that is, their virological response at 18 and 30 months (M) after inclusion. 62% of the 27 patients available were virological responders at M18 and continued to display a virological response at M30 (Table 3). These rates were similar to those obtained for all the patients included in the Transpeg study. Because the SVR rates were identical at M18 and M30, we therefore considered SVR as the virological response obtained at M18 and analyzed the parameters relative to this response. Furthermore, as in the whole Transpeg study, maintenance therapy with ribavirin alone did not improve either the virological response or the histological parameters (data not shown). The characteristics of patients in both groups (responders and non-responders) at M18 are shown in Table 3, Viral load, METAVIR score for fibrosis, immunosuppressive therapy, and donor age were similar in the two groups.

**3.2. Serum Gene Expression of T Regulatory Markers at Baseline.** The serum expression of classic Treg markers was similar in patients with and without SVR (data not shown).

By contrast, Tr1 levels, as assessed by the expression of the CD49b surface marker, were significantly associated with SVR. Indeed, at baseline, serum CD49b gene expression levels (relative expression:  $-2.93$  CD49b [min; max:  $-11.29$ ;  $1.56$ ]) were significantly lower in patients who would develop SVR when compared to non-responders (relative expression:  $-0.21$  CD49b [min, max:  $-5.29$ ;  $+21.9$ ],  $P < 0.02$ ) (Figure 2(a)).

Using an optimum cutoff of relative expression of  $-1.40$ , the sensitivity of CD49b  $< -1.40$  to predict SVR was 0.917 (92%) (0.646–0.985), the specificity was 0.583 (58%) (0.320–0.807), and the area under ROC Curve was 0.771 (95% CI: 0.576–0.966).

The serum expression of other Tr1 markers did not differ significantly between SVR and non-SVR patients. Nevertheless, although it was not significant, the relative expression

of *IL-10* and *CD18* gene expressions was lower in patients who would develop SVR  $+1.99$ , (95%, 0.27; 753) and  $+1.89$  (95%, 0.31; 4.99) than in non-responders  $+3.61$  ( $-2.01$ ;  $+8.91$ ),  $P = 0.09$  and  $+2.75$  ( $-1.28$ ;  $+5.34$ ),  $P = 0.008$ , respectively.

Results were confirmed by the light cycler-based PCR assay (Figure 2(b)).

**3.3. Baseline Gene Expression of CD49b in PBMC.** PBMCs were only available from ten of the study patients. As with serum transcriptional analysis, the results of PBMC mRNA analysis using the light cycler system revealed a lower CD49b gene expression in patients with SVR, but the difference was not significant ( $P = 0.06$ ) (Figure 2(c)).

**3.4. Baseline Gene Expression of CD49b in Liver Biopsy.** Like the findings in serum and PBMC, the CD49b gene expression levels obtained in seven biopsy samples obtained from the study groups using the light cycler system were lower in the responder group than in the non-responder group ( $P = 0.07$ ) (Figure 2(d)).

**3.5. Peripheral Gene Expression of T Regulatory Markers at M12.** The relative expressions of the same genes were also analyzed at 12 months (end of first course of antiviral therapy and time of randomization for the second course), and we looked for a correlation between the level of expression and the outcome of treatment, namely, SVR at 18 and 30 months. Using the ABI PRISM<sup>R</sup> 7000 Sequence Detection System again, we found no association between the levels of all genes analyzed at 12 months and SVR at 18 and 30 months.

**3.6. Cytometric Bead Array (CBA) at Baseline.** Cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNE, IFN- $\gamma$ , and IL-17A) were also assessed using the Cytometric Bead Array technology in sera from the 27 patients. None of these cytokine levels reached statistical significance regarding a prediction of the response to antiviral therapy; nevertheless, although it was not statistically significant, for IL-10, serum concentration was lower in patients who would develop SVR ( $15 \pm 5$  ng/mL) when compared to nonresponders ( $22 \pm 12$  ng/mL,  $P = 0.075$ ) (data not shown).

### 4. Discussion

We had recently observed that Treg markers were significantly enhanced in recurrent hepatitis C after LT and that Tr1 cell levels were specifically elevated in severe recurrent hepatitis C when compared to in mild recurrence [29]. The present study analyzed the potential correlation between regulatory T-cells, particularly Tr1, and the response to antiviral therapy after LT. This cohort study was extracted from a prospective clinical study designed to evaluate the treatment of recurrent HCV in liver transplant recipients. Serum samples were only available from 27 of the 101 patients included, but all data collected before, during, and after antiviral therapy were available for these patients. Initial

TABLE 3: Characteristics of responder and nonresponder groups at 18 months.

Characteristics	Responder (PCR < 0) N = 16	Nonresponder (PCR > 0) N = 11	P
% of patients	62%	38%	
Age (years)	54 ± 13	57 ± 7	0.53
Weight (kg)	74.7 ± 12.7	80.3 ± 14.3	0.39
HCV genotype	Gen 1: n = 10 (62%) Gen 2: n = 1 (6.5%) Gen 3: n = 4 (25%) Gen 4: n = 1 (6.5%)	Gen 1: n = 8 (73%) Gen 2: n = 0 Gen 3: n = 1 (9%) Gen 4: n = 2 (18%)	
Basal Creatinine (μmol/L)	21.8 ± 24.9	103.3 ± 39.9	0.26
Cyclosporin/Tacrolimus	6 (46%)/7 (54%)	3 (38%)/5 (62%)	
Use of EPO	All patients	All patients	
Viral load (log)	6.22 ± 0.59	6.75 ± 0.42	0.54
METAVIR score (n)	F1 (10) F2 (5) F3 (1) F4 (0)	F1 (5) F2 (3) F3 (2) F4 (1)	
Donnor age > 40	55%	58%	NS

experiments were performed on sera; this choice was deliberate although not optimum, because more serum samples than PBMC were available from the TRANSPREG patients. The data obtained with the ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System was validated using the light cycler-based PCR assay in sera, PBMC, and biopsies.

The findings of this study show for the first time that serum Tr1 gene expression levels, assessed from the expression of the surface marker CD49b before the introduction of antiviral therapy, were predictive of an SVR in patients with recurrent hepatitis C after LT. This result was confirmed in PBMC and liver biopsies obtained from the same patients, even if not statistically significant due to the poor number of samples. Patients with low Tr1 cell levels at baseline had a greater chance of a successful virological response than those with high Tr1 levels. Because HCV genotypes 1 and 4 are more resistant to antiviral therapy than 2 and 3, we checked that the predictive effect of CD49b on SVR was independent of the HCV genotype. It remains to be determined whether low Tr1 levels are constitutive or due to the patient's individual response to immunosuppressive therapy. Treg levels (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) have already been evaluated during antiviral HCV therapy, and it has been suggested that they could predict the result of combination therapy [36]. We did not obtain this result in liver transplant recipients, probably because immunosuppressive therapy exerts a strong inhibitory effect on classical Tregs.

We hypothesize that Tr1 CD49b<sup>+</sup> cells play a role in failure of the immune response during HCV recurrence after liver transplantation and may also participate in the failure of antiviral therapy. CD49b assessment in serum is predictive of the response to antiviral therapy. This new tool may help to select liver transplant recipients with HCV recurrence as candidates for more intensive antiviral therapy. This is an important finding because a recurrence of HCV infection is

almost universal after LT, leading to accelerated disease when compared to that seen in immunocompetent patients [37] and to impaired patient and allograft survival [38], although some patients experience slow and progressive disease [35]. Moreover, pegylated interferon and ribavirin combination therapy in the transplant population is associated with serious adverse effects and a risk of rejection, with a sustained virological response rate reported as ranging from 26% to 48% [39, 40]. For this reason, antiviral therapy should be preferentially recommended in patients whose disease progression is highly predictive.

T-regulatory cells work, firstly, towards achieving tolerance of the graft [41] and secondly may enhance the severity of viral recurrence [42]. Our findings agree with these statements so that a patient with high Tr1 levels may appear to be at a greater risk of developing severe recurrent hepatitis C and with less chance of being treated effectively.

In the present study, CD49b was the only gene characterizing the Tr1 cell population as being associated significantly with the outcome of antiviral therapy. CD18, another specific marker for Tr1, was associated with CD49b in our previous study [29], but in this case CD18 was not associated with the outcome of antiviral therapy, even if we have obtained a non significant higher relative gene expression of CD18 marker in non responder patients compared with responder ones. However, CD18 is a less specific marker of Tr1 than CD49b and it is expressed by numerous cell populations. In Tr1 cells, only a strong expression of CD18 is associated with CD49b expression [18, 34, 43]. Serum CD18 levels could have been influenced in different cell types by a variety of factors resulting in dissociation from CD49b, thus explaining why the difference between the low and high expression of CD18 was not discriminately identified by PCR analysis. Although these data are encouraging, we acknowledge several limitations concerning the validation of CD49b expression level



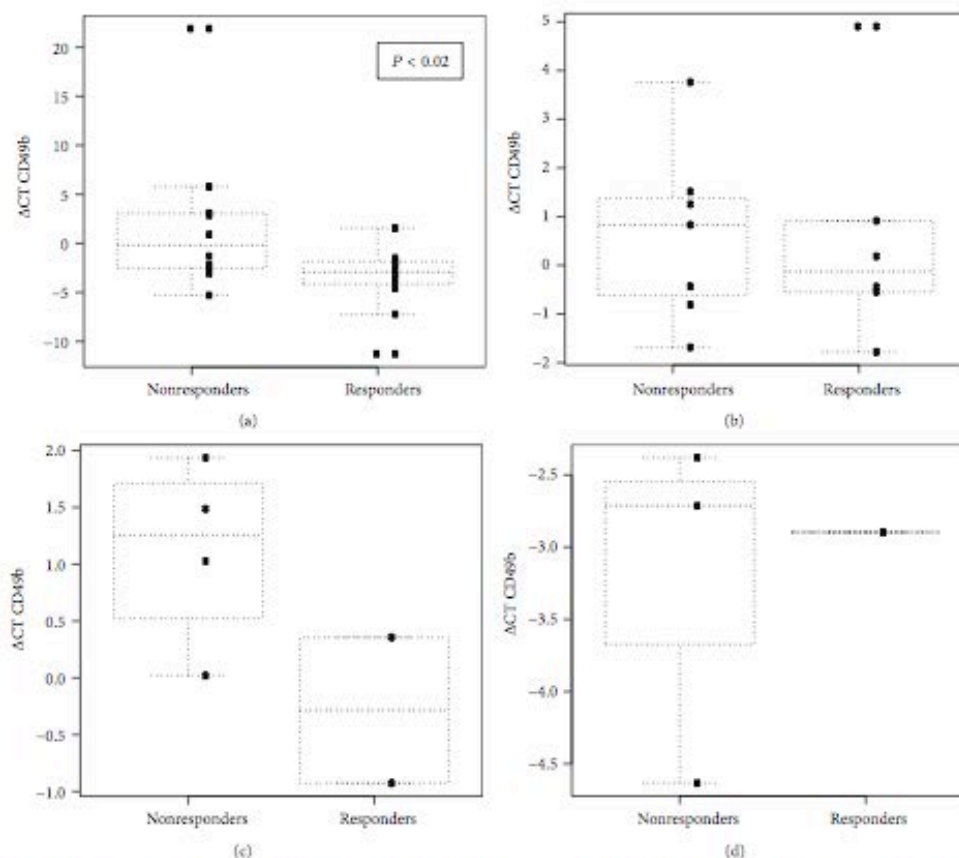


FIGURE 2: Relative expression of the CD49b marker using RT-PCR in responder and nonresponder groups. The responder group was defined by undetectable HCV RNA in peripheral blood, 18 and 30 months after beginning of the treatment (6 months after end of pegylated interferon + Ribavirin). (a) RT-PCR results obtained with Abi prism on sera from the patients. (b) RT-PCR results obtained with the light cycler in order to confirm Abi prism results on patient sera. (c) Results of RT-PCR on PBMC. (d) Results of RT-PCR on graft biopsies. Data are expressed as box plots in which the horizontal lines indicate the 25th, 50th, and 75th percentiles of the frequencies of the relative expression of CD49b, as measured by RT-PCR. The vertical lines represent the 10th and 90th percentiles.

by complementary techniques. However, we can reasonably assume that the result obtained by RT-QPCR on serum RNA concerning CD49b level could be relevant in the context of the liver tissue. Indeed, it should be noted that a preliminary study from our team [29] has already established a closed correlation between the CD49b gene expression in the serum and the expression level of CD49b in the liver.

Moreover, because of the lack of numerous samples, it was not possible in this transcriptomic analysis to establish correlation between the different compartments studied, namely, serum, PBMC, and liver. However, we can assume that this correlation exists, since we published a previous study in which gene transcription was compared in 219 selected genes involved in the pathogenesis of HCV infection between sera,

PBMCs, and liver samples collected simultaneously from five patients infected chronically. After amplification, significant correlations were observed between liver versus serum; liver versus PBMCs; and serum versus PBMCs [31]. In addition, a prospective trial is currently under way to confirm these data and to add functional assays, but the results will not be available for several years.

In conclusion, our results showed that the relative gene expression of CD49b was predictive of an SVR to treatment in the TRANSPEG study group. It is already well described in the literature that HCV genotypes 1 and 4 are more resistant to antiviral therapy than genotypes 2 and 3. We therefore verified whether this could influence our analysis, and if the difference shown was only due to responder genotypes,

but in fact most of the responders were of genotypes 1 and 4. As expected, Tr1CD49b<sup>+</sup> cells were predictive factors for a treatment response but there was no correlation with the HCV genotype.

Thus, Tr1 CD49b<sup>+</sup> cells appear to play a role in failure of the immune response to HCV during its recurrence after LT and may also participate in the failure of antiviral therapy. Determining serum CD49b levels is predictive of the response to antiviral therapy. This new tool could be of value to select liver transplant recipients experiencing HCV recurrence as candidates for earlier and more intensive antiviral therapy. Further research is required to confirm these findings and particularly to verify whether CD49b is an independent predictive factor of response to antiviral therapy.

### Abbreviations

HCV: Hepatitis C virus  
 LT: Liver transplantation  
 Th1: T helper 1  
 Treg: regulatory T-cell  
 Tr1: Type 1 regulatory T-cell  
 SVR: Sustained virological response  
 PBMC: Peripheral blood Mononuclear cell  
 HCC: Hepatocellular carcinoma  
 CNi: Calcineurin inhibitors  
 Tac: Tacrolimus.

### Conflict of Interests

The authors of this paper have no conflict of interests to disclose.

### Authors' Contribution

Stenard Fabien, Morales Olivier, Ghazal Khazal, Laurissa Ouaguia, and Aoudjehane Lynda performed the research; Viallon Vivian performed statistical analysis; Calmus Yvon, Delhem Nadira, and Conti Filomena designed research; Conti Filomena and Delhem Nadira wrote the paper and contributed equally to this work. Stenard Fabien; and Morales Olivier contributed equally to this work.

### Acknowledgments

This work received support from the Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les Hépatites (ANRS) and Stenard Fabien received a support from the Société Francophone de Transplantation (SFT). This work was supported by SIRIC ONCOLille.

### References

- [1] F. Negro and A. Hadengue, "Therapy of chronic hepatitis B," *Revue Medicale Suisse*, vol. 2, no. 77, pp. 1981–1985, 2006.
- [2] S. M. Kamal, C. S. Graham, Q. He et al., "Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)—specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in

- HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 189, no. 7, pp. 1140–1150, 2004.
- [3] M. P. Curry, "Hepatitis B and hepatitis C viruses in liver transplantation," *Transplantation*, vol. 78, no. 7, pp. 955–963, 2004.
- [4] E. Velidedeoglu, K. C. Mange, A. Frank et al., "Factors differentially correlated with the outcome of liver transplantation in HCV<sup>+</sup> and HCV<sup>-</sup> recipients," *Transplantation*, vol. 77, no. 12, pp. 1834–1842, 2004.
- [5] M. Berenguer, M. Prieto, F. San Juan et al., "Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients," *Hepatology*, vol. 36, article 202, 2002.
- [6] R. Thimme, D. Oldach, K. Chang, C. Steiger, S. C. Ray, and F. V. Chisari, "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 10, pp. 1395–1406, 2001.
- [7] J. T. Gerlach, H. M. Diepolder, M.-C. Jung et al., "Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in acute hepatitis C," *Gastroenterology*, vol. 117, no. 4, pp. 933–941, 1999.
- [8] S. Tsai, Y. Liaw, M. Chen, C. Huang, and G. C. Kuo, "Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity," *Hepatology*, vol. 25, no. 2, pp. 449–458, 1997.
- [9] M. Murata, S. Nabeshima, N. Maeda, H. Nakashima, S. Kashiwagi, and J. Hayashi, "Increased frequency of IFN- $\gamma$ -producing peripheral CD8<sup>+</sup> T cells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C," *Journal of Medical Virology*, vol. 67, no. 2, pp. 162–170, 2002.
- [10] A. O'Garra and P. Vieira, "Regulatory T cells and mechanisms of immune system control," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 8, pp. 801–805, 2004.
- [11] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, J. Shimizu et al., "Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance," *Immunological Reviews*, vol. 182, pp. 18–32, 2001.
- [12] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases," *Journal of Immunology*, vol. 155, no. 3, pp. 1151–1164, 1995.
- [13] J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi, "Stimulation of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 2, pp. 135–142, 2002.
- [14] B. Birebent, R. Lorho, H. Lechartier et al., "Suppressive properties of human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression," *European Journal of Immunology*, vol. 34, no. 12, pp. 3485–3496, 2004.
- [15] S. Hori, T. Nomura, and S. Sakaguchi, "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3," *Science*, vol. 299, no. 5609, pp. 1057–1061, 2003.
- [16] M. E. Morgan, J. H. M. van Bilsen, A. M. Bakker et al., "Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans," *Human Immunology*, vol. 66, no. 1, pp. 13–20, 2005.
- [17] H. Groux, A. O'Garra, M. Bigler et al., "A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis," *Nature*, vol. 389, no. 6652, pp. 737–742, 1997.

- [18] M. Rahmoun, A. Foussat, H. Groux, J. Pène, H. Yssel, and P. Chanez, "Enhanced frequency of CD18- and CD49b- expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 140, no. 2, pp. 139–149, 2006.
- [19] H. L. Weiner, "Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells," *Immunological Reviews*, vol. 182, pp. 207–214, 2001.
- [20] R. Cabrera, Z. Tu, Y. Xu et al., "An immunomodulatory role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection," *Hepatology*, vol. 40, no. 5, pp. 1062–1071, 2004.
- [21] S. M. Rushbrook, S. M. Ward, E. Unitt et al., "Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during persistent hepatitis C virus infection," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7852–7859, 2005.
- [22] T. Boettler, H. C. Spangenberg, C. Neumann-Haefelin et al., "T cells with a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during chronic hepatitis C virus infection," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7860–7867, 2005.
- [23] A. J. MacDonald, M. Duffy, M. T. Brady et al., "CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 185, no. 6, pp. 720–727, 2002.
- [24] M. M. Velásquez-Lopera, V. L. Eaton, N. M. Lerret et al., "Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells," *Transplant Immunology*, vol. 19, no. 2, pp. 127–135, 2008.
- [25] O. Joffre, T. Santolaria, D. Calise et al., "Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes," *Nature Medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 88–92, 2008.
- [26] R. Zeiser, V. H. Nguyen, A. Beilhack et al., "Inhibition of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production," *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 390–399, 2006.
- [27] A. Demirkiran, A. Kok, J. Kwekkeboom et al., "Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation," *Liver Transplantation*, vol. 12, no. 2, pp. 277–284, 2006.
- [28] F. Stenard, C. Nguyen, K. Cox et al., "Decreases in circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells and increases in intra-graft FOXP3<sup>+</sup> cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients," *Pediatric Transplantation*, vol. 13, no. 1, pp. 70–80, 2009.
- [29] A. Carpentier, F. Conti, F. Stenard et al., "Increased expression of regulatory tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 9, no. 9, pp. 2102–2112, 2009.
- [30] Y. Calmus, C. Duvoux, G. Pageaux et al., "Treatment of recurrent HCV infection following liver transplantation: results of a multicenter, randomized, versus placebo, trial of ribavirin alone as maintenance therapy after one year of PegIFNalpha-2a plus ribavirin," *Journal of Hepatology*, vol. 57, p. 564, 2012.
- [31] A. Carpentier, F. Conti, M. Carrière et al., "Analysis of gene transcription in sera during chronic hepatitis C infection," *Journal of Medical Virology*, vol. 81, no. 3, pp. 473–480, 2009.
- [32] X. Zhou, S. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker, and J. A. Bluestone, "Plasticity of CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T cells," *Current Opinion in Immunology*, vol. 21, no. 3, pp. 281–285, 2009.
- [33] A. H. Banham, "Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells," *Trends in Immunology*, vol. 27, no. 12, pp. 541–544, 2006.
- [34] L. Charbonnier, L. M. Van Duivenvoorde, F. Apparailly et al., "Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b<sup>+</sup> regulatory T cells," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 6, pp. 3806–3813, 2006.
- [35] R. J. Firpi, M. F. Abdelmalek, C. Soldevila-Pico et al., "One-year protocol liver biopsy can stratify fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C infection," *Liver Transplantation*, vol. 10, no. 10, pp. 1240–1247, 2004.
- [36] M. Akiyama, T. Ichikawa, H. Miyaaki et al., "Relationship between regulatory T cells and the combination of pegylated interferon and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis type C," *Intervirology*, vol. 53, no. 3, pp. 154–160, 2010.
- [37] C. Feray, L. Caccamo, G. J. M. Alexander et al., "European collaborative study on factors influencing outcome after liver transplantation for hepatitis C," *Gastroenterology*, vol. 117, no. 3, pp. 619–625, 1999.
- [38] L. M. Forman, J. D. Lewis, J. A. Berlin, H. I. Feldman, and M. R. Lucey, "The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation," *Gastroenterology*, vol. 122, no. 4, pp. 889–896, 2002.
- [39] J. Dumortier, J. Scoazec, P. Chevallier, and O. Boillot, "Treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation: a pilot study of peginterferon alfa-2b and ribavirin combination," *Journal of Hepatology*, vol. 40, no. 4, pp. 669–674, 2004.
- [40] H. Rodriguez-Luna, A. Khatib, P. Sharma et al., "Treatment of recurrent hepatitis C infection after liver transplantation with combination of pegylated interferon  $\alpha$ 2b and ribavirin: an open-label series," *Transplantation*, vol. 77, no. 2, pp. 190–194, 2004.
- [41] T. Manigold and V. Racanelli, "T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 7, no. 12, pp. 804–813, 2007.
- [42] S. Smyk-Pearson, L. Golden-Mason, J. Klarquist et al., "Functional suppression by FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 197, no. 1, pp. 46–57, 2008.
- [43] L. Charbonnier, W. G. H. Han, J. Quentin et al., "Adoptive transfer of IL-10-secreting CD4<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> regulatory T cells suppresses ongoing arthritis," *Journal of Autoimmunity*, vol. 34, no. 4, pp. 390–399, 2009.

## Deuxième article :

Le virus de l'hépatite C touche 170 millions de personnes dans le monde, il donne une infection chronique dans 50 à 80% des cas (Maasoumy and Wedemeyer 2012) qui peut évoluer vers une cirrhose ou un CHC à long terme. L'infection chronique est associée à des réponses CD4 et CD8 faibles qui ne sont pas capables de contrôler la réplication virale (Gruener, Lechner et al. 2001, Wedemeyer, He et al. 2002). Ces réponses faibles sont dues, d'une part à des mécanismes d'immunosuppression tels que la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme l'IL10 et le TGF $\beta$  (Delpuech, Buffello-Le Guillou et al. 2001, De Maria, Fogli et al. 2007), à l'expression augmentée de molécules inhibitrices comme le PD-1 et le CTLA-4 (Golden-Mason, Palmer et al. 2007, Nakamoto, Cho et al. 2009), et d'autre part à l'induction des Treg (Cabrera, Tu et al. 2004). Il a été montré que les Treg sont capables d'inhiber la réponse immunitaire antivirale et donc de favoriser la persistance du virus (Boettler, Spangenberg et al. 2005, Rushbrook, Ward et al. 2005). La déplétion des Treg *in vitro* semble augmenter la réponse T anti-VHC (Boettler, Spangenberg et al. 2005).

Au sein du laboratoire nous avons montré que les Treg sont augmentés dans la récurrence virale C et que les Tr1 et l'IL10 sont spécifiquement augmentés dans récurrence sévère l'hépatite C (Carpentier, Conti et al. 2009). Dans le premier travail de cette thèse, nous avons également montré que les niveaux des Tr1, évalués par l'expression du marqueur de surface CD49b dans le sérum, les PBMC, ou le foie avant l'introduction de la thérapie antivirale, étaient significativement plus faibles chez les patients qui allaient développer une réponse virologique soutenue (RVS) (Stenard et al, 2013).

Dans ce travail, nous avons recherché sur les différents acteurs de la réponse immunitaire après la TH cirrhose virale C, afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'évolution de la récurrence. Nous avons évalué les cellules Treg (Treg et Tr1), Th1, Th2 et Th17 via l'expression de leur ARNm dans les PBMC venant des patients transplantés hépatiques. Les patients qui développeront une récurrence sévère présentaient un taux de Treg significativement plus élevé un mois après la TH que les patients pour lesquels l'évolution se fera vers une forme minime. L'évaluation précoce des Treg pourrait être prédictive du type de récurrence virale chez ces patients transplantés hépatiques, et aider à une meilleure prise en charge des ces patients identifiés précocement.

**Abstract : Poster in AASLD Liver Meeting 2014 (CONTROL ID: 2024619)**

**Early evaluation of regulatory T cells to predict severity of HCV recurrence after liver transplantation.**

GHAZAL Khaldoun, MORALES Olivier, AOUDJEHANE Lynda, OUAGUIA Laurissa, CALMUS Yvon, DELHEM Nadira and CONTI Filomena.

**Background:** Hepatitis C-related cirrhosis is becoming the main indication for liver transplantation (LT), but after LT, graft infection is universal and graft damage is often accelerated, leading to cirrhosis in 30% of patients within five years, and reduced patient survival compared to other indications. The aim of our study is to assess the possibility of early implication of regulatory T-cell subsets, and T helper 1, 2 and 17 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation.

**Methods:** Twenty liver transplant recipients were classified into severe recurrence group (n=9) vs. mild recurrence group (n=13) according to the results METAVIR analysis on one year liver biopsy (mild: F<1, severe F≥ 1). Then Forty four key molecules, related to Treg, T helper 1, 2 and 17 responses, were analysed by using qRT-PCR analysis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), obtained before and one month after transplantation of every patient.

**Results:** One month after LT, the relative expression of nTreg cells associated markers like CD4, IL2 receptor subunit  $\alpha$  (CD25), Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), the cytotoxic T lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4), the Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3, the T-box transcription factor (TBX21/T-bet), and the two subunits of the IL-10 receptor (IL-10R $\alpha$  and  $\beta$ ) were all significantly more expressed in the PBMC samples at one month after LT in patients who would develop a severe recurrence.

Our results demonstrated a significant increase in mRNA levels of Treg markers early after liver transplantation (day 30) in patients with severe evolution of HCV recurrence. Th1 markers, which could be implicated in antiviral response, were also elevated in same group. This suggests that Treg cells may play a role in the suppression of an antiviral response, early after liver transplantation.

**Conclusion:** Our findings showed that Tregs are enhanced, early after liver transplantation, in patients who will develop a severe HCV recurrence. High levels of Treg might be predictive of severe recurrence, patients with this high expression warrant more intensive management.

**Early levels of regulatory T cells may predict progression of recurrent hepatitis C after liver transplantation.**

GHAZAL K<sup>1,2</sup>, MORALES O<sup>3</sup>, BARJON C<sup>1,2</sup>, DAHLQVIST G<sup>1,4</sup>, AOUDJEHANE L<sup>5</sup>, OUAGUIA L<sup>3</sup>, CALMUS Y<sup>1,2,6</sup>, DELHEM N<sup>3\*</sup>, and CONTI F<sup>1,2,6\*</sup>.

\*FC and ND contributed equally to this work.

1- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75005, Paris, France

2- INSERM, UMR\_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France

3- UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59028 Lille, France

4- Cliniques Universitaires Saint-Luc, 1200 Woluwe-Saint-Lambert, Belgium.

5- Human HepCell, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

6- AP-HP, Hôpital Saint Antoine, Centre de Transplantation Hépatique, F-75012, Paris, France

**Corresponding author: Dr Filomena Conti:** Centre de Transplantation Hépatique, Hôpital Saint Antoine, 184 rue de Faubourg Saint Antoine, 75012 Paris, France.

Tel: + 33 1 71 97 01 67, Fax: + 33 1 71 97 01 57; Email: [filomena.conti@sat.aphp.fr](mailto:filomena.conti@sat.aphp.fr)

**Running title: Tregs predict HCV recurrence progression**

**Keywords:** liver transplantation, hepatitis C, regulatory T cells, Tr1, HCV recurrence.

**List of abbreviations:**

HCV: Hepatitis C Virus; LT: Liver Transplantation; Th1: T Helper 1; Th2: T Helper 2; Th17: T Helper 17; nTreg: natural Regulatory T-cell; Tr1: Type 1 Regulatory T-cell; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear cell, IL: Interleukin, GITR: glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor receptor Family-Related Gene; TGF $\beta$ , PD-1: Programmed death-1; CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4; Lag-3: lymphocyte activation gene; IFN : Interferon; TBX21/Tbet: T-box transcription factor; Tac : tacrolimus (Tac), ATG: antithymocyte; MMF: mycophenolate mofetil.



**Abstract :**

Failure of the immune response against hepatitis C virus (HCV) has been associated with increased regulatory T cells (Treg) activity. After liver transplantation (LT) 80% of patients have an accelerated progression of recurrence of hepatitis C. The aim of this work was to assess the involvement of Tregs, T helper (Th) 1, 2 and 17 cells in recurrent hepatitis C.

Peripheral blood cells obtained before and one month after LT from 22 recipients have been analysed. Forty-four key molecules, related to Treg, Th1, 2 and 17 responses, were evaluated using qRT-PCR analysis. Liver recipients were classified in two groups according to graft fibrosis evaluated by the METAVIR score on the biopsy performed one year after LT (mild:  $F \leq 1$ , severe:  $F > 1$ ). The results of patients that will develop a severe recurrence were compared to those obtained in patients with a mild recurrence.

mRNA levels of Treg markers obtained one month after LT were significantly increased in patients with a severe evolution when compared to patients with mild recurrence. Markers of the Th1 response were elevated in the same group. No differences in markers obtained before LT were observed.

These suggest that Treg may play a role in the suppression of the early antiviral response, leading to severe recurrence.

### Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infects over 170 million people worldwide and chronic infection occurs in 50-80% of cases (1) and leads to cirrhosis and hepatocellular carcinoma; furthermore cirrhosis due to HCV is one of the main indications for liver transplantation (LT). When chronic infection is established, HCV infection induces a wide range of chronic liver injuries but does not appear to be cytopathic. Liver lesions appear to result from locally driven immune responses, which are mainly non-specific. Local inflammation triggers fibrogenesis, in which hepatic stellate cells play a major role (2). Mechanisms by which HCV evade to the immune surveillance system remain unclear and persistent infection appears to be due to weak CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses during acute infection, which fail to control viral replication (3, 4). The impairment of T cell responses is multifactorial (5), including skewed T-cell differentiation (T helper1 (Th1) deficiency, Th2 dominance) (6), elevated secretion of inhibitory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) and TGF- $\beta$  which create an immunosuppressive environment (7, 8), an upregulation of inhibitory pathways (Programmed death-1 (PD-1), Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4, CD152)) (9, 10), an impairment of allostimulatory capacity of both myeloid and plasmacytoid dendritic cells (11) and an induction of regulatory T cells (Tregs) (12). Attention has recently focused on Tregs and their contribution to HCV disease. Natural Tregs account for 5-10% of peripheral CD4<sup>+</sup> T-cells, constitutively express CD25 (13), and can suppress host immune responses in the setting of autoimmune diseases, transplantation, and anti-tumor immunity (14). The accumulation of Tregs at the site of infection is a common characteristic of most chronic viral infection; they may significantly suppress antiviral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses (15, 16). Tregs also constitutively express surface markers such as the glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor receptor Family-Related Gene, (GITR, CD133) (17), CTLA4 (18) and the transcription factor Foxp3, which is characteristic of this subpopulation (19). Other subsets of regulatory T-cells are present, such as IL-10-secreting Tr-1 cells that express CD18, CD49b and lymphocyte activation gene (LAG-3) (20-22).

In chronic hepatitis C virus (HCV) infection, the activation of virus-specific T-cells may be suppressed by Tregs (23), which might contribute to the inadequate immune response to HCV. An increased frequency of Tregs was found in the blood of patients



with persistent HCV infection, compared with those who had cleared HCV (12). The *in vitro* depletion of CD25<sup>+</sup> T-cells results in increased HCV-specific T-cell responsiveness, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells may contribute to HCV persistence by suppressing HCV-specific T-cell responses (24). Some studies have also shown a correlation between a reduced HCV-specific T-cell response and the secretion of TGF- $\beta$  by liver-infiltrating Tregs (25), and that regulatory T-cells are able to inhibit HCV-specific T-cell activity, independently of IL-10 and TGF- $\beta$  (26). In chronically infected patients, IL-10 secreting Tr1 cells circulate concomitantly with interferon (IFN) $\gamma$ -secreting Th1 cells, and these two subtypes of CD4 T-cells recognize the same epitopes on HCV core protein (27), suggesting that Tr1 cells may also be implicated in HCV pathogenesis.

After LT for HCV cirrhosis, graft infection is universal and graft damage is often accelerated, leading to cirrhosis in 30% of patients within five years, and reduced patient survival compared to other indications (28, 29). The mechanisms of accelerated HCV-induced liver damage after LT are poorly understood. Virus and host immune system as well as donor's age and graft ischemia might be involved in the prognosis of viral recurrence. From an immunological point of view, a weak or a decreased CD4<sup>+</sup> immune response as well as reduced plasmacytoid and myeloid dendritic cells could facilitate hepatitis C recurrence (30, 31).

Moreover, in the post-transplant setting, numerous experimental studies have demonstrated that Tregs induce allograft tolerance (32). Tregs are influenced by immunosuppressive therapy; in particular, calcineurin inhibitors reduce Treg function *in vitro* (33, 34) while rapamycin seems to have a beneficial effect on the Treg count (35). We recently demonstrated that classical CD4CD25<sup>+</sup> Treg levels were significantly higher in patients with recurrent hepatitis C, and that Tr1 cells and serum IL10 levels were higher at 1 and 5 years after LT in severe recurrent hepatitis C and were associated with a more severe progression of recurrence and lower response to antiviral therapy (36, 37).

In the present study, we further analyzed the correlations between Tregs and Tr1, but also other T cell subpopulations, very early after LT and their possible predictive value on the progression of HCV recurrence. For the first time, we have shown that mRNA levels of Treg markers within 30 days after LT were significantly higher in patients who

will develop a severe recurrence when compared to those who will develop a mild recurrence. These results suggest that Tregs are enhanced early after LT in patients who will develop severe HCV recurrence and could be predictive of HCV recurrence progression.

### **Patients and methods**

#### **Patients**

Our study population consisted of 22 patients who had been included in the BEFIRTH (Benefit of Immunoprophylaxis on Fibrosis to Reduce Viral Load After Liver Transplantation) study, an open-label randomized multicenter clinical study comparing three immunosuppressive regimens in HCV-positive recipients who received a first LT liver transplant: (A) tacrolimus (Tac) and steroids, (B) antithymocyte induction therapy (ATG) and full dose of Tac without steroids, (C) ATG with mycophenolate mofetil (MMF) and a reduced dose of Tac without steroids. The main objective of the BEFIRTH study was to evaluate HCV recurrence by fibrosis evaluation in the different groups at least one year after LT. The Ethics Committee (CCPPRB) of Toulouse (France) approved the BEFIRTH study and the present ancillary study, which evaluated the Treg subpopulations. All patients gave their written informed consent before undergoing any protocol-related procedure. PBMC samples were available only from 22 of the 80 patients enrolled in the BEFIRTH study, and were evaluated for transcriptomic analysis in the ancillary study. A liver biopsy was performed for all included recipients one year after LT. A liver biopsy was performed for all included recipients one year after LT, and patients were classified in two groups according to their METAVIR fibrosis score: mild recurrence when score was  $F \leq 1$  and severe recurrence group when fibrosis was  $>1$ . All patients had a detectable serum HCV RNA. All patients had a detectable serum HCV RNA.

#### **Transcriptomic analysis**

Transcriptomic analysis were performed on PBMC samples, which were obtained before LT and on day 30 after LT by density gradient centrifugation over Ficoll-Paque PLUS (Amersham, Piscataway, NJ), as previously described (33), and stored in liquid nitrogen for subsequent RNA extraction. Total RNA was extracted from frozen PBMCs using the RNeasy midi kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer instructions. Briefly, samples were first lysed then homogenized. Ethanol was added to

the lysate to provide ideal binding conditions. The lysate was then loaded onto the RNeasy silica membrane for RNA binding, and all contaminants were efficiently washed away. Pure, concentrated RNA was eluted in water. Total RNA quality and quantity was assessed by using NanoDrop spectrophotometer (ND-1000, Thermo Fisher scientific, MA, USA) and stored at -80°C. The same RNA concentration for all samples was used in the reverse transcription experiments.

RNA were supplemented with the following mixture [oligo dT (Roche, Meylan, France) + RNAsin (PROMEGA, Charbonnières; France) + H<sub>2</sub>O] and then incubated at 70°C for 10 minutes. After a further 5 minutes at room temperature, the following mixture [buffer 5X (Life Technologies) + DTT (Life Technologies) + dNTPs 10 mM + RNAsin (PROMEGA) + Superscript (Life Technologies)] was added. This reaction was followed by an initial incubation step at 45°C for 60 minutes and a second incubation at 95°C for 5 minutes. Finally, ultra pure DNase/RNase-free distilled water (Life Technologies) was added to obtain a concentration of 10 ng total RNA/1µl.

Real-time PCRs were performed using a Stratagene MxPro 3005P qPCR System. The mix was optimized for real-time PCR analysis using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec) that contained: the hotstart enzyme "MeteorTaq", dNTPs with dUTP, MgCl<sub>2</sub>, in a total volume of 20 µl. Each sample was run in a half 96-well plate containing 47 primers by performing initial denaturation at 95°C for 5 minutes, after which PCR reactions were cycled 45 times as follows: 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. Melting curve analysis was performed immediately after amplification, in accordance with the manufacturer's instructions.

#### **Light Cycler-based PCR assay**

Genes whose expression level reached significance between the two groups of patients (mild vs. severe viral recurrence) were further analysed using Light Cycler-based PCR assay. The quantification of transcripts from samples was confirmed by real-time quantitative RT-PCR using the Light Cycler system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The PCR mixture contained the following: Fast start *Taq* polymerase, 1X of LightCycler-DNA master SYBRGreen I (Roche Diagnostics), 1,875 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µmol/L of each primer and 2 µl of the cDNA preparation (patient cDNA samples), in a total volume of 20 µl. samples were run in parallel by performing an initial denaturation at 95°C for 8

minutes, and then the PCR reactions were cycled 40 to 45 times as follows: 15 seconds at 95°C, 7 seconds at the appropriate annealing temperature, and 18 to 64 seconds at 72°C according to the length of the target sequence annealing (40s at 58° C). Fluorescence intensity was measured at the end of each elongation phase. A melting curve analysis was performed immediately after amplification, following the manufacturer's instructions.

### **Primers**

All primers were designed for real-time PCR use and purchased from MWG-Biotech. The following genes were studied (Table 1): genes representative of naturally occurring Treg cells such as CD4, CD25, Foxp3, CD18, the integrin beta chain beta 2, and CD49b; the integrin alpha subunit specific of induced Tr1; other key molecules related to Th1 anti viral responses (IFN $\gamma$ , IL-2, and IL-23), and the activation status of the immune system (CD27, CD28, CD40, CD40L). The house keeping genes ribosomal RNA 28S,  $\beta$ -actin and G3PDH were used as controls.

### **Data interpretation and statistics**

PCR results were analysed using the "Relative Gene Expression Method" as described by Livak et al (38). Briefly, individual CT values were normalised using the average CT values for house keeping genes ( $\Delta CT = CT - C_{T_{HRG}}$ ). Average  $\Delta CT$  values for each group were then compared with the  $\Delta CT$  values of the control group (mild recession group) ( $\Delta \Delta CT = \Delta CT - \Delta CT_{MRgroup}$ ). The evaluation of  $2^{-\Delta \Delta CT}$  then indicated the fold change in gene expression relative to control group.

The relevance of PCR results was validated using statistical rank sum Mann-Whitney test which was carried on the  $\Delta CT$  values, and using GraphPad Prism version 5.00 for MAC OS X, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)". *p* values <0.05 were considered as significant.

## **Results**

### **Characteristics of the study population**

The study cohort consists of 22 patients who were included in the BEFIRTH study, and clinical data collected during the BEFIRTH study were available for all of them. Table 2 shows the demographic parameters of this population of 15 men and 7 women, with a

median age of 52 years. At the liver biopsy performed one year after LT, 13 patients had mild recurrence (fibrosis score  $F \leq 1$ ) and 9 had severe recurrence (fibrosis score  $> 1$ ). Table 3 shows characteristics of patients with mild and severe recurrence; viral load, immunosuppressive regimen, donor age were similar in the two groups.

#### **Expression of the studied markers before LT**

At baseline, immediately before LT, no significant difference was observed in PBMC expression of Treg markers and all other markers studied between patients who will develop severe HCV recurrence one year after LT and patients with mild recurrence at 1 year (data not shown).

#### **Expression of Treg markers one month after LT**

At one month after LT, PBMC expression of most Treg-associated markers studied (CD4, CD25, TGF $\beta$ , CTLA-4, and the two subunits of IL-10 receptor, IL-10R $\alpha$  and  $\beta$ ) was significantly higher in patients who will develop severe HCV recurrence 1 year after LT when compared to those with mild recurrence (Figure 1a). The relative expression of CD25 and TGF $\beta$  was 2.6 fold and 5.5 fold higher in the severe recurrence group when compared to the mild recurrence group ( $p=0.045$  and  $p=0.033$ , respectively), and CTLA-4 relative expression was 4.2 fold higher ( $p=0.016$ ). A slight increase of Foxp3 was observed in the severe recurrence group but not significantly ( $p=0.181$ ) (Figure 1a). No significant difference was noticed for IL10 while the expression of both subunits of its receptor (IL10R $\alpha$ : 3.6 fold up higher, and IL10R $\beta$ : 3.3 fold higher) was significantly higher in severe recurrence ( $p=0.023$  and  $p=0.007$ , respectively). The table 4 summarizes the relative expression values for these different genes at one month after LT.

For Tr1 markers at one month post-transplant, the relative expression of CD18 was 9.8 fold higher in the severe recurrence group when compared to the mild recurrence group ( $p=0.038$ ); the same trend was observed for CD49b and LAG-3 but it was not statistically significant ( $p=0.64$  and  $p=0.54$ , respectively) (Figure 1b; Table 4).

These results were confirmed by performing the RT-PCR using the Light Cycler 480® (data not shown).

#### **Th1, Th2, and Th17 markers one month after LT**



An increased expression of Th1 markers was also observed one month after LT in PBMC from patients that will develop severe HCV recurrence one year later. The relative expression of IFN $\gamma$  was 20 times higher in the severe recurrence group when compared to the mild recurrence group ( $p=0.019$ ), and an increased expression of IL-2 and IL-23 was also observed in the severe versus mild recurrence group ( $p=0.011$  and  $p=0.039$ , respectively) (Fig2.a, Table 4). A significant increase of molecules related to the activation of Th1 cells, such as CD27, the relative expression of which was 2.6 higher in severe recurrence ( $p=0.007$ ), CD28, (12.1 higher,  $p=0.016$ ), CD40L (4.4 higher,  $p=0.016$ ) and the T-box transcription factor (TBX21/T-bet) (Figure 2a, Table 4).

In contrast, the Th2 markers (IL-4 and GATA-3) were not significantly different between the severe and mild recurrence groups, one month after LT (data not shown).

The PCR analysis of the cytokines associated with Th17 development and function showed a slight decrease of IL-6 one month after LT in the severe recurrence group and a slight increase of IL-17 without statistical significance ( $p=0.59$  and  $p=0.34$ , respectively), while IL-23, which is important for the expansion of already differentiated Th17 cells, was significantly higher in the severe recurrence group ( $p=0.039$ ) (Figure 2b).

### Discussion

It has been previously reported that Tregs are induced by HCV (39), and we had recently observed that Treg markers were significantly enhanced in recurrent hepatitis C after LT, and that Tr1 cell levels were specifically elevated in severe recurrent hepatitis C when compared to mild recurrence (36). The present study analysed the early correlation (one month after LT) between T-cell populations (Treg, Tr1, Th1, Th2, Th17) and the future development of severe recurrent hepatitis C. The cohort study was extracted from an open-label randomized multicenter clinical study comparing different immunosuppressive regimens in HCV-positive liver transplant recipients. PBMC samples were available in 22 patients included in our centre, and all data prospectively collected before, during, and after LT were available for these patients.

The findings of this study showed for the first time that PBMC mRNA Treg levels, assessed by the expression of the surface markers (CD4, CD25, CTLA-4), and molecules associated to the Treg activity such as TGF $\beta$ , GATA-3, T-bet, IL-10R $\alpha$  and  $\beta$ , obtained one

month after LT, were predictive of severe recurrence one year after LT. Patients with higher levels of Tregs one month after LT had a greater chance of developing severe recurrence of hepatitis C than those with lower Treg levels. Our finding could represent an important tool for the management of HCV recurrence, which is associated with accelerated progression of fibrosis when compared to immunocompetent patients, and with the impairment of patient and allograft survival (29, 40).

It remains to determine whether high Treg levels are constitutive or due to immunosuppression. Since no difference in Tregs levels has been found between the two groups of patients before LT, immunosuppressive regimen or the patient's individual response to immunosuppressive therapy is probably responsible for that finding. The number of Tregs before LT may depend on patient characteristics or on the severity of the disease, but it is not predictive of progression of recurrent hepatitis C.

Only a few non so specific Tr1 marker were significantly enhanced (CD4, CD28 and TGF $\beta$ ), more specific Tr1 markers like CD49b and LAG-3 were slightly but not significantly elevated one month after LT, this might be explained by the requirement of IL10 and chronic contact with the antigens for the development of Tr1 cells (21) and it could be early to detect a significant increase in these cells.

We hypothesized that Tregs play a role in the failure of the antiviral immune response during HCV recurrence after LT. Several studies focusing on HCV infection in immunocompetent patients have previously shown a correlation between peripheral Tregs and chronicity of HCV infection (12, 15, 16, 41). The role of natural or induced Tregs in HCV recurrence after LT is only suspected and we have previously shown that high levels of natural and induced Tregs one year after LT was associated with more severe fibrosis and was predictive of subsequently fibrosis progression (36), but no data was available earlier.

Interestingly, the elevated level of Treg markers in the severe recurrence group was associated with elevated expression of Th1 response markers. The concomitant increase of both Tregs and Th1 markers could be interpreted as a contradiction, and may play a role in the suppression of an efficient immune response against recurrent HCV. Our hypothesis is that during early HCV recurrence, Th1 cells are activated to inhibit HCV

infection evolution toward chronicity. In the group that will evolved to severe recurrence, Th1 were significantly increased and could induce a higher Treg response probably due to the presence of higher IL-2 levels, produced during expansion of T effector cells, but also necessary to Tregs expansion (42, 43). Then, in severe recurrent forms, Th1 and Tregs were simultaneously significantly enhanced early after LT and could be predictive of severe progression.

Th17 response markers were similar in the two groups and IL-6 was even lower in the group that will present a severe recurrence; IL-6 could favour the further development of Tregs (44).

Thus Tregs, induced by a multifactorial process, that could include a high Th1 response itself, probably play a role in the failure of successful Th1 anti-HCV response, as well as in the severity of the recurrence after LT. Early evaluation of Treg levels may be a tool to help clinicians to select liver transplant recipients for earlier and more intensive antiviral therapy. Actually, high levels of Treg might thus be predictive of severe recurrence, pointing out patients warranting more intensive management. Further research is needed with larger population and with using other techniques such as flow cytometer phenotyping in a prospective manner in order to confirm these results.



Ghazal et al

12

**Supporting information:**

**Disclosure:** The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose

**Legend Figures**

Figure 1: Relative expression results of qRT-PCR one month after LT obtained on PBMC from study patients expressed using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method with mild recurrence group as reference. The severe recurrence group was defined by METAVIR score  $F \geq 1$  at the one year follow-up biopsy. **a)** Relative expression of T regulatory cells (Tregs) associated markers. **b)** Relative expression of induced regulatory T cells (Tr1) associated markers. *(Calculation of Standard Deviation and statistics are based on the  $\Delta CT$  values) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).*

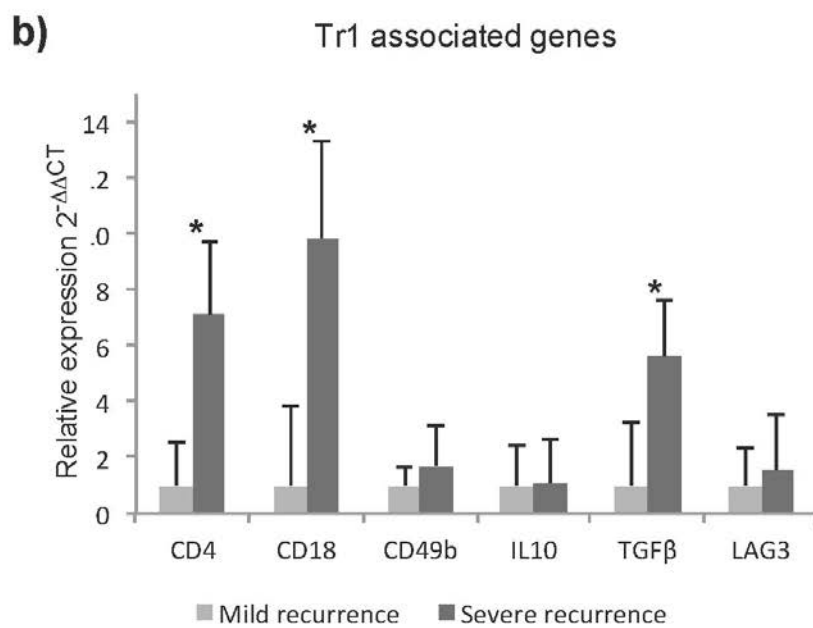
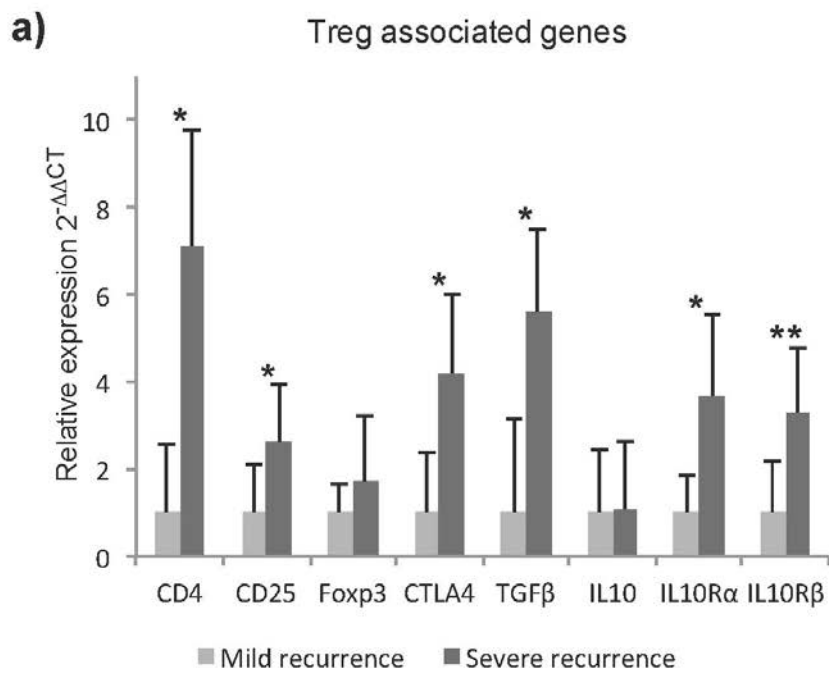
Figure 2: Relative expression of a) Th1 response, and b) Th17 associated molecules in PBMC obtained one month after LT using RT-PCR in mild and severe HCV recurrence groups. Results are expressed using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method with mild recurrence group as reference. *(Calculation of Standard Deviation and statistics are based on the  $\Delta CT$  values) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )*

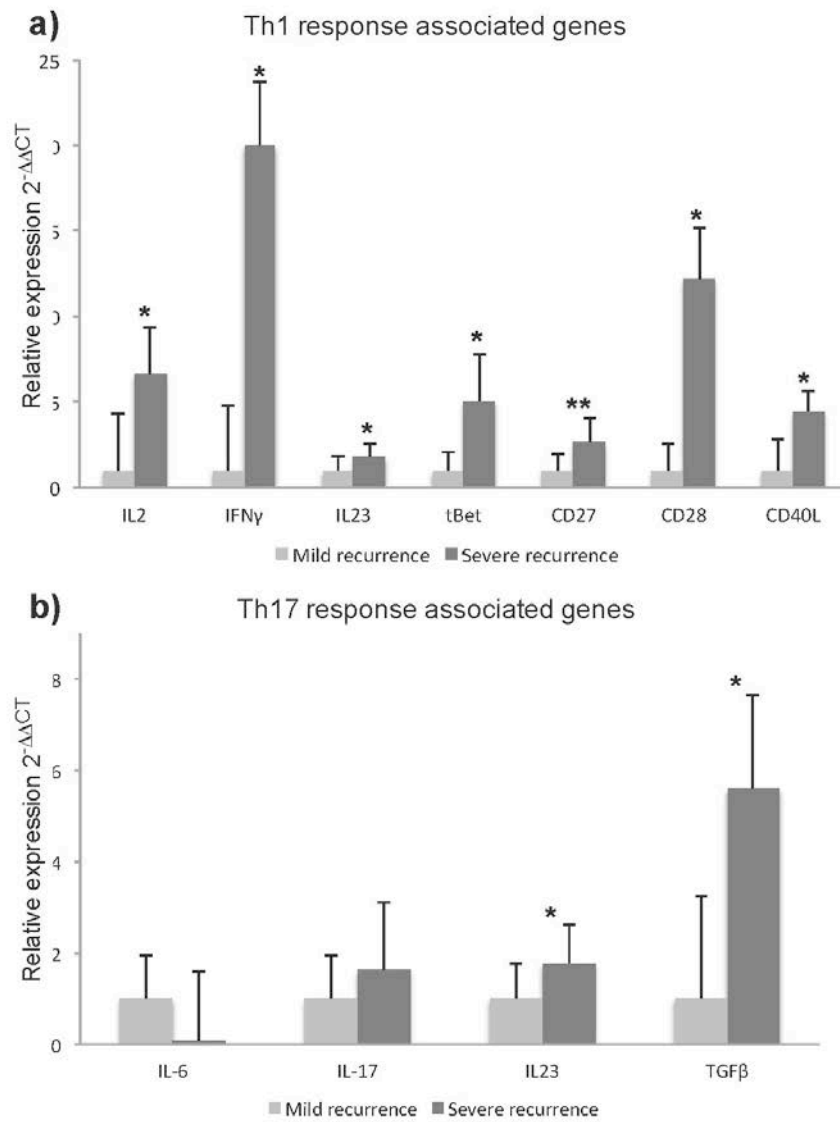
**References:**

1. Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2012; 26: 401-412.
2. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004; 12: 96-102.
3. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, et al. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol*. 2001; 75: 5550-5558.
4. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*. 2002; 169: 3447-3458.
5. Brenndorfer ED, Sallberg M. Hepatitis C virus-mediated modulation of cellular immunity. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2012; 60: 315-329.
6. Walker CM. Adaptive immunity to the hepatitis C virus. *Advances in virus research*. 2010; 78: 43-86.
7. De Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, Costa P, et al. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 445-455.
8. Delpuech O, Buffello-Le Guillou DB, Rubinstein E, Feray C, Petit MA. The hepatitis C virus (HCV) induces a long-term increase in interleukin-10 production by human CD4+ T cells (H9). *Eur Cytokine Netw*. 2001; 12: 69-77.
9. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol*. 2007; 81: 9249-9258.
10. Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, et al. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS pathogens*. 2009; 5: e1000313.
11. Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, et al. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology*. 2006; 49: 58-63.
12. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004; 40: 1062-1071.
13. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*. 2004; 10: 801-805.
14. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews*. 2001; 182: 18-32.
15. Ji XJ, Ma CJ, Wang JM, Wu XY, Niki T, Hirashima M, et al. HCV-infected hepatocytes drive CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T-cell development through the Tim-3/Gal-9 pathway. *Eur J Immunol*. 2013; 43: 458-467.
16. Keynan Y, Card CM, McLaren PJ, Dawood MR, Kasper K, Fowke KR. The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections. *Clinical infectious diseases* :

- an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2008; 46: 1046-1052.
17. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002; 3: 135-142.
  18. Birebent B, Lorho R, Lechartier H, de Guibert S, Alizadeh M, Vu N, et al. Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol.* 2004; 34: 3485-3496.
  19. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299: 1057-1061.
  20. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* 2013; 19: 739-746.
  21. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997; 389: 737-742.
  22. Rahmoun M, Foussat A, Groux H, Pene J, Yssel H, Chanez P. Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 140: 139-149.
  23. Miroux C, Vausselin T, Delhem N. Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10: 1563-1572.
  24. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2005; 79: 7860-7867.
  25. Delhem N, Cottrez F, Carpentier A, Miroux C, Morales O, Francois V, et al. Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. *Bull Cancer.* 2008; 95: 1029-1038.
  26. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, Vowler SL, Lucas M, Klenerman P, et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2005; 79: 7852-7859.
  27. MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, et al. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis.* 2002; 185: 720-727.
  28. Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society.* 2002; 8: S14-18.
  29. Velidedeoglu E, Mange KC, Frank A, Abt P, Desai NM, Markmann JW, et al. Factors differentially correlated with the outcome of liver transplantation in hcv+ and HCV-recipients. *Transplantation.* 2004; 77: 1834-1842.
  30. Schvoerer E, Thumann C, Spohrer S, Soulier E, Royer C, Brignon N, et al. Early decrease in circulating dendritic cells number after liver transplantation could favor hepatitis C virus recurrence. *Journal of medical virology.* 2006; 78: 1070-1075.
  31. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009; 30: 636-645.

32. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med.* 2008; 14: 88-92.
33. Miroux C, Morales O, Ghazal K, Othman SB, de Launoit Y, Pancre V, et al. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation.* 2012; 94: 123-131.
34. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood.* 2006; 108: 390-399.
35. Akimova T, Kamath BM, Goebel JW, Meyers KE, Rand EB, Hawkins A, et al. Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2012; 12: 3449-3461.
36. Carpentier A, Conti F, Stenard F, Aoudjehane L, Miroux C, Podevin P, et al. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2009; 9: 2102-2112.
37. Fabien S, Olivier M, Khaldoun G, Vivian V, Lynda A, Laurissa O, et al. CD49b, a major marker of regulatory T-cells type 1, predicts the response to antiviral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *BioMed research international.* 2014; 2014: 290878.
38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 2001; 25: 402-408.
39. Fernandez-Ponce C, Dominguez-Villar M, Aguado E, Garcia-Cozar F. CD4+ primary T cells expressing HCV-core protein upregulate Foxp3 and IL-10, suppressing CD4 and CD8 T cells. *PloS one.* 2014; 9: e85191.
40. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayon JM, Martinez F, Carrasco D, et al. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology.* 2002; 36: 202-210.
41. Yoshizawa K, Abe H, Kubo Y, Kitahara T, Aizawa R, Matsuoka M, et al. Expansion of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2010; 40: 179-187.
42. Kalia V, Sarkar S, Subramaniam S, Haining WN, Smith KA, Ahmed R. Prolonged interleukin-2/Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity.* 2010; 32: 91-103.
43. de Goer de Herve MG, Jaafoura S, Vallee M, Taoufik Y. FoxP3(+) regulatory CD4 T cells control the generation of functional CD8 memory. *Nature communications.* 2012; 3: 986.
44. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology.* 2010; 40: 1830-1835.





**Table 1 : Primers used in real-time RT-PCR.**

Gene	Sens	Anti-sens
<i>IL-1</i>	TAGTAGCAACCAACGGGAAGGT	TGCTCAGGAAGCTAAAAGGTGC
<i>IL-2</i>	ACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTAC	TCCAGAGGTTTGAGTTCTTCTCTAGA
<i>IL-4</i>	CACAAGCAGCTGATCCGATTC	TTCCAAGAAGTTTTCCAACGTACTC
<i>IL-6</i>	ATGTAGCCGCCCCACAGA	CCAGTGCCTCTTGCTGCTT
<i>IL-8</i>	GAGTGGACCACACTGCGCCA	TCCACAACCCCTCTGCACCCAGT
<i>IL-10</i>	GAGAACCAAGACCCAGACATCAA	CCACGGCCTTGCTCTTGTT
<i>IL12</i>	CCTFCACCACTCCAAAACCT	TGGTAAACAGGCTCCACTGT
<i>IL-15</i>	TTTCCATCCAGTCTACTTGTT	CATTACCAGTTGGCTTCTGT
<i>IL-17</i>	TCCTGGGAAGACTCATTGG	AGAATTTGGGCATCTGGATT
<i>IL21</i>	GATGCCACATGATTAGAATGC	AGGAAAAGCTGACCACTCACAGT
<i>IL-23</i>	GTGGGACACATGGATTAAGAGAA	AAATCAGACCTGGTGGATCCT
<i>IL-27</i>	GGAGGGAGTTACAGTCAGC	GGCAGGAGGTACAGGTTTAC
<i>INF-γ</i>	ATGTAGCGGATAATGGAATC	GACATCAAGTCAGTTACC
<i>TGFβ1</i>	CGAGCTGAGGCCGACTAC	CGGAGCTGTATGTGTTGAAGA
<i>CD127</i>	TGGATCGCAGATTCACTGA	CTTFACTCCACGAGGGCC
<i>IL-10Ra</i>	CCGAGAGTATGAGATTGCCATT	CAGATGGTTTCCACTGGACACA
<i>IL-10Rb</i>	TGGGAGTCACCTGCTTTTGC	TCCGTCAAGGTAGTATTTCATGCA
<i>CXCR4</i>	TCATGGTTTACCAGAAGAACTGA	GAAGTCCCAAAGTACCAGTTTGC
<i>CXCR5</i>	TACCCCTAACGCTGGAAT	AGGTGTCTTATAGTTGTCCAATCTG
<i>CCR7</i>	GAGACAACACCACAGTGGACTACAC	GTCAACAGACCAGCCATT
<i>VEGF</i>	TGCCGCCACCACCACTCAC	GCCCTCCGGACCCAAAGTGC
<i>PDGF</i>	GCCGCCAGCGCCATTTTTCATT	CTTTGCAGCGAGGCTGGAGGGT
<i>Gata3</i>	GATGGCAGGGACACTACCT	GGTCTGACAGTTCCGACAGGA
<i>LAG3</i>	TGGCTTCAAGTCTCCATCA	CCCACCTGGAACCTGCT
<i>CD8</i>	CCCTGAGCAACTCCATCATGTAC	GGCGTCGTGGTGGCC
<i>CD4</i>	GGGAAATCAGGGCTCTTCTTA	TGGTCCCAAAGGCTTCTCTT
<i>CD11a (hINT-α1)</i>	TACCTCTTCGCGAGAATCTG	GCAAGCTCATCGAACCATCA
<i>CD18 (hINT-β2)</i>	ATGCTTGATGACCTCAGGAATGT	ACGGTCTTGTCCACGAAGGA
<i>CD25</i>	GGGACTGCTCAGTTTATCA	TTCAACATGGTTCTTCTTGTAG
<i>CD27</i>	CCCTCTCTCTGACCACCACA	CGACAGGCACACTCAGATT
<i>CD28</i>	GCTGCTCTTGGCTCTCAACTTATT	CCGCATTGTCGTACGCTACA
<i>CD40</i>	TCCAGAACCACCACTGCAT	CACEGCAAGGAAGGCATT
<i>CD40L</i>	GAAAGAAAACAGCTTTGAAATGCA	TTTTTCAGCCCACTGTAACACAGA
<i>CD49b (hINT-α2)</i>	CAACGGGTGTGTTCTTGACA	TCATCACACACAACCACAACATCT
<i>CD71</i>	CGTCGGGATATCGGGTGGCGG	CCCGCAGGATGAAGGGAGGACA
<i>PD1</i>	GCTACAACCTGGGCTGGCG	ATGTGTTGGAGAAGCTGCAGGT
<i>PDL1</i>	TTTATATTCATGACCTACTGGCATTG	AATTGTCATATTGCTACCATACTTAGCA
<i>PDL2</i>	AGCCTGGAATTGCAGCTTCA	AAGTTGCATTCCAGGGTACAT
<i>ICAM1</i>	CCCTGATGGCAGTCAACA	GCAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG
<i>CTLA4</i>	TTCTCTCTTCACTCCCTGCTTCTG	GAGATGCATACTCACACAAAAGCT
<i>GITR</i>	TGTGTCCAGCCTGAATTCCA	CCGAGGCACAGTCGATACACT
<i>OX40</i>	ACGACGTGGTCAGCTCAA	AGCGGCAGACTGTGTCCTG
<i>Foxp3</i>	GAAACAGCACATCCAGAGTTC	ATGGCCAGCGGATGAG
<i>tBet</i>	GATGCGCCAGGAAGTTTCAT	CTCTCGCTGTTTCACTCAAC
<i>Bactine</i>	CACGGCATCGTACCAACT	AGCCACACGCACTCATTG
<i>GAPDH</i>	CCATCAATGACCCCTTCATTG	CTTGACGGTGCCATGGAATT



28S	TTGAAAATCCGGGGGAGAG	ACATTGTTCCAACATGCCAG
-----	---------------------	----------------------

*IL*: Interleukin; *INF $\gamma$* : Interferon gamma; *TGF $\beta$ 1*: Transforming Growth Factor beta1; *CD*: Cluster of Differentiation; *IL-10Ra/B*: Subunit a or B of the interleukin 10 receptor; *CXCR4*: C\_X\_C Chemokine receptor type 4; *CCR7*: C\_C chemokine receptor type 7; *VEGF*: Vascular Endothelial Growth Factor; *PDGF*: Platelet-Derived Growth Factor; *GATA3*: Trans-acting T-cell-specific Transcription factor 3; *LAG3*: Lymphocyte Activation Gene 3; *CD40L*: CD40 ligand; *PD-1*: Programmed cell Death protein 1; *PDL-1/2*: PD-1 Ligand; *ICAM-1*: Intercellular Adhesion Molecule 1; *CTLA-4*: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4; *GITR*: Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein; *G3PDG*: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *28S*: ribosomal RNA of the 28S subunit.

**Table2. Demographic data of the cohort**

<b>Characteristics</b>	<b>Distribution</b>
Cohort study	22 patients
Inclusion date	From June 2006 to January 2009
Age at selection*	51 (46, 66)
Gender	
Male	15
Female	7
HCV genotype**	Gen 1: n=18; Gen 4 : n=4
Immunosuppression	Tac + steroids: n=7 (31,8%) ATG+Tac: n=4 (18,2%) ATG + MMF + Tac (tapered dose): n=11 (50%)
Metavir F score 1 year after LT	F<1 n=13, F≥1 n=9
* Median value (min, max)	
** n= number of patients	

**Table 3. Characteristics of patients with mild or severe HCV recurrence one year after LT**

<b>Characteristics</b>	<b>Mild recurrence (F&lt;1 one year post-LT) N=13</b>	<b>Severe recurrence (F≥1 one year post-LT) N=9</b>	<b>p</b>
% of patients	59%	41%	
Age (years)	50±13	53±7	0.57
Weight (kg)	74.7±12.7	70.3±14.3	0.32
HCV genotype	Gen 1: n= 11 Gen 4: n= 2	Gen 1: n= 7 Gen 4: n= 2	
Basal Creatinine (µmol/L)	71,8±24.9	93.3±39.9	NS
Creatinine 1 year after LT	121±18.6	125±35.2	NS
<b>Immunosuppressive regimen</b>			
Tac +steroids: n=7	4	3	
ATG+Tac: n=4	3	1	
ATG + MMF + Tac (tapered dose) : n=11	6	5	
Viral load before LT (log)	4.2±0.5	4.8 ±0.8	NS
Viral load 1 year after LT (log)	6.2±0.7	6.9±1.2	NS
Donor age >40	58%	62%	NS

**Table 4: relative expression values for Treg, Tr1 and Th1 related function gens:**

Gene name	Relative expression ( $2^{-\Delta\Delta CT_A}$ )		- $\Delta CT$ (Moyne $\pm$ SD)		P Value
	Mild recurrence	Severe recurrence	Mild recurrence	Severe recurrence	
CD4	1	7.12	-12.51 $\pm$ 1.59	-9.68 $\pm$ 2.63	0.019
CD25	1	2.62	-12.66 $\pm$ 1.09	-11.26 $\pm$ 1.30	0.045
Foxp3	1	1.72	-9.65 $\pm$ 0.66	-8.86 $\pm$ 1.52	0.181
IL10	1	1.08	-9.97 $\pm$ 1.42	-9.85 $\pm$ 1.54	0.815
TGF $\beta$	1	5.58	-11.3 $\pm$ 2.14	-8.82 $\pm$ 1.92	0.033
CTLA-4	1	4.19	-12.84 $\pm$ 1.36	-10.77 $\pm$ 1.82	0.016
T-bet	1	5.03	-12.62 $\pm$ 1.03	-10.29 $\pm$ 2.68	0.021
GATA-3	1	2.76	-11.75 $\pm$ 0.61	-10.28 $\pm$ 1.36	0.011
IL-10R $\alpha$	1	3.68	-9.36 $\pm$ 0.88	-7.48 $\pm$ 1.88	0.023
IL-10R $\beta$	1	3.30	-10.28 $\pm$ 1.15	-8.56 $\pm$ 1.47	0.007
CD18	1	9.84	-10.21 $\pm$ 2.86	-6.91 $\pm$ 3.51	0.038
CD49b	1	1.7	-5.01 $\pm$ 0.68	-4.96 $\pm$ 1.40	0.64
TGFb	1	5.58	-11.30 $\pm$ 2.24	-8.82 $\pm$ 2.05	0.033
IFN $\gamma$	1	20	-14.35 $\pm$ 3.73	-10.03 $\pm$ 3.67	0.019
IL2	1	6.6	-21.04 $\pm$ 3.27	-18.31 $\pm$ 2.66	0.011
IL23	1	1.77	-10.15 $\pm$ 0.76	-9.32 $\pm$ 0.84	0.039
CD27	1	2.63	-7.88 $\pm$ 0.91	-6.48 $\pm$ 1.35	0.007
CD28	1	12.12	-15,72 $\pm$ 1.58	-12.12 $\pm$ 2.97	0.016
CD40L	1	4.45	-13.93 $\pm$ 1.78	-11.78 $\pm$ 1.26	0.016
IL6	1	0.06	-6.16 $\pm$ 0.96	-7.92 $\pm$ 1.49	0.59

Ghazal et al

24

IL17	1	1.55	-10.74±1.28	-10.19±1.55	0.34
IL23	1	1.77	-11.03±0.76	-10.25±0.84	0.039

## **Troisième article**

Les inhibiteurs de la calcineurine (ACN) sont les principaux traitements immunosuppresseurs utilisés après TH. Ils interfèrent avec les voies de transduction impliquées dans l'activation des cellules T. Malgré la diminution de l'incidence du rejet grâce à ces médicaments, leurs effets secondaires à long terme représentent un problème important (Ojo, Held et al. 2003). D'autres molécules immunosuppressives sont disponibles comme les inhibiteurs de mTOR, mais leur utilisation dans le contexte de TH reste limitée. Les inhibiteurs de mTOR n'agissent pas sur les mêmes voies d'activation que les anti-calcinurines, mais ils ciblent le complexe 1 de mTOR et affectent donc la prolifération de ces cellules de la réponse immunitaire (Powell, Pollizzi et al. 2012).

La capacité de certains traitements à préserver les Treg tout en inhibant la réponse immunitaire représente un intérêt majeur chez les patients transplantés hépatiques pour arriver à un stade de tolérance permettant de diminuer les doses des immunosuppresseurs et de réduire leurs effets secondaires.

Les inhibiteurs de mTOR ont la capacité de moduler la réponse immunitaire, ils ont également un effet antitumoral (Augustine, Bodziak et al. 2007, Motzer, Escudier et al. 2008, Masetti, Montalti et al. 2010, Cotovio, Neves et al. 2012), tout en préservant l'activité des Treg (Lim, Koo et al. , Battaglia, Stabilini et al. 2006) à l'opposé des anti-calcinurines qui sont associés à une diminution des Treg (Segundo, Ruiz et al. 2006, Levitsky, Miller et al. 2009). Toutes ces constatations fournissent un rationnel pour leur utilisation dans le cadre de la TH. En effet, les propriétés anti-tumorales des inhibiteurs de mTOR pourraient aider à diminuer le taux de récurrence tumorale associé à l'immunosuppression chez les patients ayant un CHC sur l'explant hépatique (Battaglia, Stabilini et al. 2005, Ruggenti, Perico et al. 2007).

Dans notre étude, nous avons évalué le nombre et la fonction des cellules Treg chez 15 patients transplantés hépatique, avant et après conversion d'un traitement par anti-calcineurine (Tacrolimus) vers un inhibiteur de mTOR (Sirolimus ou Everolimus). Nous avons montré que les taux sanguins périphériques de Treg sont augmentés après conversion aux inhibiteurs de mTOR, et que la fonction immun-modulatrice de ces cellules est maintenue. Ce choix de traitement pourrait être préféré chez certains patients transplantés hépatiques qui représenteraient un risque accru de rejet ou de récurrence tumorale.

**Abstract : Poster in AASLD Liver Meeting 2014 (CONTROL ID: 2024514)**

Treatment with mTOR inhibitors after liver transplantation enables a sustained increase in regulatory T-cells while preserving their suppressive capacity.

GHAZAL Khaldoun, STENARD Fabien, BARJON Clement, PERDIGAO Fabiano, SCATTON Olivier, CALMUS Yvon, CONTI Filomena.

**Background :** The mammalian targets of rapamycin (mTOR) inhibitors (sirolimus [SRL] and everolimus [EVR]) are used after transplantation for their immunosuppressive activity. Evidence has indicated that regulatory T- cells (Tregs) play a crucial role in immune tolerance. mTOR inhibitors appear to preserve Tregs, unlike Tacrolimus (Tac).

The aim of this study was to evaluate the number and function of Tregs in liver transplant recipients before and after their conversion from Tac to mTOR inhibitors.

**Patients and methods:** Fifteen patients with stable graft function were converted to SRL (n=5) or EVR (n=10). Tregs (CD4+CD25+FoxP3+CD127-) were analysed prospectively in blood cells using flow cytometry, and a functional assay was performed to test Treg activity.

**Results:** All patients in both groups displayed a sustained rise in Treg levels after the introduction of mTOR inhibitors (Treg levels at 3 months:  $6.45 \pm 0.38\%$  of CD4 T-cells, vs. a baseline level of  $3.61 \pm 0.37\%$ ,  $p < 0.001$ ; mean fold increase  $2.04 \pm 0.73$ ). In the SRL group, 3-month Treg levels were  $6.0 \pm 0.5$  vs.  $3.7 \pm 0.3$ ;  $p = 0.037$ , while in the EVR group they were  $6.6 \pm 0.6$  vs.  $3.5 \pm 0.5$ ;  $P = 0.001$ . By contrast, no statistical change was observed in an unconverted Tac control group. Tregs also preserved their functional ability to suppress activated T-cells.

**Conclusion:** These results suggest that mTOR inhibitors induce a significant increase in Tregs while maintaining suppressive activity after LT.

**Treatment with mTOR inhibitors after liver transplantation enables a sustained increase in regulatory T-cells while preserving their suppressive capacity.**

Ghazal Khaldoun\* (1,2), Stenard Fabien\* (1,2,3), Barjon Clément (1,2), Aoudjehane Lynda (4), Chouzenoux Sandrine (5), Perdigao Fabiano (3), Scatton Olivier (3), Calmus Yvon (1,2,3), and Conti Filomena (1,2,3).

\* GK and SF contributed equally to this work.

1- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75005, Paris, France

2- INSERM, UMR\_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France

3- AP-HP, Hôpital Saint Antoine, Centre de Transplantation Hépatique, F-75012, Paris, France

4- Human HepCell, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

5- Faculté de Médecine René Descartes, Université Paris 5, Paris, France

**Corresponding author: Dr Filomena Conti:** Centre de Transplantation Hépatique, Hôpital Saint Antoine, 184 rue de Faubourg Saint Antoine, 75012 Paris, France

Email: [filomena.conti@sat.aphp.fr](mailto:filomena.conti@sat.aphp.fr)

**Running title:** Increased Treg levels in liver transplant recipients

**Keywords:** mTOR inhibitor, Liver, Transplantation, Regulatory T-cells, Calcineurin inhibitor.

**List of Non-standardized abbreviations:**

Tregs: Regulatory T-cells; CNI: Calcineurin Inhibitor; Tac: Tacrolimus; SRL: sirolimus; EVR: Everolimus MMF: Mycophenolate Mofetil; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell; HCC: Hepatocellular carcinoma; PSC: Primary Sclerosing Cholangitis; PTLN: Post-Transplant Lymphoproliferative Disease.



## Abstract

The mammalian targets of rapamycin (mTOR) inhibitors (sirolimus [SRL] and everolimus [EVR]) are used after transplantation for their immunosuppressive activity. Evidence has indicated that regulatory T-cells (Tregs) play a crucial role in immune tolerance. mTOR inhibitors appear to preserve Tregs, unlike Tacrolimus (Tac).

The aim of this study was to evaluate the number and function of Tregs in liver transplant recipients before and after their conversion from Tac to mTOR inhibitors.

Fifteen patients with stable graft function were converted to SRL (n=5) or EVR (n=10). Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) were analysed prospectively in blood cells using flow cytometry, and a functional assay was performed to test Treg activity.

All patients in both groups displayed a sustained rise in Treg levels after the introduction of mTOR inhibitors (Treg levels at 3 months:  $6.45 \pm 0.38\%$  of CD4 T-cells, vs. a baseline level of  $3.61 \pm 0.37\%$ ,  $p < 0.001$ ; mean fold increase  $2.04 \pm 0.73$ ). In the SRL group, 3-month Treg levels were  $6.01 \pm 0.53$  vs.  $3.79 \pm 0.39$ ;  $p = 0.037$ , while in the EVR group they were  $6.63 \pm 0.67$  vs.  $3.54 \pm 0.51$ ;  $P = 0.001$ . By contrast, no statistical change was observed in an unconverted Tac control group. Tregs also preserved their functional ability to suppress activated T-cells.

These results suggest that mTOR inhibitors induce a significant increase in Tregs while maintaining suppressive activity after LT.

## **Introduction:**

Calcineurin inhibitors (CNI), the principal immunosuppressive drugs used after liver transplantation (LT), act by interfering with the activation of calcineurin phosphatase which in turn triggers nuclear factors. These pathways are critically involved in T-cell activation. Despite the fall in rejection rates, the side effects of the long-term CNI use are a major adverse outcome (1). Other immunosuppressive agents such as inhibitors of the mammalian target of Rapamycin (mTOR), have been introduced, but their use remains limited in the context of LT. mTOR inhibitors act by binding to FK-binding protein 12, after which the complex associates with the mammalian target of Rapamycin. This inhibits the mTOR complex that controls crucial biochemical pathways, affecting the organisation of the actin cytoskeleton, mRNA transcription, protein turnover and the initiation of protein translation and synthesis, all of which are required for lymphocyte proliferation and are essential to development of the immune response (2). Sirolimus (SRL) is an antifungal macrolide and was the first molecule in the mTOR inhibitor group to be discovered; it displays potent anti-proliferative activities that generate anti-tumour and immunosuppressive effects (3). Everolimus (EVR), a SRL analogue, has been used in the treatment of several types of cancer (4) and to prevent graft rejection (5, 6). The potential ability of mTOR inhibitors to modulate the immune response, in addition to their anti-proliferative activities, may therefore have a beneficial effect on the relapse rate associated with immunosuppression in transplant patients with hepatocellular carcinoma, and it has been shown that SRL-based immunosuppression was associated with increased survival after LT in this disease setting (7). The natural Treg population, which accounts for 5-10% of peripheral CD4<sup>+</sup>T-cells, constitutively expresses CD25 (8), and can suppress host immune responses in a context of autoimmune diseases and transplantation (9). The FoxP3 transcription factor that is expressed by Tregs appears to be a master gene controlling Treg development (10), and the majority of

FoxP3<sup>+</sup> Tregs of are CD127 low (11). Mouse and human Tregs can be expanded *in vitro* using SRL and high-dose IL-2, while inhibiting the proliferation of effector T-cells (12, 13). There is evidence to suggest that Tregs play a crucial role in the mechanism of immune tolerance; indeed, in the post-organ transplant setting, several experimental studies have demonstrated that Tregs can induce allograft tolerance and could play a therapeutic role (14-17). Tregs are influenced by immunosuppressive therapy; in particular, CNIs impair the Treg function *in vitro* (18). Unlike CNIs, it is suggested that mTOR inhibitors favour the expansion and immunomodulatory functions of FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg both *in vitro* and *in vivo* (13, 19, 20). It has also been shown that Treg levels fall significantly after LT, especially in a context of allograft rejection (21), and that the reduction in circulating Tregs is counterbalanced by an increase within the graft (22). Long-term treatment with CNIs in human renal transplant recipients has appeared to induce a reduction in the number of circulating Tregs, whereas SRL do not seem to do so (23). These findings point to mTOR inhibitors as being capable of increasing blood Treg levels in patients previously treated with CNIs (24).

During this pilot study, we prospectively monitored the number and function of Tregs in the peripheral blood of fifteen liver transplant recipients who had been switched from a CNI to an SRL or EVR-based immunosuppressive regimen because of the presence of cancer. The prospective evaluation presented herewith shows that conversion from Tac to an mTOR inhibitor (SRL or EVR) induced a sustained and significant increase in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs, while at the same time preserving their suppressive capacity.

## **Patients and Methods**

### **Patients and immunosuppressive protocols**

Fifteen patients who had received a liver transplant in our centre, and who had been converted from a Tac to an mTOR inhibitor-based immunosuppressive regimen were included consecutively in this pilot study. They had all received a Tac-based immunosuppressive regimen with stable graft function, before being converted to an SRL (n=5) or EVR (n=10) immunosuppressive regimen. The rationale for conversion was the presence of a pre-transplant liver tumour confirmed by pathological examination of the explant. This study was approved by the Ethics Committee (CPP) for Ile de France III (AO 1185-38), and all patients gave their informed consent to be included in the study.

All patients received the same immunosuppressive regimen, which included low-dose corticosteroids that were withdrawn between 6 and 12 months post-LT, Tac to maintain trough blood levels at between 8 and 11 ng/ml during the first 12 months post-LT, and then at between 5 and 8 ng/ml, and mycophenolate mofetil (MMF) 1g bid. The study design is shown in Figure 1. Protocol conversion for the mTOR inhibitor was performed as follows: following the introduction of SRL 2 mg/day or EVR 1 mg bid, the daily Tac dose was reduced by 50%, and then tapered to complete withdrawal after less than 1 month. The SRL or EVR dosage was designed to target blood concentrations of between 8 to 10 ng/ml. All patients remained under the same doses of MMF and corticosteroids.

Blood samples were collected prospectively before conversion (day 0), and then at day 14 and 1 and 3 months after conversion. As a control group, and in order to confirm the stability of results under Tac therapy, three samples had been collected prior to conversion from all the patients included in the study. A non-converted Tac control group of three liver recipients was also evaluated for a 3-month period, with samples being collected on day 0 and then at 1 and 3 months. The patients were matched for age and time elapsing since LT, and the immunosuppressive regimens were also similar.

#### **Assessment of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg population**

### **Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)**

PBMCs were obtained by density gradient centrifugation over Ficoll-Paque PLUS (Amersham, Piscataway, NJ) from venous blood, as previously described (25). Fresh cells were used for flow cytometry analysis or for Treg isolation. The remaining cells were stored in liquid nitrogen.

### **Identification of Tregs by Flow Cytometry**

The following monoclonal antibodies were used for cell phenotype analysis: PE-Cy5 mouse anti-human CD4 (Dakocytomation, Copenhagen, Denmark), PE mouse anti-human CD25 (BD Pharmingen, San Diego, California), APC anti-human CD127 (R&D systems Minneapolis, MN) and FITC mouse anti-human FoxP3 (eBioscience, San Diego, CA). PE-Cy5-, PE-, APC-, and FITC-conjugated mouse IgG1 were used as isotype-matched controls. One to five million cells were washed with cold FACS buffer (PBS, 1% FBS, 0.1% sodium azide) and were incubated with anti-CD4, anti-CD25 and anti-CD127 for 30 minutes at 4°C in the dark. For intracellular Foxp3 staining, cells were incubated in Fix/Perm Buffer (eBioscience, San Diego, CA) for 30 minutes at 4°C; anti-FoxP3 was then added and the cells were incubated for 60 minutes at 4°C in the dark. The percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>dim</sup>FoxP3<sup>+</sup> was expressed as a percentage of total CD4<sup>+</sup> T-cells in the sample. Cell staining was detected using a LSR II Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and the analysis was performed using Kaluza software (Beckton-Dickinson).

### **Isolation of regulatory T-cells with MACS column Treg sorting**

Fresh CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Tregs were isolated with the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T-cells isolation Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). PBMC were labelled with a cocktail of biotinylated antibodies targeting CD4<sup>+</sup> cells for 10 minutes at 4°C and then incubated with anti-biotin microbeads for 15 minutes at 4°C. Non-CD4 cells were depleted using an LD

column. CD4<sup>+</sup> cells were then incubated with anti-CD25 microbeads for 15 minutes at 4°C and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells were positively selected using an MS column.

### **Treg Functional Assay**

The suppressive activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs was measured from their ability to inhibit the proliferative response of autologous PBMCs in an MLR. PBMC were cultured at a concentration of 5x10<sup>4</sup> cells per well and then the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells isolated were added at ratios of 1:0, 0:1, 2:1, 4:1, 8:1. Cells were cultured in a round-bottomed 96-well plate in triplicate for 72 hours and were activated with plate-bound anti-CD3 antibodies (1 µg/mL), incubated at 37°C for 2 hours before the culture, and soluble anti-CD28 antibodies (100 ng/mL) (Clinisciences). Proliferation was assessed using the [methyl-3H]-thymidine incorporation method (1 KCi per well; GE Healthcare, Aulnay sous Bois, France). Thymidine was incubated for the last 18 hours before harvesting and radioactivity was measured using an A-counter (Wallac Trilux 1450; Turku, Finland). The results were expressed as counts per minute (cpm). All assays were performed in triplicate.

### **Statistics**

Statistical analyses and significances were determined using the non-parametric Mann-Whitney U test. *P* values <0.05 were considered to be significant. Statistical analyses on flow cytometry data were performed with GraphPad Prism version 5.00 for MAC OS X (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## **Results**

### **Study population and conversion to an mTOR inhibitor**

The characteristics of the fifteen liver recipients who converted from Tac to SRL (n=5) or EVR (n=10), and who were included consecutively in the study, are summarized in Table 1.

The reason for the switch from a Tac to an mTOR inhibitor regimen was the presence of a pre-transplant cancer, which was cholangiocarcinoma in two cases and hepatocellular carcinoma in 13 cases (seven of whom exceeded the Milan criteria, with three having  $\alpha$ -fetoprotein blood levels  $>100\text{ng/ml}$ ). Eight patients had been treated with arterial chemoembolization and four with surgical resection during their time on the waiting list. All patients were receiving corticosteroid therapy at doses ranging from 5 to 7 mg/day, and they were kept on MMF after their conversion to mTOR inhibitors, at doses ranging from 1 to 2 g per day. All patients had received Tac prior to the conversion at doses ranging from 6 to 10 mg per day, the mean residual blood level being  $9 \pm 3.2 \text{ ng/ml}$ . Tac was withdrawn completely one month after introduction of the mTOR inhibitor.

The mTOR inhibitors were well tolerated in four of the five patients receiving SRL. In the fifth patient, SRL was discontinued 6 months after its initiation because of lower limb oedema. Treatment with EVR was well tolerated in all patients, and its discontinuation was not necessary in any patient. . No acute rejection was observed and graft function remained stable throughout the study period in all patients.

During the postoperative course, two of the patients underwent biliary reconstruction for anastomotic stricture while they were receiving mTOR inhibitor therapy. Both reconstruction procedures were successful and the postoperative course was uneventful, requiring no discontinuation of mTOR inhibitor therapy.

### **Evaluation of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^-\text{FoxP3}^+$ Tregs during Tac therapy**

Treg levels were evaluated on days -14, -7 and 0 on five of the 15 patients who underwent treatment conversion to an mTOR inhibitor, our findings showed a stable Treg levels under stable Tac immunosuppressive therapy, Being  $3.95 \pm 0.43\%$ ,  $3.46 \pm 0.37\%$  and  $3.61 \pm 1.32\%$  of CD4 cells on days -14, -7 and 0, respectively ( $p=0.1$ ). Furthermore, after introduction of mTOR inhibitor, we evaluated the Treg levels in another three patients who were remained

under Tac therapy as a non-converted Tac control group, and the Treg levels remained constant during the 3-month study period at  $2.98 \pm 0.32\%$ ,  $2.35 \pm 0.26\%$  and  $2.67 \pm 0.52\%$  of CD4 cells at day 0 and months 1 and 3, respectively ( $p=0.2$ ) (Figure 2.d).

### **Profile of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs after conversion to an mTOR inhibitor**

The levels of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-cells in peripheral blood from the patients during and after conversion to an SRL (n=5) or EVR (n=10) immunosuppressive regimen are shown in Figure 2. In all patients who were switched to mTOR inhibitor therapy, a gradual and sustained increase in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg population was seen after conversion, which reached significance at 3 months ( $p<0.001$ ) (Figure 2a and 3a). In the SRL group, the Treg count had not changed significantly at day 14 after conversion when compared to day 0, and a slight increase in the Treg percentage was observed 1 month after conversion, although this remained insignificant ( $p=0.54$ ), but a significant raise was achieved at 3 months ( $p=0.037$ , Figure 2b and 3b). The same profile was observed in the EVR group, with slight, insignificant, increases at day 14 and 30 ( $p=0.22$ ;  $p=0.28$  respectively), but the level rose markedly and became significant after day 30 ( $p=0.001$ , Figure 2c and 3c). The Treg count then rose progressively after the withdrawal of Tac.

At 3 months post-conversion, the mean Treg level in peripheral blood from all 15 patients was  $6.45 \pm 0.38\%$  of CD4 T-cells, while the mean baseline level at day 0 had been  $3.61\% \pm 0.37$ ;  $p<0.001$ , resulting in a mean fold rise in Treg levels of  $2.04 \pm 0.73$  compared to baseline under Tac therapy (Figure 2a and 3a). In the SRL group, the mean peak Treg level at 3 months was  $6.01\% \pm 0.53$  vs. a mean baseline level of  $3.79\% \pm 0.39$ ,  $p=0.037$ , or a mean fold increase of  $1.82 \pm 0.47$  (Figure 2b and 3b), while in the EVR group, the mean peak Treg level was  $6.63 \pm 0.67$  vs. a mean baseline level of  $3.54 \pm 0.51$ ,  $p=0.001$ , or a mean fold increase of  $2.08 \pm 0.7$  (Figure 2c and 3c).

### **Suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells**



At baseline, and at each time point after mTOR inhibitor conversion, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells preserved their functional capacity to suppress activated autologous PBMC cells, as demonstrated by their ability to suppress PBMC proliferation in a dose-dependent manner (Figure 4). Indeed, during this study, Tregs isolated from patients under Tac or SRL/EVE based therapy always inhibited PBMC proliferation by 30% or more in an MLR performed with PBMC and Tregs at a ratio of 2:1. Our results also confirmed that Tregs were anergic; i.e. they did not proliferate after stimulation.

## **Discussion**

During this prospective pilot study, we observed that SRL and EVR increased the Treg population in these transplant patients. The conversion from Tac to an mTOR inhibitor after LT induced a sustained and significant increase in the peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg count. Another important finding was that the suppressive capacity of these cells was maintained.

While the Tac based therapy may be reinforce the creation of an immunosuppressive environment since Tac inhibits the production of IL-2, which is essential for the development of Treg cells and does not inhibit the maturation of dendritic cells (DC) (26, 27). In contrast, the mTOR inhibitors don't affect the IL-2 production; thus increasing Treg percentage, and inhibit the DC maturation (28-30). Several studies have linked the Treg cells to operational tolerance (31-34); thus the treatment conversion might be an intermediate step before immunosuppressive treatment tapering or even complete withdrawal.

It is still necessary to identify the optimum candidates for treatment conversion among liver transplant recipients, and the appropriate time to initiate this therapy. During our study, the rationale for conversion was the presence of a liver tumour. Indeed, the anti-tumour effect of mTOR inhibitors has been suggested in a variety of cancer settings, mainly PTLD and

Kaposi's sarcoma (35, 36). mTOR inhibitor conversion has also been proposed in patients with HCC, but there has been little demonstration to date of an anti-tumour effect of mTOR inhibitors on CHC, or its ability to reduce tumour recurrence rates in these patients (7). Although mTOR inhibitors may be helpful because of their anti-tumour effect, the role of Treg with respect to HCC is not clear. Note should also be made of our previous demonstration that Tregs are enhanced in a context of severe recurrent hepatitis C (37), but effective antiviral therapy is now available.

Nevertheless, mTOR inhibitors appear to be as effective as CNI in offering reliable immunosuppression (38, 39). These mTOR inhibitors were well tolerated, and no cases of rejection were observed among our patients, although lower limb oedema required the discontinuation of this treatment in one case. Because of the potential adverse effect of mTOR inhibitors on the risk of postoperative hepatic artery thrombosis (HAT), and impairment of the healing process, this therapy was not introduced immediately after LT (40-42), the shortest interval between LT and its initiation being one month. Moreover, two of our patients underwent surgical reconstruction for biliary anastomotic stricture. Both procedures were uneventful despite the pursuit of mTOR inhibitor therapy, and no postoperative bile leakage, haemorrhage or wound dehiscence were observed. This study therefore confirmed an effect of switching from Tac to an mTOR inhibitor on the Treg population, and our findings concerning the conversion from Tac to SRL agreed with those obtained by Levitsky (43). Furthermore, to our knowledge, this study shows for the first time the positive impact of the switch from Tac to EVR on Treg cells. Treg levels in peripheral blood rose gradually as from Tac withdrawal and the initiation of mTOR inhibitor therapy. Moreover, in each sample collected, it was possible to confirm maintenance of the functional ability of Tregs to suppress the activated T-cell response. The impact on graft tolerance of increased Treg activity in

peripheral blood was not evaluated during this study. There was no evidence of an improvement in graft function, and we did not try to reduce immunosuppression. Unfortunately, evaluating the number and function of Tregs in the graft is difficult, and a correlation between peripheral blood and graft levels of Tregs remains elusive. Post-LT acute rejection rates after a conversion from CNIs to mTOR inhibitors range from 1.4% to 33% in converted patients (44, 45), while the incidence of acute rejection after the *de novo* use of an mTOR inhibitor is similar to that obtained with CNI (46), so that the beneficial effect of SRL or EVR on tolerance still remains unclear at this early stage after treatment conversion.

It is therefore necessary to assess the potential for the induction of tolerance in patients who are switched from Tac to mTOR inhibitors for a longer period. An objective of one of our future studies is therefore supplement these pilot findings that have demonstrated feasibility, and establish the potential role for Tregs in the induction of tolerance and particularly to determine whether when a smaller Treg population is observed after a conversion to mTOR inhibitors constitute a risk factor for acute rejection.

In conclusion, the conversion of patients from Tac to mTOR inhibitor therapy might represent an interesting immunosuppressive option in selected patients (7, 47-49). Firstly, the direct anti-tumour effect (50), and an opportunity to reduce the use of CNIs, may contribute to reducing tumour relapse rates after LT (51). Secondly, the results of our pilot study clearly suggest that such a switch may induce an increase in Treg levels while preserving their suppressive capacity. We therefore hypothesize a potential role for this conversion in the induction of graft tolerance, although this needs to be demonstrated in the context of a larger prospective study.

**Acknowledgements:**

This work received support from the French “Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les Hépatites” (ANRS), and from Novartis France, and FS received a support from the “Société Francophone de Transplantation (SFT).

**Disclosure:**

The authors of this paper have no conflicts of interest to disclose.

## **Figure Legends**

**Figure 1: Study Design:** After liver transplantation, patients received an immunosuppressive regimen based on corticosteroids, MMF and Tac. When introducing SRL or EVR therapy, the CNi dosage was reduced to 50% of the initial levels. MMF and corticosteroids were not discontinued. Tregs were isolated from PBMCs harvested on the day of conversion, and at different time points thereafter (days 0, 14, 1 month and 3 months).

**Figure 2: Variations in peripheral blood Treg levels after the introduction of mTOR inhibitor therapy:** Variations in Treg levels over time (days 0, 14, 30 and at 3 months): a) in all patients receiving SRL or EVR (n=15): day 0 vs. 3 months,  $p < 0.001$ ; day 0 vs. 1 month,  $p = 0.27$ ; day 0 vs. 30,  $p = 0.16$ . b) in the SRL group (n=5): day 0 vs. 3 months,  $p = 0.037$ ; day 0 vs. 1 month,  $p = 0.54$ ; day 0 vs. 30,  $p = 1$ . c) in the EVR group (n=10): day 0 vs. 3 months,  $p = 0.001$ ; day 0 vs. 1 month,  $p = 0.28$ ; day 0 vs. 30,  $p = 0.22$ . d) in patients who were remained under Tac based therapy (n=3): day 0 vs. 1 month,  $p = 0.2$ ; day 0 vs. 3 months;  $p = 0.2$ . Treg levels were expressed as a percentage of  $CD4^+$  cells.

**Figure 3: Mean baseline Treg levels compared to the highest levels reached 3 months after conversion:** Differences between the mean baseline levels of Tregs and the mean highest levels reached: a) in all patients receiving SRL or EVR (n=15), b) in SRL treated group (n=5), c) in EVR treated group (n=10). Treg levels were expressed as a percentage of  $CD4^+$  cells.

**Figure 4: Proliferation assay: co-culture of autologous PBMCs and Tregs.** This figure shows a proliferation assay for one patient at 3 months after introduction of EVR. Tregs ( $CD4^+CD25^{high}$  cells) inhibited the proliferation of autologous PBMCs stimulated with anti CD-28 and plate-bound anti-CD3. PBMCs, were cultured alone or together with magnetic column selection purified  $CD4^+CD25^{high}$  cells at ratios of 1:0, 0:1, 2:1, 4:1, 8:1 (controls at 1:0 and 0:1 without stimulation were also performed) for 72 hours. The cultures were labelled

with 1  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$  thymidine during the final 18 hours. Bar graphs show the mean  $\pm\text{SEM}$  of triplicate wells expressed in Counts Per Minute (CPM).

## **References:**

1. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *The New England journal of medicine.* 2003; 349: 931-940.
2. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. *Annual review of immunology.* 2012; 30: 39-68.
3. Augustine JJ, Bodziak KA, Hricik DE. Use of sirolimus in solid organ transplantation. *Drugs.* 2007; 67: 369-391.
4. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet.* 2008; 372: 449-456.
5. Masetti M, Montalti R, Rompianesi G, Codeluppi M, Gerring R, Romano A, et al. Early withdrawal of calcineurin inhibitors and everolimus monotherapy in de novo liver transplant recipients preserves renal function. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2010; 10: 2252-2262.
6. Cotovio P, Neves M, Santos L, Macario F, Alves R, Mota A. Conversion to everolimus in kidney transplant recipients: to believe or not believe? *Transplantation proceedings.* 2012; 44: 2966-2970.
7. Toso C, Merani S, Bigam DL, Shapiro AM, Kneteman NM. Sirolimus-based immunosuppression is associated with increased survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51: 1237-1243.
8. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature medicine.* 2004; 10: 801-805.
9. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews.* 2001; 182: 18-32.
10. Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *European journal of immunology.* 2007; 37: 21-23.
11. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine.* 2006; 203: 1701-1711.
12. Lim DG, Koo SK, Park YH, Kim Y, Kim HM, Park CS, et al. Impact of immunosuppressants on the therapeutic efficacy of in vitro-expanded CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in allotransplantation. *Transplantation.* 89: 928-936.
13. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol.* 2006; 177: 8338-8347.
14. Velasquez-Lopera MM, Eaton VL, Lerret NM, Correa LA, Decresce RP, Garcia LF, et al. Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Transplant immunology.* 2008; 19: 127-135.
15. Lee K, Nguyen V, Lee KM, Kang SM, Tang Q. Attenuation of donor-reactive T cells allows effective control of allograft rejection using regulatory T cell therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2014; 14: 27-38.
16. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nature medicine.* 2008; 14: 88-92.

17. Bradley JA. Transplant tolerance by treg therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2014; 14: 5-6.
18. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood.* 2006; 108: 390-399.
19. Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PloS one.* 2009; 4: e5994.
20. Ruggenti P, Perico N, Gotti E, Cravedi P, D'Agati V, Gagliardini E, 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. *Transplantation.* 2007; 84: 956-964.
21. Zeiser R, Negrin RS. Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2008; 7: 458-462.
22. Stenard F, Nguyen C, Cox K, Kambham N, Umetsu DT, Krams SM, et al. Decreases in circulating CD4+CD25hiFOXP3+ cells and increases in intra-graft FOXP3+ cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. *Pediatric transplantation.* 2009; 13: 70-80.
23. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernandez-Fresnedo G, Gomez-Alamillo C, Merino R, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2006; 82: 550-557.
24. Lopez-Hoyos M, Segundo DS, Fernandez-Fresnedo G, Marin MJ, Gonzalez-Martin V, Arias M. Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression. *Transplantation.* 2009; 88: S31-39.
25. Chan KW, Hopke CD, Krams SM, Martinez OM. CD30 expression identifies the predominant proliferating T lymphocyte population in human alloimmune responses. *J Immunol.* 2002; 169: 1784-1791.
26. Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2007; 7: 1722-1732.
27. Szabo G, Gavala C, Mandrekar P. Tacrolimus and cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research.* 2001; 49: 442-449.
28. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood.* 2005; 105: 4743-4748.
29. Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, Mol WM, Peeters AM, Korevaar SS, et al. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation.* 2005; 80: 110-117.
30. Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A, et al. Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood.* 2003; 101: 4457-4463.
31. Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2007; 7: 309-319.



32. Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 2845-2857.
33. Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004; 4: 2118-2125.
34. Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, et al. The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation*. 2008; 86: 1837-1843.
35. Monaco AP. The role of mTOR inhibitors in the management of posttransplant malignancy. *Transplantation*. 2009; 87: 157-163.
36. Staufer K, Sterneck M, Schaefer H, Nashan B, Fischer L. Sirolimus addition to tacrolimus-based immunosuppression induces complete remission of post-transplant lymphoproliferative disorder in a liver transplant recipient. *Transpl Int*.
37. Carpentier A, Conti F, Stenard F, Aoudjehane L, Miroux C, Podevin P, et al. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2009; 9: 2102-2112.
38. Campsen J, Zimmerman MA, Trotter JF, Wachs M, Bak T, Mandell S, et al. Sirolimus and liver transplantation: clinical implications for hepatocellular carcinoma. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2007; 8: 1275-1282.
39. Zhou J, Fan J, Wang Z, Wu ZQ, Qiu SJ, Huang XW, et al. Conversion to sirolimus immunosuppression in liver transplantation recipients with hepatocellular carcinoma: Report of an initial experience. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 3114-3118.
40. Dunkelberg JC, Trotter JF, Wachs M, Bak T, Kugelmas M, Steinberg T, et al. Sirolimus as primary immunosuppression in liver transplantation is not associated with hepatic artery or wound complications. *Liver Transpl*. 2003; 9: 463-468.
41. Kahan BD, Benavides C, Schoenberg L, Podbielski J, Green C. Addition of induction therapy offsets the hazard of marked calcineurin minimization among renal transplant recipients treated with sirolimus. *Clinical nephrology*. 73: 344-353.
42. Soll C, Clavien PA. Inhibition of mammalian target of rapamycin: the janus face of immunosuppression? *Hepatology (Baltimore, Md)*. 51: 1113-1115.
43. Levitsky J, Mathew JM, Abecassis M, Tambur A, Leventhal J, Chandrasekaran D, et al. Systemic immunoregulatory and proteogenomic effects of tacrolimus to sirolimus conversion in liver transplant recipients. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2013; 57: 239-248.
44. De Simone P, Metselaar HJ, Fischer L, Dumortier J, Boudjema K, Hardwigsen J, et al. Conversion from a calcineurin inhibitor to everolimus therapy in maintenance liver transplant recipients: a prospective, randomized, multicenter trial. *Liver Transpl*. 2009; 15: 1262-1269.
45. Martinez JM, Pulido LB, Bellido CB, Usero DD, Aguilar LT, Moreno JL, et al. Rescue immunosuppression with mammalian target of rapamycin inhibitor drugs in liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 42: 641-643.
46. Molinari M, Berman K, Meeberg G, Shapiro JA, Bigam D, Trotter JF, et al. Multicentric outcome analysis of sirolimus-based immunosuppression in 252 liver transplant recipients. *Transpl Int*. 23: 155-168.
47. Chinnakotla S, Davis GL, Vasani S, Kim P, Tomiyama K, Sanchez E, et al. Impact of sirolimus on the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2009; 15: 1834-1842.

48. Chiurciu C, Carreno CA, Schiavelli R, Petrone H, Balaguer C, Trimarchi H, et al. Results of the conversion to everolimus in renal transplant recipients with posttransplantation malignancies. *Transplantation proceedings*. 42: 277-279.
49. Schnitzbauer AA, Zuelke C, Graeb C, Rochon J, Bilbao I, Burra P, et al. A prospective randomised, open-labeled, trial comparing sirolimus-containing versus mTOR-inhibitor-free immunosuppression in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *BMC cancer*. 10: 190.
50. Newell P, Toffanin S, Villanueva A, Chiang DY, Minguez B, Cabellos L, et al. Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. *Journal of hepatology*. 2009; 51: 725-733.
51. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008; 135: 1972-1983, 1983 e1971-1911.

Figure 1

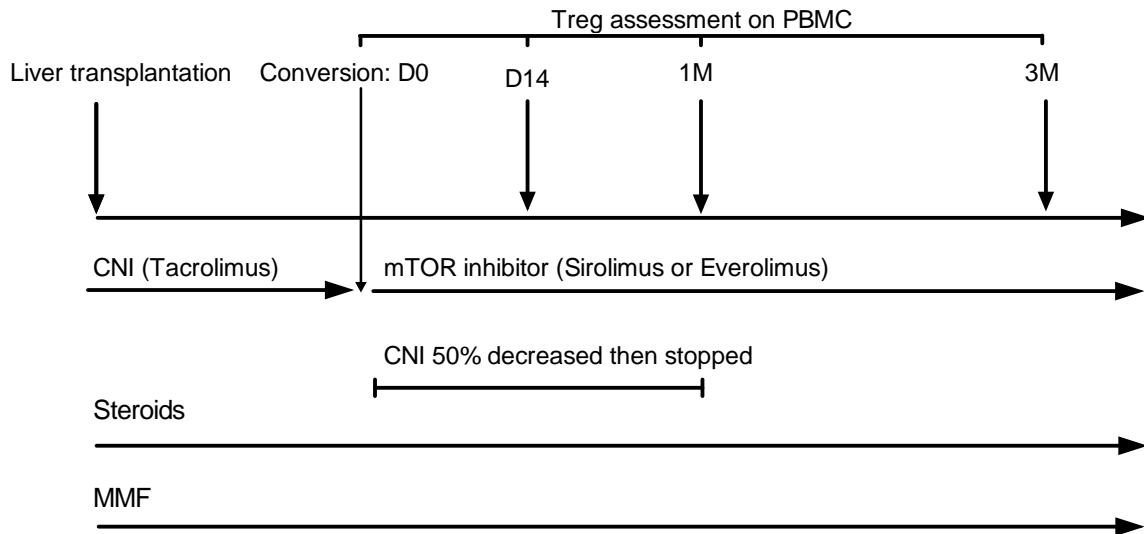


Figure 2

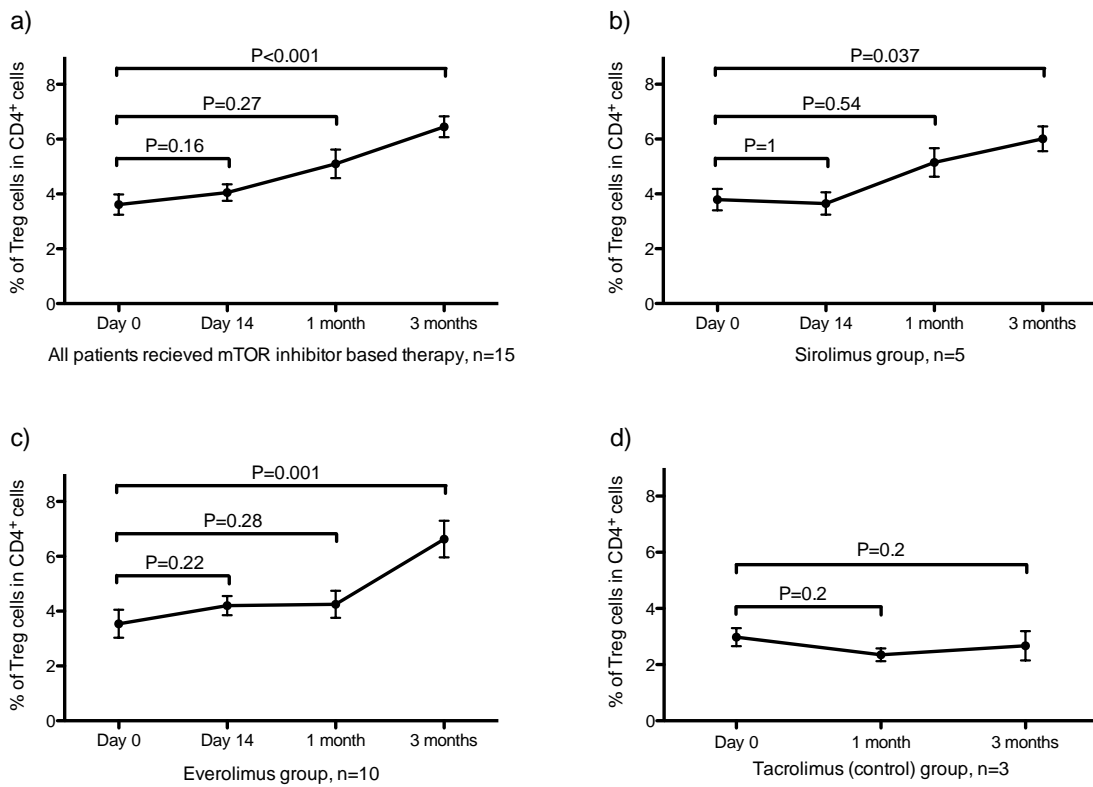


Figure 3

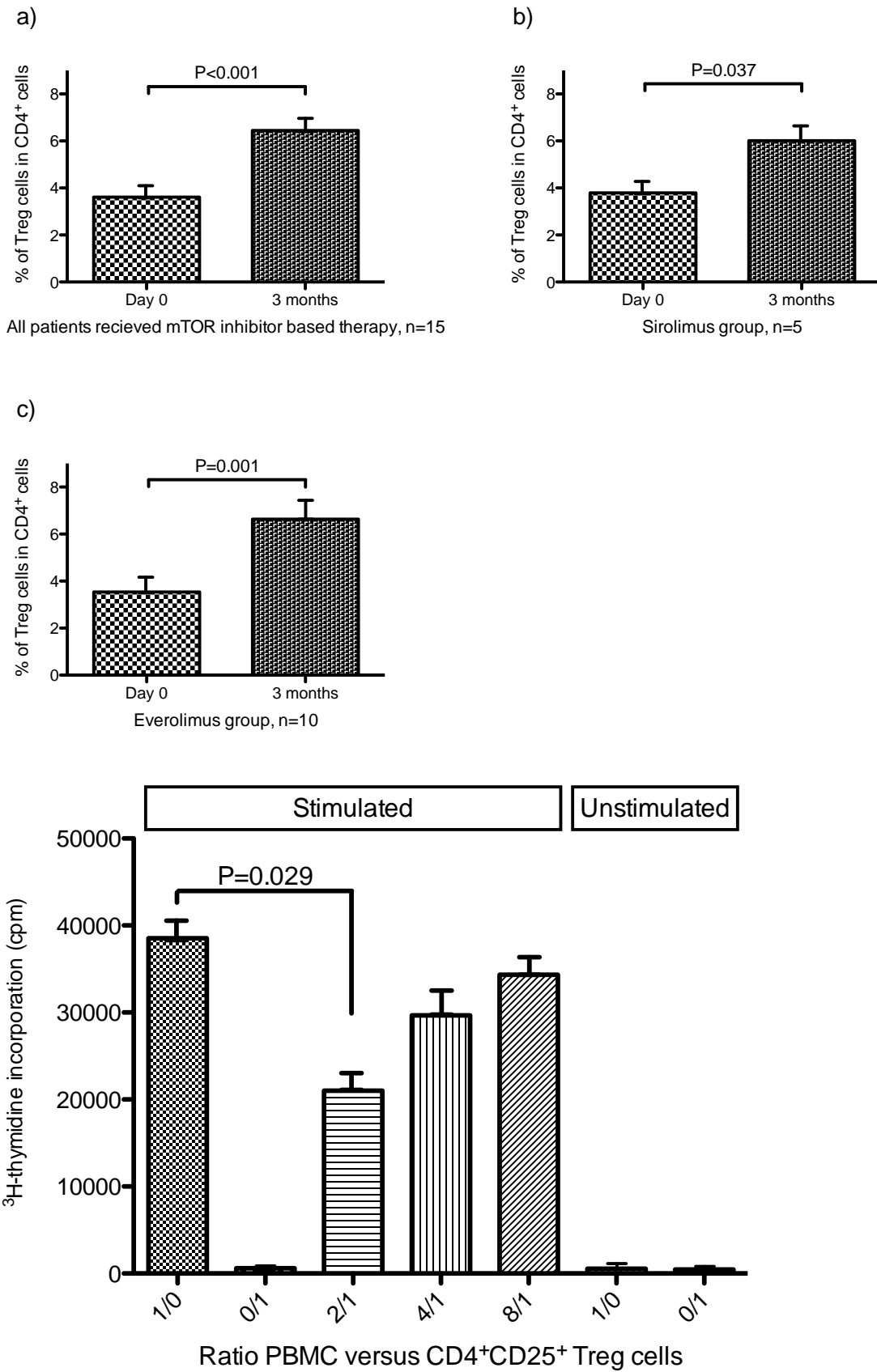


Table 1 : Patient characteristics

	Sirolimus (n=5)	Everolimus (n=10)
Age (years, mean $\pm$ sd)	55 $\pm$ 6	53 $\pm$ 8
Sex ration (M/F)	1/4	3/7
Time between LT and conversion (weeks $\pm$ sd)	20.2 $\pm$ 1.6	16.5 $\pm$ 0.89
<b><u>Indication for LT</u></b>		
Alcoholic cirrhosis	2	3
HCV related cirrhosis	1	3
HBV related cirrhosis	1	1
Metabolic related cirrhosis	1	2
Primary biliary cirrhosis	0	1
<b><u>Indication for conversion</u></b>		
Hepatocellular carcinoma	4	9
Cholangio carcinoma	1	1
<b><u>Cancer treatment before LT</u></b>		
Arterial chemoembolisation	2	6
Surgical resection	1	3

## Quatrième article

Les immunosuppresseurs après TH, principalement ACN comme la CsA ou le Tac, sont indispensables pour diminuer le rejet et améliorer la survie du greffon. Les Treg pourraient avoir un rôle bénéfique dans l'induction de tolérance (Joffre, Santolaria et al. 2008, Velasquez-Loopera, Eaton et al. 2008), mais ces cellules sont influencées par le traitement immunosuppresseur, en particulier par les ACN qui pourraient diminuer leur nombre ou leur fonction suppressive *in vitro* (Zeiser, Nguyen et al. 2006).

La récurrence quasi-systématique de la cirrhose C, après la transplantation hépatique, est une autre barrière à la survie du greffon. Cette récurrence est favorisée à la fois par le traitement immunosuppresseur qui inhibe les réponses immunitaires antivirales (Firpi, Soldevila-Pico et al. 2010), et aussi par les Treg (Carpentier, Conti et al. 2009), pourtant indispensables pour l'induction et le maintien de la tolérance du greffon.

Dans ce contexte, nous avons analysé *in vitro*, les effets de la CsA et le Tac, sur la fonction et la prolifération des cellules Treg. Nos résultats montrent que ces deux molécules réduisent la prolifération des Treg *in vitro*, et que la CsA à faible dose a un effet négatif sur l'activité suppressive des Treg, en induisant un shift cytokinique en faveur d'une sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . Cela pourrait expliquer le taux du rejet plus bas avec l'utilisation de Tac par rapport à la CsA, mais dans le cas de récurrence virale C, l'utilisation de CsA pourrait être bénéfique pour le patient en favorisant une réponse immunitaire antivirale plus soutenue.

## In Vitro Effects of Cyclosporine A and Tacrolimus on Regulatory T-Cell Proliferation and Function

Céline Miroux,<sup>1</sup> Olivier Morales,<sup>1</sup> Khaldoun Ghazal,<sup>2</sup> Samia Ben Othman,<sup>2</sup> Yvan de Launoit,<sup>1</sup> Véronique Pancré,<sup>1</sup> Filomena Conti,<sup>2,3,4,5</sup> and Nadira Delhem<sup>1</sup>

**Background.** Liver transplantation is the treatment of end-stage liver diseases, including hepatitis C. Immunosuppression prevents graft rejection but seems to accelerate the recurrence of hepatitis C. Regulatory T cells (Tregs) may be beneficial in tolerance but deleterious in recurrent hepatitis C. We evaluated the effects of cyclosporine or tacrolimus, the principal immunosuppressive drugs, on Treg proliferation and function.

**Methods.** Human Tregs were isolated from healthy donors and cultured with cyclosporine, tacrolimus, or NIM811, a cyclosporine analog devoid of calcineurin-inhibiting activity. Treg proliferation and suppressive activity were assessed. The phenotype, cytokine production, and phosphorylation profile of nuclear factor of activated T cell of Tregs were also analyzed.

**Results.** Cyclosporine and tacrolimus both decreased Treg proliferation, but only low doses of cyclosporine reduced Treg activity, by inducing the production of interleukin 2 proinflammatory cytokines in these cells. Moreover, NIM811 also inhibited Treg activity. The phosphorylation of nuclear factor of activated T cell in Tregs was not altered by cyclosporine, suggesting that the effects of this drug are independent of the calcineurin pathway.

**Conclusion.** In summary, low doses of cyclosporine inhibit Treg activity, a finding that might explain the beneficial effect of this drug on hepatitis C recurrence. In contrast, by maintaining Treg activity, tacrolimus could be more helpful than cyclosporine in controlling rejection.

**Keywords:** Regulatory T cells, Cyclosporine A, HCV, Transplantation.

(*Transplantation* 2012;94: 123–131)

**L**iver transplantation (LT) is the treatment of end-stage liver diseases, and long-term survival rates are now ex-

cellent. The immunosuppressive therapies used at present after LT and intended to reduce the incidence of rejection, include calcineurin inhibitors such as cyclosporine A (CsA) and tacrolimus (Tac). Tac is more potent than CsA in reducing the incidence of acute and chronic rejection (1), and long-term follow-up has confirmed the benefits of Tac over CsA with respect to graft and patient survival (1, 2).

Graft rejection may be influenced by regulatory T cells (Tregs). Tregs account for 5% to 10% of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells; they constitutively express CD25 (3), can suppress host immune responses in the context of autoimmune diseases and transplantation (4, 5), and have been shown to be an essential component in immune tolerance (6). Treg suppressive mechanisms are mainly dependent on cell-to-cell contact, but the involvement of immunosuppressive cytokines such as interleukin (IL)-10 or transforming growth factor (TGF)- $\beta$  (7) is not excluded. The transcription factor FoxP3, expressed by Tregs, seems to be a master gene controlling Treg development (8), most FoxP3<sup>+</sup> Tregs being CD127<sup>low</sup> (9, 10). Tregs are naturally anergic to in vitro antigenic stimulation, and this state is closely linked to their suppressive activity (11). The IL-2/IL-2 receptor pathway seems to be important in the activity and expansion of Tregs (12, 13).

In the post-organ transplantation setting, several experimental studies have demonstrated that Tregs may induce allograft tolerance (14, 15). It has also been shown that Treg levels fall significantly after LT, especially during allograft

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales to C.M. and N.D.; grants from Astellas France to K.G., S.B.O., and F.C.; and grants from the Comité du Nord de la Ligue contre le cancer to O.M. and V.P.

The authors declare no conflicts of interest.

<sup>1</sup> CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille, Universités Lille Nord de France, Lille, France.

<sup>2</sup> UPMC Univ Paris 06 & INSERM, UMR\_S 938, CdR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France.

<sup>3</sup> AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Pôle Digestif, Centre de Transplantation Hépatique, Paris, France.

<sup>4</sup> Faculté de Médecine René Descartes, Université Paris 5, Paris, France.

<sup>5</sup> Address correspondence to: Filomena Conti, M.D., Ph.D., Centre de Transplantation Hépatique, Hôpital Saint-Antoine, Rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France.

E-mail: filomena.conti@sat.aphp.fr

C.M., F.C., and N.D. participated in making the research design, writing the article, performing the research, contributing new reagents or analytic tools, and analyzing data. O.M. participated in performing the research and contributing new reagents or analytic tools. K.G. and S.B.O. participated in analyzing data. Y.D.L. participated in making the research design. V.P. participated in making the research design and analyzing data.

F.C. and N.D. contributed equally to this work.

Received 5 October 2011. Revision requested 31 October 2011.

Accepted 4 April 2012.

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/12/9402-123

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182590d8f

*Transplantation* • Volume 94, Number 2, July 27, 2012

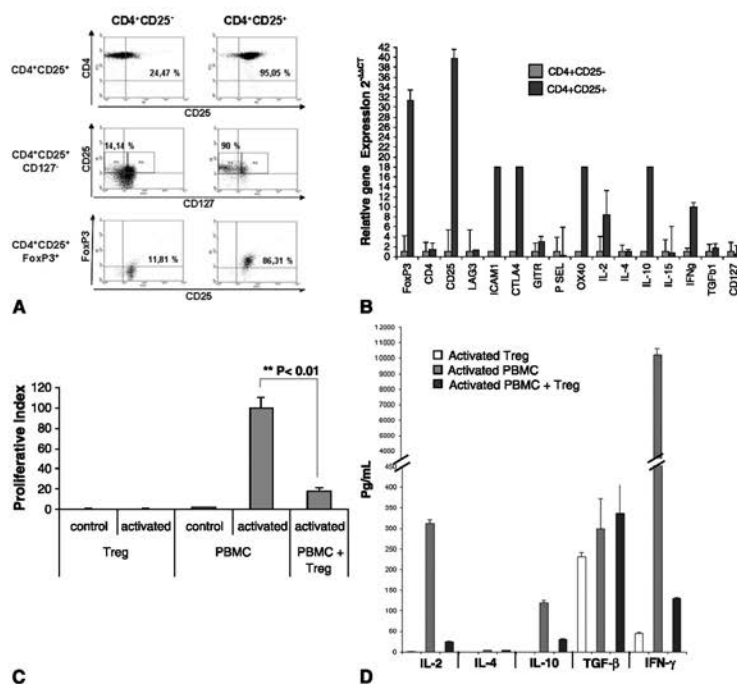
www.transplantjournal.com | 123

rejection (16), and that the reduction in circulating Tregs is counterbalanced by an intra-graft increase (17). Tregs are influenced by immunosuppressive therapy; in particular, calcineurin inhibitors seem to reduce Treg function in vitro (18).

However, graft function and long-term survival are also largely affected by the recurrence of hepatitis C, the main indication of LT. Indeed, hepatitis C virus (HCV) infection of the graft is universal, and graft damage is accelerated, leading to cirrhosis in 20% to 30% of patients within 5 years and reduced patient survival compared with other indications (20, 21). The mechanisms of accelerated HCV-induced liver damage after LT are poorly understood. The main factors determining the severity of recurrent hepatitis C include immunosuppressive therapy (22) and the proportion of Tregs (23). Concerning im-

munosuppressive therapy, a recent randomized pilot study evaluating CsA versus Tac in liver transplant recipients showed that a switch from Tac to CsA therapy could have a beneficial effect on hepatitis C recurrence by reducing HCV-RNA levels and favoring the response to antiviral therapy (24).

An increased frequency of Tregs was recently described in the blood of patients with persistent HCV infection when compared with those who had cleared HCV (25, 26). It has been proposed that Tregs contribute to HCV persistence by suppressing HCV-specific T-cell responses (27, 28). Some studies have shown a correlation between a reduced HCV-specific T-cell response and the secretion of IL-10 and TGF- $\beta$  by liver-infiltrating Tregs (25) and that Tregs may inhibit HCV-specific T-cell activity in a cell-to-cell contact manner



**FIGURE 1.** Phenotypic and functional characterization of freshly isolated regulatory T cells (Tregs). A, The cell purity of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fraction was analyzed by fluorescence-activated cell sorter and was superior to 95%, based on CD4 and CD25 expression, whereas CD25<sup>-</sup> cells expressed intermediate or no CD25 levels. Ninety percent of freshly isolated Tregs were CD127<sup>-</sup>/low, whereas in the CD25<sup>-</sup> fraction, most cells were CD127<sup>+</sup>. FoxP3 expression was higher than 80% in the isolated Tregs fraction and only 10% in the CD25<sup>-</sup> fraction. B, Quantitative polymerase chain reaction analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-associated gene expression showed that genes such as *FoxP3*, *CD25*, *ICAM1*, *GITR*, and *OX-40* were overexpressed in freshly isolated Tregs when normalized to housekeeping genes and compared with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> gene expression. C, The proliferation of cells activated with anti-CD3 and anti-CD28 was measured after 48 hr of culture by <sup>3</sup>H thymidine incubation. Freshly isolated Tregs were anergic to in vitro activation, whereas peripheral blood monocyte cells (PBMCs) were able to proliferate in the presence of 1- $\mu$ g/mL anti-CD3 and 100-ng/mL anti-CD28. In a mixed leukocyte reaction of activated PBMCs and Tregs, at a ratio of 2:1, freshly isolated Tregs suppressed PBMC proliferation by approximately 82%. D, The cytokine secretion of PBMCs was measured by enzyme-linked immunosorbent assay after 48 hr of mixed leukocyte reaction. The inhibition of PBMC proliferation correlated with an inhibition of the production of cytokines such as interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- $\gamma$ , and IL-10. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  production was not inhibited. CTLA, cytotoxic T-lymphocyte antigen; LAG, lymphocyte-activation gene; P-SEL, P-selectin.



(25, 26). It has also been shown that Treg levels are significantly enhanced in recurrent hepatitis C and that Treg type 1 cell levels are specifically higher in severe recurrent hepatitis C (23). These findings suggest that Tregs may be implicated in the pathogenesis of HCV recurrence.

Tregs thus exert a dual effect after LT: a beneficial role in inducing tolerance but a deleterious effect in recurrent hepatitis C. During this study, we therefore evaluated the in vitro effects of CsA or Tac on Treg proliferation and function. We observed that low doses of CsA, not of Tac, impaired the function of Tregs, probably by inducing the secretion of cytokines such as IL-2 and interferon (IFN)- $\gamma$  in these cells. These findings contribute to explaining the weaker progression of the viral disease and the enhanced antiviral response in liver transplant recipients under CsA during recurrent hepatitis C, while Tac could be superior to CsA in preventing rejection by maintaining Treg activity.

## RESULTS

### Phenotypic Characterization of Freshly Isolated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs

Flow cytometry and quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) analysis of Treg markers were used to

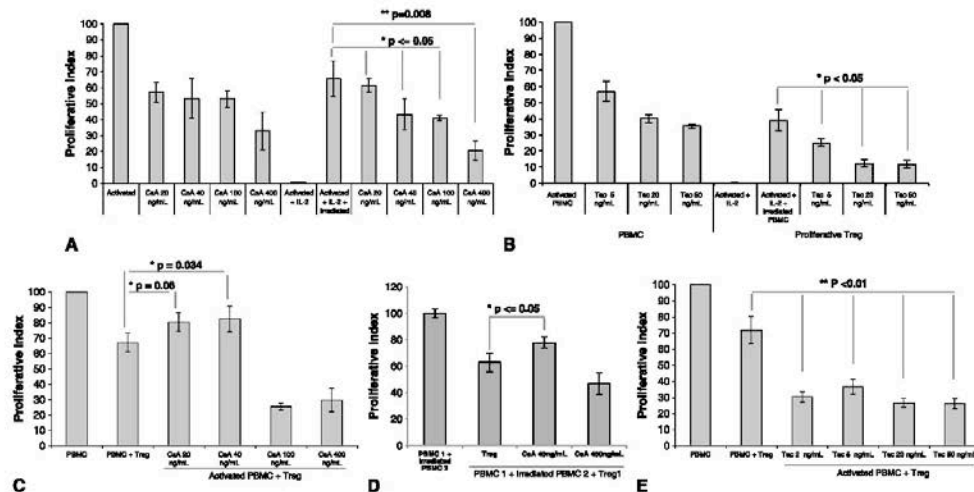
discriminate between CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells and to assess the purity of freshly isolated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. Treg-associated proteins CD25, CD127, and FoxP3 were assessed by flow cytometry. Based on the expression of CD4<sup>+</sup> and CD25<sup>+</sup>, Treg purity was superior to 95% (Fig. 1A). Only 14% of CD25<sup>-</sup> cells were CD127<sup>-</sup>, whereas 90% of Tregs were CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD127<sup>-</sup>. In addition, 80% of the isolated Tregs expressed FoxP3, whereas only 12% of the CD25<sup>-</sup> fraction was FoxP3<sup>+</sup> (Fig. 1A).

The evaluation of Treg-specific gene expression by Q-PCR showed that most Treg-specific messenger RNA and particularly FoxP3, CD25, ICAM1, GITR, and OX-40 were overexpressed in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs isolated when compared with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells (Fig. 1B).

### Functional Characterization of Isolated Tregs

As previously described (11), we observed that isolated Tregs were anergic after activation with anti-CD3 and anti-CD28, whereas peripheral blood monocyte cells (PBMCs) were able to proliferate (Fig. 1C).

Isolated Tregs were able to significantly suppress PBMC proliferation ( $P < 0.01$ ) in a mixed leukocyte reaction (MLR) performed with activated PBMCs and Tregs at a 2:1 ratio. Tregs inhibited, in average, 80% of PBMC proliferation



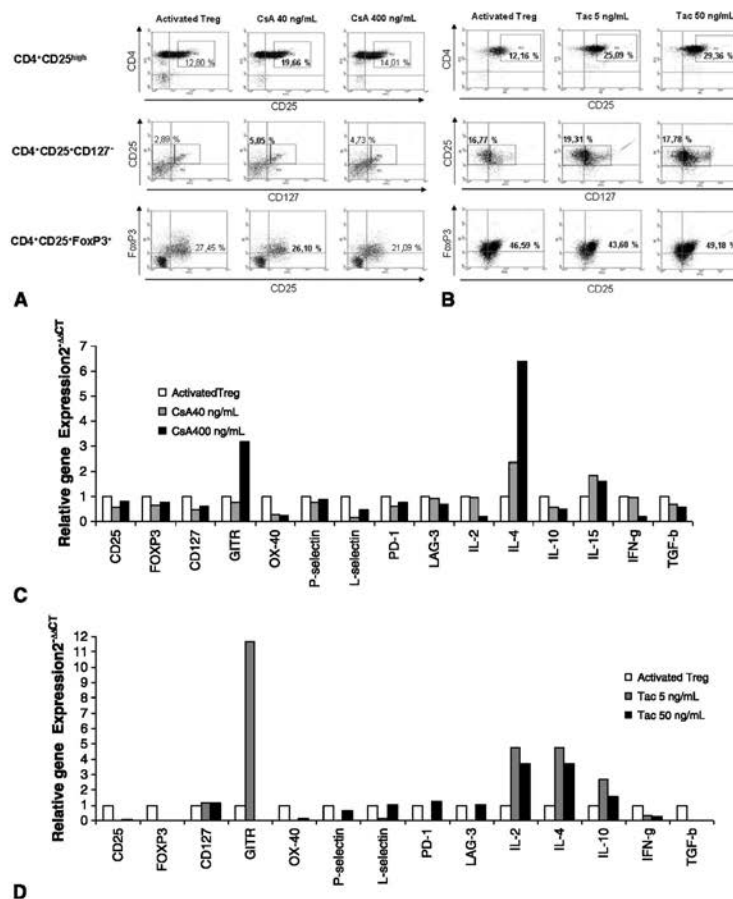
**FIGURE 2.** Effects of cyclosporine A (CsA) and tacrolimus (Tac) on regulatory T cell (Treg) proliferation and activity. Peripheral blood monocyte cell (PBMC) proliferation, induced by in vitro stimulation with anti-CD3 and anti-CD28, was inhibited by CsA (A) and Tac (B) in a dose-dependent manner. PBMC proliferation was determined by <sup>3</sup>H thymidine incubation. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells proliferated in the presence of anti-CD3, anti-CD28, high-dose interleukin (IL)-2 (300 U/mL), and irradiated autologous PBMCs at a 1:1 ratio. Treg proliferation was inhibited dose-dependently by the different immunosuppressive drugs. Mixed leukocyte reaction (MLR) of PBMCs and Tregs (C) at a 2:1 ratio were assessed in the presence of different doses of CsA. PBMC proliferation was significantly higher in MLR in the presence of 20- and 40-ng/mL CsA ( $P=0.06$  and  $P=0.034$ , respectively) than in the absence of the drug, suggesting that low doses of CsA inhibit Treg function. The immunosuppressive capacity of Tregs was conserved when 100- and 400-ng/mL CsA or different Tac concentrations were added to the cultures. Mixed leukocyte allo-reaction (Allo-MLR) of PBMCs and Tregs (D) at a ratio of 2:1 confirmed that CsA inhibited Treg suppressive activity at a concentration of 40 ng/mL. Although no inhibition of Treg suppressive capacity was observed with a concentration of 400-ng/mL CsA (E), MLR of PBMCs and Tregs at a 2:1 ratio showed that Tac addition (from 2 to 50 ng/mL) did not inhibit Treg suppression and induced a highly significant decrease of PBMC proliferation ( $P < 0.01$ ).

(Fig. 1C). This suppressive effect was associated with an inhibition of cytokine production in the MLR supernatant: the secretion of IL-2, IFN- $\gamma$ , and IL-10 by PBMCs was inhibited by Tregs, but in contrast, TGF- $\beta$  secretion was not inhibited (Fig. 1D).

The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> fraction did not suppress proliferation or cytokine secretion by activated PBMCs (data not shown).

**Calcineurin Inhibitors Reduced the Proliferation of PBMCs and Tregs**

PBMCs and isolated Tregs were activated and cultured with different doses of CsA or Tac. CsA and Tac both inhibited the proliferative capacity of PBMCs in a dose-dependent manner (Fig. 2A,B). This inhibition was approximately 50% (SD, 12%) with 20- to 40-ng/mL CsA, 70% (11%) with



**FIGURE 3.** Expression of regulatory T-cell (Treg)-associated markers in cyclosporine A (CsA) or tacrolimus (Tac)-treated cultures. A, The expression of CD25, CD127, and FoxP3, proteins associated with Tregs, was assessed by a three-color flow cytometry in a CsA-treated assay. A small increase in CD25 expression and a small decrease in FoxP3 expression were observed in the presence of low-dose CsA (40 ng/mL). In the presence of 400-ng/mL CsA, the expression of CD25 and FoxP3 was increased. B, The expression of CD25, CD127, and FoxP3 was assessed in an independent Tac-treated assay. An increase in the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells was observed in the presence of 5- or 50-ng/mL Tac. The different doses of Tac did not affect the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> cells or FoxP3 expression. C, The direct effect of CsA on activated Treg gene expression was also analyzed by quantitative polymerase chain reaction. No changes to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> gene expression were observed in the presence of low doses of CsA. CsA used at 400 ng/mL increased IL-4 and GITR gene expression. D, The direct effect of Tac on activated Treg gene expression was also analyzed by quantitative polymerase chain reaction. In the presence of 5-ng/mL Tac, the gene expression of *GITR* was increased. LAG, lymphocyte-activation gene; IFN, interferon; IL, interleukin; PD, programmed death; TGF, transforming growth factor.

400-ng/mL CsA (Fig. 2A), 45% (6%) with 2- and 5-ng/mL Tac, and approximately 60% (4%) with 20- to 50-ng/mL Tac (Fig. 2B). Tregs proliferated in the presence of anti-CD3, anti-CD28, IL-2 (300 U/mL), and autologous irradiated PBMCs (Fig. 2A), as previously shown (29, 30). The proliferation of isolated Tregs was inhibited by CsA in a dose-dependent manner. The inhibition of Treg proliferation was statistically significant approximately 35% (10%) with 40-ng/mL CsA ( $P<0.05$ ) and 70% (6%) with 400-ng/mL CsA ( $P=0.008$ ) (Fig. 2A). Treg proliferation was also significantly inhibited by Tac, approximately 70% at all concentrations ( $P<0.05$ ) (Fig. 2B).

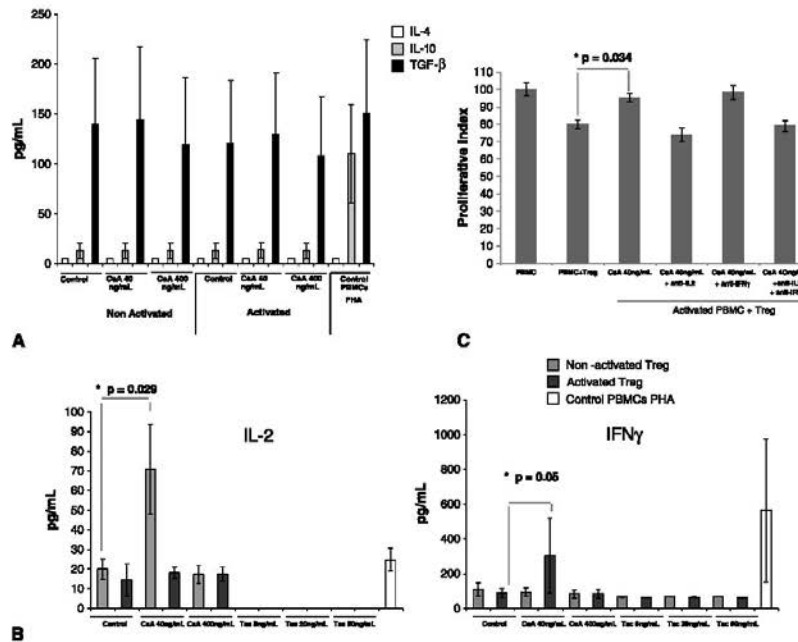
#### Low Doses of CsA (20 and 40 ng/mL), Not Tac, Inhibit the Suppressive Activity of Tregs

In this study, Tregs inhibited PBMC proliferation by 33% (6.2%) in an MLR performed with anti-CD3/anti-CD28-activated PBMCs and autologous Tregs at a ratio of 2:1 (Fig. 2C). CsA inhibited Treg suppressive activity at a concentration of 20 ng/mL, but this inhibition became

significant with 40 ng/mL (20% [6.2%] inhibition of PBMC proliferation with 20-ng/mL CsA vs. 33% [6.2%] in controls,  $P=0.06$ ; 17% [8.4%] inhibition of PBMC proliferation with 40 ng/mL,  $P=0.034$  vs. controls) (Fig. 2C). However, with 100- or 400-ng/mL CsA or with all doses of Tac used in the culture assay, no inhibition of Treg suppressive capacity was observed (Fig. 2C).

In mixed leukocyte allo-reaction (allo-MLR), we confirmed results obtained in anti-CD3/anti-CD28 activation conditions. Tregs inhibited PBMC proliferation by 37% (5.2%) in an MLR performed with PBMCs from donor 1, irradiated PBMCs from donor 2, and Tregs from donor 1, at a ratio of 2:1 (Fig. 2D). CsA inhibited Treg suppressive activity at a concentration of 40 ng/mL (22% [5.8%] inhibition of PBMC proliferation vs. 37% [5.2%] in controls) (Fig. 2D). However, with 400-ng/mL CsA, no inhibition of Treg suppressive capacity was observed (Fig. 2D).

In contrast, whatever the concentration of Tac used in the culture assay, no inhibition of Treg suppressive capacity was observed (Fig. 2E). Statistical analysis confirmed that,



**FIGURE 4.** Regulatory T cell (Treg) cytokine profile in the presence of cyclosporine A (CsA) or tacrolimus (Tac). A, Supernatants of cultures in the presence or absence of CsA were collected at 48 hr, and cytokines were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay. No changes to interleukin (IL)-4, IL-10, or transforming growth factor (TGF)  $\beta$  secretion were observed in the presence of different doses of CsA. B, Secretion of the proinflammatory cytokines IL-2 and interferon (IFN)- $\gamma$  increased significantly when 40-ng/mL CsA was added to the culture ( $P=0.029$  and  $P=0.05$ , respectively). C, Mixed leukocyte reaction in the presence or absence of CsA (40 ng/mL) and in the presence or absence of anti IL-2 or anti IFN- $\gamma$  was performed in two independent experiments. A low dose of CsA (40 ng/mL) inhibited Treg suppressive activity. Blocking IL-2 can restore Treg suppressive activity, while anti IFN- $\gamma$  did not induce any difference compared with CsA (40 ng/mL) basal condition. Using both the anti IL-2 and anti IFN- $\gamma$  induces a suppression level equivalent to the condition of classic mixed leukocyte reaction (peripheral blood monocyte cell [PBMC] + Treg). PHA, phytohemagglutinin.

contrary to CsA, Tac addition (from 2 to 50 ng/mL) induced a highly significant decrease of PBMC proliferation in MLR condition ( $P < 0.01$ ). Note that such experiment did not allow concluding whether Tac potentiates the suppressive activity of Treg (Fig. 2E).

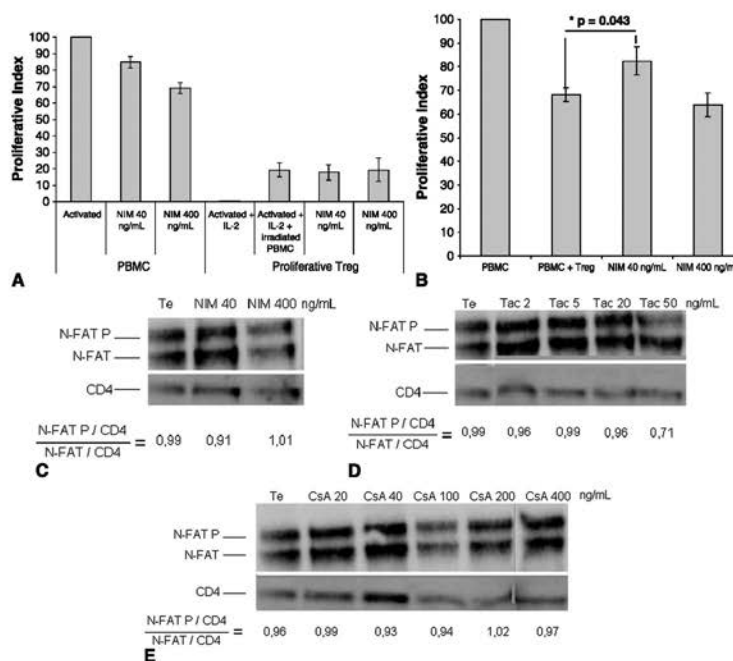
**Low Doses of Both CsA and Tac Do Not Change the Treg Phenotype**

The expression of Treg-associated proteins, including CD25, CD127, and FoxP3, was assessed. Some insignificant changes were observed with low-dose CsA (Fig. 3A), such as a small increase in CD25 expression, particularly CD25<sup>high</sup> (19.6% vs. 12.8% in controls), and a small decrease in FoxP3 expression in the presence of 40-ng/mL CsA (26.1% vs. 27.4% in controls) (Fig. 3A). All Tac concentrations increased the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> fraction and did not induce significant modifications to CD127 or FoxP3 expression (Fig. 3B).

CsA (40 ng/mL) or Tac did not induce significant changes in the expression of the messenger RNA of Treg-associated markers (Fig. 3C,D).

**Low Doses of CsA, Not Tac, Switch the Cytokine Profile of Tregs to a Proinflammatory Profile**

Tregs from three different donors were cultured in the presence or absence of CsA or Tac, and the supernatants were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for cytokine secretion. We did not observe any significant changes in the secretion of IL-4, IL-10, or TGF- $\beta$  between CsA-treated, Tac-treated, or untreated cells (Fig. 4A). By contrast, the levels of IL-2 and, particularly, IFN- $\gamma$  proinflammatory cytokines were significantly higher in the supernatants of Treg cultures performed in the presence of 40-ng/mL CsA than it was in control cultures (Fig. 4B). The IL-2 level rose from 19.9 (5.14) in controls to 70.9 (23) pg/mL



**FIGURE 5.** Cyclosporine A (CsA) inhibits regulatory T cells (Tregs) activity independently of the calcineurin pathway. **A**, NIM811, a CsA analog devoid of calcineurin-inhibiting activity, inhibits peripheral blood monocyte cell (PBMC) proliferation, induced by in vitro stimulation, in a dose-dependent manner. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> proliferation was inhibited dose-dependently by NIM811. **B**, A mixed leukocyte reaction of PBMCs and CD25<sup>+</sup> at a 2:1 ratio was assessed in the presence of different doses of NIM811, and the proliferation of activated PBMCs was measured after 48 hr of culture. PBMC proliferation was significantly higher in mixed leukocyte reaction in the presence of 40-ng/mL NIM811 than in the absence of this drug ( $P = 0.043$ ). The immunosuppressive capacity of Tregs was conserved with 400-ng/mL NIM811. **C**, Western blotting analysis of the phosphorylation profile of nuclear factor of activated T cell (NFAT) of activated Tregs was performed in the presence of different doses of CsA, tacrolimus (Tac), and NIM811 after 48 hr of culture. Each band was compared with the housekeeping gene CD4. The ratio of phosphorylated NFAT (NFAT P) to NFAT was evaluated using the Multi Gauge analysis. In the presence of different doses of NIM811, no modification to the dephosphorylation of NFAT protein was observed (NFAT P/NFAT=1). **D**, In the culture with Tac, only the higher concentration of Tac (50 ng/mL) decreased the NFAT P-to-NFAT ratio to 0.71. Tac 50 ng/mL increased the dephosphorylation of NFAT protein. **E**, The phosphorylation and dephosphorylation of NFAT protein were not affected in the presence of 20 or 40 ng/mL-CsA (NFAT P/NFAT=1). interleukin, IL; Te, control.



with CsA 40 ng/mL ( $P=0.029$ ) in inactivated Tregs (Fig. 4B). IFN- $\gamma$  levels rose from 90 (26.7) in controls to 302 (200) pg/mL in the presence of CsA 40 ng/mL ( $P=0.05$ ) in activated Tregs (Fig. 4B). By contrast, 400-ng/mL CsA (Fig. 4B) and all doses of Tac (Fig. 4B) showed no effect on the production of these cytokines.

#### Anti-IL-2 Restores the Suppressive Activity of Tregs in the Presence of Low Doses of CsA

MLR in the presence or absence of CsA (40 ng/mL) and in the presence or absence of anti-IL-2 or anti-IFN- $\gamma$  was performed in two independent experiments. In these experiments (Fig. 4C), we confirmed that a low dose of CsA (40 ng/mL) inhibited Treg suppressive activity (unblocked condition). Very interestingly, in the same condition but in the presence of anti-IL-2, we clearly observed that blocking IL-2 can restore Treg suppressive activity. In contrast, in the presence of anti-IFN- $\gamma$ , we did not observe any difference compared with CsA (40 ng/mL) basal condition, and we still observed an inhibition of Treg activity. Finally, using both the anti-IL-2 and anti-IFN- $\gamma$ , we found a suppression level equivalent to the condition of classic MLR (PBMC in the presence of Treg).

#### Low Doses of CsA Inhibit Treg Activity Independently of the Calcineurin Pathway

In T cells, CsA inhibits IL-2 transcription by blocking the calcineurin pathway through its bond to cyclophilin A. In order to determine whether the inhibitory effect of CsA on Treg activity also involves the calcineurin pathway, MLR was conducted in the presence of NIM811, a CsA analog that binds to and inhibits cyclophilins but is devoid of calcineurin-inhibiting activity (31). NIM811 inhibited Treg proliferation in a dose-dependent manner (Fig. 5A). Furthermore, similar to CsA, NIM811 was able to significantly inhibit Treg activity at the low dose of 40 ng/mL (21% [6%] PBMC inhibition with 40 ng/mL vs. 32% [2.5%] in controls;  $P=0.043$ ) but not at higher doses (Fig. 5B).

In parallel, Western blotting analysis was performed to assess the phosphorylation profile of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in activated Tregs, in the presence of CsA, Tac, and NIM811. The ratio of phosphorylated NFAT (NFAT P) to NFAT was evaluated using Multi Gauge analysis. No modifications to the NFAT protein phosphorylation profile were observed (NFAT P/NFAT=1) in the presence of NIM811 (Fig. 5C) or CsA (Fig. 5E). Only with 50-ng/mL Tac was a decrease seen in the NFAT P-to-NFAT ratio to 0.71, suggesting that Tac 50 ng/mL decreased the dephosphorylation of NFAT proteins (Fig. 5D).

Taken together, these data suggest that CsA impairs Treg activity independently of the calcineurin/NFAT pathway.

### DISCUSSION

This study was carried out to verify whether calcineurin inhibitors (Tac and CsA) reduced the number, proliferation, or activity of Tregs, which might impair the establishment of immune tolerance or even favor a recurrence of severe hepatitis C. Our data suggest that Tac and CsA inhibit Treg proliferation but that only CsA inhibits Treg activity as previously published (32–34). Our main finding is that CsA, used at low doses

similar to those used long term after LT, probably affects Treg activity by inducing the production of proinflammatory cytokines in those cells, such as IL-2 and IFN- $\gamma$ . These results are in line with those of a study in a rat cardiac allograft model, where differential effects of CsA were observed as a function of the concentrations (32). During our study, Tac never affected Treg activity.

In this study, Tregs have been activated with anti-CD3/anti-CD28 to calibrate the stimulation and to obtain a reproducible activation. However, results have been confirmed with human allo-MLR cultures to validate the physiologic relevance of the findings.

Neither CsA nor Tac treatment changed the Treg phenotype. In accordance with other studies (35, 36), isolated Tregs did not produce IL-10 but secreted basal levels of IFN- $\gamma$  and IL-2, which were abrogated by anti-CD3 and anti-CD28 activation. No modification of suppressive cytokine (IL-10 and TGF- $\beta$ ) production was observed in the presence of CsA or Tac. However, with a low concentration of CsA, we observed a significant increase in the secretion of IL-2 and IFN- $\gamma$  proinflammatory cytokines. Actually, IL-2 blocking experiments suggested that the inhibition of Treg activity by low-dose CsA may have resulted from an induction of IL-2 by these cells, which could also explain the increased proliferation of PBMCs during MLR.

The mechanism of the inhibition of Treg activity by CsA was then investigated. NIM811, a CsA analog that strongly binds to and inhibits cyclophilin but is devoid of calcineurin-inhibiting activity (31), also inhibited Treg activity. Moreover, the NFAT phosphorylation profile was not altered in the presence of CsA, suggesting that CsA reduces Treg function through a calcineurin-independent pathway.

These findings were unexpected insofar because the immunosuppressive effect of CsA is generally attributed to the prevention of IL-2 transcription (31). Analysis of the molecular and cellular mechanisms involved in the effects of low CsA doses on Tregs may provide a clearer understanding of how CsA abrogates Treg function. Bollyky et al. (37) showed that CD44 cross-linking promoted IL-2 secretion by Tregs in an NFAT-independent manner and that CD44 treatment bypassed CsA-mediated IL-2 inhibition. Moreover, FoxP3 is believed to inhibit IL-2 production through NFAT inhibition (38, 39), but in our hands, low doses of CsA did not induce any change in FoxP3 expression (Fig. 3). It now seems reasonable to determine whether CsA may promote IL-2 in an NFAT/calcineurin-independent manner. Especially because it has been shown in mice that the NFAT pathway is altered in Tregs with diminished calcineurin activity (40).

In summary, our data suggest that low doses of CsA, similar to those used in the context of long-term immunosuppressive therapy after LT, are able to inhibit Treg activity. Tregs play an important role in transplant tolerance, and the inhibition of Treg activity by CsA could explain why the latter does not accurately inhibit graft rejection when compared with Tac. By abrogating Treg function and favoring the development of effector T cells induced by the proinflammatory cytokines secreted by Tregs, CsA may favor the antiviral response against HCV and thus decrease the severity of HCV recurrence after LT, in accordance with the findings of recent studies where CsA was associated with less

severe recurrences of hepatitis C and a better response to antiviral therapy (24, 41–42).

These findings could explain why Tac is superior to CsA in preventing rejection by maintaining Treg activity and why CsA may decrease the severity of recurrent hepatitis C and enhance the antiviral response.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Cells

PBMCs from healthy donors were isolated using Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were isolated from the PBMCs using a magnetic-activated cell-sorting system (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany). The study was approved by the Institut de Biologie de Lille (CNRS) and Etablissement Français du Sang institutional review boards, and informed consent was obtained in writing for each donor.

### Culture Conditions and Drug Treatment

All cultures were conducted in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium supplemented with 2-mM L-glutamine 1%, 0.02-mM sodium pyruvate, 100-U/mL penicillin, 100- $\mu$ g/mL streptomycin, and 10% heat-inactivated Human AB Serum. The cultures were incubated in a humidified incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). CsA (Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) was used in cultures at 20, 40, 100, and 400 ng/mL, as previously published (43). Tac (Sigma-Aldrich) was used in cultures at 2, 5, 20, and 50 ng/mL. A CsA analog, NIM811 (Novartis Rueil-Malmaison, France) was used in the cultures at the same concentrations as CsA. The results are expressed as mean (SD) for four different experiments.

### Flow Cytometric Analysis

Cell phenotype was analyzed by flow cytometry (EPICS XL-MCL; Coulter, Villepinte, France). For membrane staining, the cells were washed and labeled with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: CD4 PE-Cy5 (BD Pharmingen, San Diego, California), CD25-PE (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), and CD127-fluorescein isothiocyanate (Clinisciences, Naterre, France). For intracellular staining, cells were labeled with surface monoclonal antibodies and then fixed and permeabilized using FoxP3 Staining Buffer Kit with anti-FoxP3 fluorescein isothiocyanate Miltenyi.

### Mixed Leukocyte Reaction

The suppressive activity of Tregs was measured by their ability to inhibit the proliferative response of autologous PBMCs in an MLR of 10<sup>5</sup> responder PBMCs and 6.10<sup>4</sup> CD25<sup>+</sup> cells (2:1 mixture). Assays were set up in a round-bottom 96-well plate culture in triplicate for 48 hr. Cells were activated with plate-bound anti-CD3 antibodies (1  $\mu$ g/mL), incubated at 37°C for 2 hr before the culture, and soluble anti-CD28 antibodies (100 ng/mL) (Clinisciences). Proliferation was measured after [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine (1  $\mu$ Ci per well; GE Healthcare, Aulnay sous Bois, France) incubation for the last 18 hr before harvesting. Radioactivity was determined using a  $\beta$ -counter (Wallac Trilux 1450; Turku, Finland). The results are expressed as a proliferative index and as a mean (SD) of four different experiments.

### Mixed Leukocyte Allo-Reaction

The suppressive activity of Tregs was measured by their ability to inhibit the proliferative response of autologous PBMCs in allo-MLR. Assays were set up with cultures of 10<sup>5</sup> responder PBMCs from donor 1 and 10<sup>5</sup> irradiated (50 Gy) PBMCs from donor 2 in a round-bottom 96-well plate cultured for 5 days. At day 5 of culture, we verified the formation of proliferation foci by microscopy, and then, 6.10<sup>4</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells from donor 1 were added (2:1 mixture), with CsA (40 or 400 ng/mL) for another two days of culture. Each proliferation assay was carried out in triplicate. Proliferation was measured as previously described. The results are expressed as a proliferative index and as a mean (SD) of three different experiments.

### IL-2 and IFN- $\gamma$ Blocking Assays

The suppressive activity of Tregs was measured by their ability to inhibit the proliferative response of autologous PBMCs in MLR assays in the presence or absence of CsA (40 ng/mL) and in the presence or absence of anti-IL-2 (50 ng/mL) or anti-IFN- $\gamma$  (5  $\mu$ g/mL), or combined anti-IL-2 (50 ng/mL) and anti-IFN- $\gamma$  (5  $\mu$ g/mL). The results are expressed as a proliferative index and as a mean (SD) of two independent experiments.

### Treg Proliferation Assay

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs proliferated in the presence of anti-CD3 (150 ng/mL), anti-CD28 (100 ng/mL), IL-2 (300 U/mL; PreproTech Inc, Rocky Hill, NJ), and autologous irradiated (50 Gy) PBMCs (29, 30). Each proliferation assay was measured as described in the section on MLR.

### Enzyme-linked Immunosorbent Assay

IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , and TGF- $\beta$  production was measured by ELISA after 48 hr of culture. Methods are described in Carpentier et al. (23). The samples and standards were run in duplicate. The results are expressed as mean (SD) for the three different experiments.

### Real-time Quantitative PCR

CD25<sup>+</sup> total RNA was isolated from fresh pellets using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and CD25<sup>-</sup> total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured by spectrometry, and complementary DNA was synthesized from 2- $\mu$ g/ $\mu$ L total RNA using the SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase kit (Invitrogen), according to the manufacturer's procedure. We used a real-time Q-PCR technique to quantify the amount of CD25, CD127, FoxP3, GITR, OX-40, LAG-3, P-selectin, L-selectin, programmed death 1, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , and the housekeeping genes used were  $\beta$ -actin, ubiquitin, GAPDH, and HPRT. Q-PCR was applied using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). The target message was quantified by measuring the threshold cycle using the LightCycler system (Roche Diagnostics). For each gene, a standard curve was prepared, and the housekeeping genes were used in each sample to control sample-to-sample variations.

The results were analyzed using the "relative gene expression method" as described by Livak et al. (44) and briefly described elsewhere (23).

### Western Blotting

Protein lysis experiments on 200,000 activated Tregs were performed in 30  $\mu$ L of lysis buffer by two freezing and thawing steps and 30 sec of sonication, after 48 hr of culture in the presence of the different drugs. Proteins were migrated on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis 12% to 14% Bis-Tris acrylamide gel (Invitrogen) for 90 min at 120 V and then electrotransferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 5% milk powder in 0.01% Tris-buffered saline/Tween 20 for 2 hr at room temperature. The membrane was then incubated overnight with the primary antibodies, rabbit anti-CD4 (SC-7219; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or mouse anti-NFAT (SC-7294; Santa Cruz Biotechnology), followed by incubation with the appropriate secondary antibody of either peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences). Immunoreactive proteins were visualized using Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer, Boston, MA) and using the LAS3000 Imaging system (LifeScience; Fujifilm, Dusseldorf, Germany). The results are the most representative of the three different experiments.

### Statistical Analysis

The relevance of proliferation assays MLR and ELISA results was validated using the statistical package SigmaStat for Windows 3.0.1 (SPSS, Ashburn, VA) and Sigma XL. All quoted *P* values are two-sided, with *P* < 0.05 (\*) and *P* < 0.01 (\*\*) being respectively considered statistically significant and highly significant.



## REFERENCES

- Haddad EM, McAlister VC, Renouf E, et al. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 4: CD005161.
- O'Grady JG. Prognostication in acute liver failure: a tool or an anchor? *Liver Transpl* 2007; 6: 786.
- O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 8: 801.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 4: 345.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18.
- Stephens LA, Mottet C, Mason D, et al. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001; 4: 1247.
- Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007; 3: 108.
- Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol* 2007; 1: 21.
- Secdiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 7: 1693.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 2006; 7: 1701.
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 9: 5317.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 11: 1142.
- D'Cruz LM, Klein L. Development and absence of agonist-induced CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 2005; 11: 1152.
- Velasquez-Lopera MM, Eaton VL, Llerret NM, et al. Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2008; 2: 127.
- Joffre O, Santolaria T, Calise D, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008; 1: 88.
- Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, et al. Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 2: 277.
- Stenard F, Nguyen C, Cox K, et al. Decreases in circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells and increases in intra-graft FOXP3<sup>+</sup> cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. *Pediatr Transplant* 2009; 1: 70.
- Zeiser R, Nguyen VH, Bellhack A, et al. Inhibition of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 2006; 1: 390.
- Curry MP. Hepatitis B and hepatitis C viruses in liver transplantation. *Transplantation* 2004; 7: 955.
- Velidedeoglu E, Mange KC, Frank A, et al. Factors differentially correlated with the outcome of liver transplantation in HCV+ and HCV- recipients. *Transplantation* 2004; 12: 1834.
- Berenguer M. Outcome of posttransplantation hepatitis C virus disease—is it the host, the virus, or how we modify the host and/or the virus? *Liver Transpl* 2002; 10: 889.
- Rodriguez-Luna H, Douglas DD. Natural history of hepatitis C following liver transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 4: 363.
- Carpentier A, Conti F, Stenard F, et al. Increased expression of regulatory T<sub>H</sub>1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9: 2102.
- Firpi RJ, Soldevila-Pico C, Morelli GG, et al. The use of cyclosporine for recurrent hepatitis C after liver transplant: a randomized pilot study. *Dig Dis Sci* 2010; 1: 196.
- Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 5: 1062.
- Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 12: 7852.
- Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al. T cells with a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 12: 7860.
- Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007; 12: 804.
- Earle KE, Tang Q, Zhou X, et al. In vitro expanded human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol* 2005; 1: 3.
- Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, et al. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25<sup>hi</sup> regulatory T cells. *Blood* 2004; 3: 895.
- Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, et al. NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analogue, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells. *Liver Int* 2007; 27: 1273.
- Kawai M, Kitade H, Mathieu C, et al. Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine A on the development of regulatory T cells in vivo. *Transplantation* 2005; 9: 1073.
- Wang H, Zhao L, Sun Z, et al. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation* 2006; 11: 1484.
- San Segundo D, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, et al. Calcineurin inhibitors affect circulating regulatory T cells in stable renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2006; 8: 2391.
- Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 2: 287.
- Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 4: 305.
- Bolyky PL, Falk BA, Long SA, et al. CD44 costimulation promotes FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol* 2009; 4: 2232.
- Bettelli E, Dastrange M, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 14: 5138.
- Torgerson TR, Genin A, Chen C, et al. FOXP3 inhibits activation-induced NFAT2 expression in T cells thereby limiting effector cytokine expression. *J Immunol* 2009; 2: 907.
- Sumpter TL, Payne KK, Wilkes DS. Regulation of the NFAT pathway discriminates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> helper T cells. *J Leukoc Biol* 2008; 3: 708.
- Rayhill SC, Barbeito R, Katz 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. *Transplant Proc* 2006; 10: 3625.
- Villamil F, Levy G, Grazi GL, et al. Long-term outcomes in liver transplant patients with hepatic C infection receiving tacrolimus or cyclosporine. *Transplant Proc* 2006; 9: 2964.
- Coenen JJ, Coenen HJ, van Rijsen E, et al. Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27<sup>+</sup> subset of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood* 2006; 3: 1018.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 4: 402.

## **Discussion et Conclusion**

Au cours des quatre travaux de ma thèse, j'ai voulu mieux comprendre le rôle des différentes sous-populations de cellules T régulatrices (Treg et Tr1) dans le contexte de la TH et dans le développement des lésions liées au virus de l'hépatite C après TH. Pour cela j'ai voulu savoir quel est le lien entre les différents types de cellules Treg et la réponse au traitement antiviral après TH, et si les Treg avaient un rôle à jouer dans l'efficacité du traitement antiviral. J'ai également analysé les Treg au cours la progression de la récurrence virale C et l'effet des immunosuppresseurs sur ces cellules.

Mon travail de thèse représente la continuité de travaux précédents réalisés au sein de mon équipe. Il a été montré précédemment que l'expression de différents marqueurs de cellules T et B, de molécules d'adhésion, de marqueurs d'apoptose et d'inflammation hépatique, est comparable et corrélée entre le sérum, les cellules mononuclées et les échantillons hépatiques, et donc que le sérum pourrait être utilisé pour l'évaluation de cette expression (Carpentier, Conti et al. 2009\*). Puis il a été montré une surexpression des marqueurs des Treg (plus particulièrement ceux des Tr1) chez les patients présentant une récurrence sévère du VHC après TH (Carpentier, Conti et al. 2009). Dans ce même travail, il a été trouvé que le niveau sérique de l'IL10, cytokine qui présente des effets suppresseurs et qui est caractéristique des Tr1, est significativement augmenté au cours de la récurrence sévère du VHC et que cette augmentation pourrait être prédictive de l'évolution vers la sévérité de la récurrence.

Dans le premier travail de ma thèse, en me basant sur les travaux mentionnés ci-dessus, j'ai montré qu'un taux élevé des cellules Tr1 représenté par un niveau d'expression sérique de CD49b (marqueur de surface des Tr1), avant l'introduction d'un traitement antiviral était significativement associé à une réponse virologique prolongée (SVR) au cours de la récurrence virale C après TH. En effet, les patients qui ont un taux faible de Tr1, avant l'introduction de la thérapie antivirale IFN- $\alpha$  / Ribavirine, disposent d'une meilleure chance de répondre à ce traitement par rapport aux patients qui ont un taux élevé de Tr1, cet effet était indépendant du génotype viral. Nos résultats montrent que les cellules Tr1CD49b+ pourraient jouer un rôle dans la récurrence virale C après TH et dans l'échec de la réponse au traitement antiviral. La mesure de CD49b dans le sérum pourrait être prédictive de la réponse au traitement antiviral et aider à identifier les patients à risque d'échec de traitement. L'arrivée de nouveaux



médicaments antiviraux à action directe et leur introduction dans les protocoles sans interféron rendra nécessaire d'évaluer leur impact sur les Treg.

Après les résultats obtenus dans les études précédentes, j'ai voulu évaluer les différents acteurs de la réponse immunitaire après la TH pour hépatite C, afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de la progression accélérée des lésions après TH. Nous avons évalué dans ce travail la corrélation entre Treg, Th1, 2 et 17 précoce (1 mois après la TH) et l'évolution vers une récurrence sévère de la récurrence virale C. Nous avons montré pour la première fois qu'un taux élevé de Treg, 1 mois après TH, est prédictif de la récurrence sévère à 1 an post-TH. Les patients dans cette étude ont été classés selon la sévérité de la récurrence virale C évaluée sur la biopsie réalisée un an après TH et classée selon le score de fibrose METAVIR ( $F \leq$  : minime et  $F > 1$  : sévère) sans tenir compte des traitements immunosuppresseurs. Il n'y avait pas de différence entre les deux groupes pour l'expression des marqueurs recherchés avant TH. Les Treg étaient significativement augmentés, 1 mois après TH, chez les patients qui évoluaient vers une forme sévère de la récurrence virale C. A un mois post-TH, nous n'avons pas constaté de différence significative pour les marqueurs des Tr1 (CD49b, CD18, LAG3), mais les Tr1 ont besoin de contact chronique avec les Ag du pathogène pour se développer. Un mois après TH, il est peut-être trop tôt pour avoir une augmentation de cette population cellulaire. Il a aussi été observé une augmentation de l'expression des molécules associées à la réponse Th1 dans le même groupe de patients qui évoluera vers une forme sévère et qui présente un nombre accru de Treg. Cette augmentation concomitante des marqueurs des populations effectrices et régulatrices pourrait suggérer un rôle de cellules Treg dans l'échec de développement de la réponse immunitaire antivirale. Cela ressemble à l'évolution de la primo-infection vers la chronicité où les Treg sont augmentés chez les patients ayant une infection chronique (Cabrera, Tu et al. 2004). L'évaluation précoce des Treg pourrait être prédictive du type de récurrence virale après TH, et aider à une meilleure prise en charge de ces patients identifiés précocement.

Tous ces travaux montrent l'importance des Treg dans le développement de la maladie de l'hépatite C après TH, mais dans ce contexte de transplantation d'organe, les immunosuppresseurs peuvent influencer les Treg qui peuvent avoir aussi un rôle bénéfique dans l'induction de tolérance. Plusieurs études avaient montré qu'il existe un impact de certaines drogues immunosuppressives sur la fréquence et la fonction des Treg *in vivo*, c'est le cas de la transplantation rénale (San Segundo, Ruiz et al. 2006), pulmonaire (Lange, Tran

et al. 2010), et hépatique (Demirkiran, Sewgobind et al. 2009, Levitsky, Miller et al. 2009). Dans les deux autres travaux de ma thèse, je me suis intéressé à l'effet des différents traitements utilisés après TH sur les cellules Treg *in-vivo* (troisième travail) et *in-vitro* (quatrième travail).

Dans le troisième travail, j'ai montré que, malgré leur rôle immunosuppresseur, les inhibiteurs de mTOR jouent un rôle paradoxal sur les Treg en induisant une augmentation de ces cellules régulatrices et une diminution des cellules effectrices. En fait, l'introduction d'un inhibiteur de mTOR, le Sirolimus ou l'Everolimus, à la place du Tacrolimus induit une augmentation des Treg tout en préservant leurs capacités suppressives. L'utilisation des inhibiteurs de mTOR chez certains patients sélectionnés pourrait représenter un intérêt particulier après TH et pourrait permettre d'une part, d'établir un état de tolérance envers le greffon tout en baissant la dose d'immunosuppresseur nécessaire, et d'autre part, grâce à ses propriétés antitumorales et à la diminution de l'immunosuppression, cette utilisation pourrait permettre de diminuer le taux de récurrence tumorale. Ces résultats sembleraient être préjudiciables pour les patients VHC+, puisque les Treg sont associés à la forme sévère de la récurrence, mais l'arrivée des nouveaux traitements antiviraux pourrait résoudre ce problème. Dans ce travail, nos résultats qui concernent le changement du traitement de Tac au sirolimus sont concordants avec ceux de Levitsky (Levitsky, Mathew et al. 2013), mais nous sommes les premiers à montrer que la conversion à l'everolimus induit aussi une augmentation des Treg fonctionnels.

Finalement dans le quatrième travail, j'ai évalué *in vitro* l'effet direct des inhibiteurs de calcineurine (Tac et CsA) sur l'activité des Treg. Nous avons montré que les deux molécules inhibent la prolifération des Treg *in-vitro*, mais seulement la CsA est capable d'inhiber l'activité suppressive de ces cellules, comme cela avait été suggéré (Kawai, Kitade et al. 2005, San Segundo, Ruiz et al. 2006, Wang, Zhao et al. 2006). La CsA affecte l'activité des Treg uniquement lorsqu'elle est utilisée à une faible dose (40 ng/mL, dose administrée à long terme), et que cette inhibition conduit à un shift cytokinique des Treg vers un profil Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ). Nos données suggèrent que de faibles doses de CsA, similaires à celles utilisées dans le contexte du traitement immunosuppresseur à long terme après LT, sont capables d'inhiber l'activité Treg. Ceci pourrait expliquer qu'elle soit moins efficace que le Tac dans la prophylaxie du rejet aigu. En diminuant la fonction Treg et favorisant le développement des cellules effectrices la CsA peut favoriser la réponse antivirale contre le

VHC et ainsi réduire la gravité de récurrence après TH, ceci est en accord avec les conclusions d'autres études où la CsA a été associée à des récurrences moins graves de l'hépatite C et à une meilleure réponse au traitement antiviral (Rayhill, Barbeito et al. 2006, Villamil, Levy et al. 2006, Firpi, Soldevila-Pico et al. 2010).

A travers tous ces travaux de recherche, nous avons réussi à mieux comprendre l'implication des Treg, qu'elles soient naturelles ou induites, dans la récurrence virale C après TH. Cette meilleure compréhension aidera dans la prise en charge des patients transplantés hépatiques pour une cirrhose virale C. Le fait de savoir quels sont les traitements immunosuppresseurs qui ont un effet favorable au développement des Treg permettra d'adapter le traitement aux nécessités de chaque patient.

Mon travail de thèse représente un croisement de plusieurs axes qui nécessitent encore de continuer les travaux de recherche. Et des études sont en cours pour continuer ce travail, en particulier, nous réaliserons une étude ancillaire d'une étude nationale multicentrique évaluant la conversion précoce de Tac à everolimus après TH et nous évaluerons de façon prospective les Treg, leur fonction, mais aussi les autres cellules régulatrices et les DC (Abstract AASLD Liver Meeting 2014). Cette étude sera multicentrique et comparera un groupe de patients convertis à des patients non convertis, ce qui augmentera la pertinence des résultats. Ces travaux nous permettront de mieux savoir comment utiliser les immunosuppresseurs, savoir quel est le meilleur moment pour introduire les inhibiteurs de mTOR, quels patients peuvent arriver à la tolérance opérationnelle et donc à l'arrêt complet du traitement immunosuppresseur. Les travaux in vitro vont également se poursuivre en évaluant les effets d'autres immuno suppresseurs (éverolimus...) sur les Treg mais aussi les Tr1.

Enfin, la meilleure connaissance des Treg dans l'immunité de la greffe hépatique permettra d'imaginer des projets visant à manipuler les populations régulatrices pour les utiliser à des fins de thérapie cellulaire.

**Abstract : Poster AASLD Liver Meeting 2014 (control ID 2027830)**

**Positive impact of everolimus on regulatory T cells after liver transplantation**

BARJON Clement, GHAZAL Khaldoun, Dahlqvist Géraldine, AOUDJEHANE Lynda, SALIBA F, DURAND F, DUVOUX Christophe, CALMUS Yvon, CONTI Filomena.

Liver transplantation remains the only treatment for terminal liver disease. However, immunosuppressive drugs required for allograft acceptance are intrinsically toxic and may be responsible for severe side effects such as opportunistic infections and malignancies.

Modulating the immune system of the host to induce tolerance of the graft is a promising new approach to reduce or even eliminate non specific immunosuppressive regimen. More particularly, promoting natural CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs and other regulatory cells population could be crucial in achieving operational tolerance.

Standard immunosuppressive treatments using calcineurin inhibitors such as tacrolimus have been shown to have a deleterious effect on Treg population. On the contrary, reports indicate that mTOR inhibitors may have a positive impact on Tregs and thus could favor the establishment of operational tolerance.

Here we present the first randomized prospective clinical study where Tregs levels from liver transplanted patients receiving either tacrolimus or everolimus were monitored during 6 months, starting from the day of transplantation.

A total of 30 patients from four centers were monitored. Blood samples were obtained at day 0, day 14, one month, three months and six months post-transplantation. Flow-cytometry immunophenotyping of Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>) was performed using freshly isolated PBMC. Tregs were isolated from PBMC using magnetic sorting to assess their immunosuppressive capacities when enough material was available. RNA were extracted from frozen PBMC for quantitative PCR.

Levels of Tregs were significantly reduced after one month of standard tacrolimus-based immunosuppressive regimen ( $p < 0,05$ ). At this point, patients treatments were either maintained with tacrolimus or converted to everolimus. Four months after conversion, levels of Treg from patients treated with everolimus was significantly higher than patients who remained under tacrolimus treatment ( $p < 0,02$ ). Additionally, we observed a strong tendency ( $p = 0,057$ ) for higher level of Tregs in HCV-infected patients compared to non infected patients within each treatment groups three months after transplantation. Functional assays demonstrated that Tregs conserved their capacity to suppress the proliferation of activated PBMC independently of the treatment and the time point.

This is the first clinical study to formally demonstrate the positive impact of everolimus on Tregs levels for liver transplanted patients compared to tacrolimus.

## ***DON'T LIVE A HALF LIFE***

*Don't sit with half-lovers.  
Don't endorse half-friends.  
Don't read for the half-talented.  
Don't live a half life.  
Don't die a half death.  
Don't choose a half solution.  
Don't stand in the middle of the truth.  
Don't dream a half dream. Don't hang on a half hope.*

*If you shut up, shut up till the end. And if you talked, talk till the end. Don't be silent, so that you can speak. And don't speak, so that you can be silent.  
If you were satisfied, express your gratitude. Don't fake a half gratitude. And if you are unsatisfied, express your disapproval. Because a half disapproval, is actually an approval.*

*The half is a life you didn't live. It is a word you didn't say. A smile you postponed. A love you couldn't attain. A friendship you didn't know.  
This half is what makes you strange even to the closet people around you. And It is what makes the closest people, strangers for you.  
The half is to reach and not to reach. To work and not to work .To leave and to arrive.  
The half is you, when you are not yourself....Because you didn't know who you are.  
The half is that you don't know who you are.  
And whom you love is not your other half. It is you in another place at the same time.  
Half a drink won't quench your thirst. Half a meal won't satisfy your hunger.  
Walking half of the road won't get you anywhere. Half of an idea won't give you a result.  
The half is your moment of weakness, but you are not weak!Because you are not a half human.  
You are a human. You were here to live a life, not to live a half life!*

***Gibran Khalil Gibran***

## Bibliographie

- Aandahl, E. M., J. Michaelsson, W. J. Moretto, F. M. Hecht and D. F. Nixon (2004). "Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens." *J Virol* **78**(5): 2454-2459.
- Abadja, F., C. Videcoq, E. Alamartine, F. Berthoux and C. Mariat (2009). "Differential effect of cyclosporine and mycophenolic acid on the human regulatory T cells and TH-17 cells balance." *Transplant Proc* **41**(8): 3367-3370.
- Abel, M., D. Sene, S. Pol, M. Bourliere, T. Poynard, F. Charlotte, P. Cacoub and S. Caillat-Zucman (2006). "Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection." *Hepatology* **44**(6): 1607-1616.
- Accapezzato, D., V. Francavilla, M. Paroli, M. Casciaro, L. V. Chircu, A. Cividini, S. Abrignani, M. U. Mondelli and V. Barnaba (2004). "Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection." *J Clin Invest* **113**(7): 963-972.
- Afdhal, N., K. R. Reddy, D. R. Nelson, E. Lawitz, S. C. Gordon, E. Schiff, R. Nahass, R. Ghalib, N. Gitlin, R. Herring, J. Lalezari, Z. H. Younes, P. J. Pockros, A. M. Di Bisceglie, S. Arora, G. M. Subramanian, Y. Zhu, H. Dvory-Sobol, J. C. Yang, P. S. Pang, W. T. Symonds, J. G. McHutchison, A. J. Muir, M. Sulkowski, P. Kwo and I. O. N. Investigators (2014). "Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection." *N Engl J Med* **370**(16): 1483-1493.
- Afdhal, N., S. Zeuzem, P. Kwo, M. Chojkier, N. Gitlin, M. Puoti, M. Romero-Gomez, J. P. Zarski, K. Agarwal, P. Buggisch, G. R. Foster, N. Brau, M. Buti, I. M. Jacobson, G. M. Subramanian, X. Ding, H. Mo, J. C. Yang, P. S. Pang, W. T. Symonds, J. G. McHutchison, A. J. Muir, A. Mangia, P. Marcellin and I. O. N. Investigators (2014). "Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection." *N Engl J Med* **370**(20): 1889-1898.
- Afonina, I. S., S. P. Cullen and S. J. Martin (2010). "Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B." *Immunol Rev* **235**(1): 105-116.
- Akl, A., N. D. Jones, N. Rogers, M. A. Bakr, A. Mostafa, M. El Shehawy el, M. A. Ghoneim and K. J. Wood (2008). "An investigation to assess the potential of CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T cells to regulate responses to donor alloantigens in clinically stable renal transplant recipients." *Transpl Int* **21**(1): 65-73.
- Alam, S. M., P. J. Travers, J. L. Wung, W. Nasholds, S. Redpath, S. C. Jameson and N. R. Gascoigne (1996). "T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection." *Nature* **381**(6583): 616-620.
- Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis and A. G. Betz (2004). "Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus." *Nat Immunol* **5**(3): 266-271.
- Anderson, C. F., R. Lira, S. Kamhawi, Y. Belkaid, T. A. Wynn and D. Sacks (2008). "IL-10 and TGF-beta control the establishment of persistent and transmissible infections produced by *Leishmania tropica* in C57BL/6 mice." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**: 4090-4097.
- Anderson, G. and Y. Takahama (2012). Thymic epithelial cells: Working class heroes for T cell development and repertoire selection. **33**: 256-263.

Andre, S., D. F. Tough, S. Lacroix-Desmazes, S. V. Kaveri and J. Bayry (2009). "Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications." Am J Pathol **174**(5): 1575-1587.

Annunziato, F. and S. Romagnani (2009). "Heterogeneity of human effector CD4+ T cells." Arthritis Res Ther **11**(6): 257-257.

Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein and H. von Boehmer (2002). "Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen." Nat Immunol **3**(8): 756-763.

Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." The Journal of experimental medicine **184**: 387-396.

Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman and F. Powrie (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." The Journal of experimental medicine **190**: 995-1004.

Augustine, J. J., K. A. Bodziak and D. E. Hricik (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." Drugs **67**(3): 369-391.

Azab, N. A., I. H. Bassyouni, Y. Emad, G. A. Abd El-Wahab, G. Hamdy and M. A. Mashahit (2008). "CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids." Clin Immunol **127**(2): 151-157.

Baban, B., P. R. Chandler, M. D. Sharma, J. Pihkala, P. A. Koni, D. H. Munn and A. L. Mellor (2009). "IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells." J Immunol **183**(4): 2475-2483.

Bacchetta, R., L. Passerini, E. Gambineri, M. Dai, S. E. Allan, L. Perroni, F. Dagna-Bricarelli, C. Sartirana, S. Matthes-Martin, A. Lawitschka, C. Azzari, S. F. Ziegler, M. K. Levings and M. G. Roncarolo (2006). "Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations." J Clin Invest **116**(6): 1713-1722.

Bacchetta, R., L. Passerini, E. Gambineri, M. Dai, S. E. Allan, L. Perroni, F. Dagna-Bricarelli, C. Sartirana, S. Matthes-Martin, A. Lawitschka, C. Azzari, S. F. Ziegler, M. K. Levings and M. G. Roncarolo (2006). "Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations." The Journal of clinical investigation **116**: 1713-1722.

Balandina, A., S. Lecart, P. Darteville, A. Saoudi and S. Berrih-Aknin (2005). "Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis." Blood **105**(2): 735-741.

Balbi, E., C. R. Leal, L. F. Pacheco-Moreira, F. S. Pousa, M. C. Covelo, A. C. Gonzalez, P. V. Oliveira, L. Agoglia, J. Roma, L. P. Carius and M. Enne (2009). "Treatment for recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation." Transplant Proc **41**(3): 891-894.

Battaglia, M., A. Stabilini, B. Migliavacca, J. Horejs-Hoeck, T. Kaupper and M. G. Roncarolo (2006). "Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients." J Immunol **177**(12): 8338-8347.

Battaglia, M., A. Stabilini and M. G. Roncarolo (2005). "Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells." Blood **105**(12): 4743-4748.

Beals, C. R., C. M. Sheridan, C. W. Turck, P. Gardner and G. R. Crabtree (1997). "Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3." Science **275**(5308): 1930-1934.

- Beissert, S., A. Schwarz and T. Schwarz (2006). "Regulatory T cells." J Invest Dermatol **126**(1): 15-24.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach and D. L. Sacks (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity." Nature **420**(6915): 502-507.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-21.
- Berenguer, M. (2002). "Natural history of recurrent hepatitis C." Liver Transpl **8**(10 Suppl 1): S14-18.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.
- Bevan, M. J. (2004). "Helping the CD8(+) T-cell response." Nat Rev Immunol **4**(8): 595-602.
- Boettler, T., H. C. Spangenberg, C. Neumann-Haefelin, E. Panther, S. Urbani, C. Ferrari, H. E. Blum, F. von Weizsacker and R. Thimme (2005). "T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection." J Virol **79**(12): 7860-7867.
- Boettler, T., H. C. Spangenberg, C. Neumann-Haefelin, E. Panther, S. Urbani, C. Ferrari, H. E. Blum, F. von Weizsacker and R. Thimme (2005). "T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection." Journal of virology **79**(12): 7860-7867.
- Boissonnas, A., L. Fetler, I. S. Zeelenberg, S. Hugues and S. Amigorena (2007). "In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor." J Exp Med **204**(2): 345-356.
- Boissonnas, A., A. Scholer-Dahirel, V. Simon-Blancal, L. Pace, F. Valet, A. Kissenpfennig, T. Sparwasser, B. Malissen, L. Fetler and S. Amigorena (2010). "Foxp3+ T Cells Induce Perforin-Dependent Dendritic Cell Death in Tumor-Draining Lymph Nodes." Immunity **32**: 266-278.
- Boissonnas, A., A. Scholer-Dahirel, V. Simon-Blancal, L. Pace, F. Valet, A. Kissenpfennig, T. Sparwasser, B. Malissen, L. Fetler and S. Amigorena (2010). "Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes." Immunity **32**(2): 266-278.
- Bolacchi, F., A. Sinistro, C. Ciaprini, F. Demin, M. Capozzi, F. C. Carducci, C. M. Drapeau, G. Rocchi and A. Bergamini (2006). "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." Clin Exp Immunol **144**(2): 188-196.
- Bolitho, P., I. Voskoboinik, J. A. Trapani and M. J. Smyth (2007). "Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin." Curr Opin Immunol **19**(3): 339-347.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit and E. Schmitt (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." J Exp Med **204**(6): 1303-1310.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. H?pner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. R??tzschke and K. Falk (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." Blood **110**: 1225-1232.



Braith, M., S. Harikrishnan, R. A. Robins, C. Nichols, A. J. Fahey, L. Showe and C. S. Constantinescu (2009). "Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis." Acta Neurol Scand **119**(4): 239-245.

Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.

Burmeister, Y., T. Lischke, A. C. Dahler, H. W. Mages, K.-P. Lam, A. J. Coyle, R. A. Kroccek and A. Hutloff (2008). "ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **180**: 774-782.

Burrell, B. E., Y. Nakayama, J. Xu, C. C. Brinkman and J. S. Bromberg (2012). "Regulatory T cell induction, migration, and function in transplantation." J Immunol **189**(10): 4705-4711.

Cabrera, R., Z. Tu, Y. Xu, R. J. Firpi, H. R. Rosen, C. Liu and D. R. Nelson (2004). "An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection." Hepatology **40**(5): 1062-1071.

Calmus, Y. (2009). "[Immunosuppression after liver transplantation]." Presse Med **38**(9): 1307-1313.

Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms and T. J. Ley (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-646.

Carpentier, A., F. Conti, M. Carriere, L. Aoudjehane, C. Miroux, O. Morales, Y. Calmus, H. Groux, C. Auriault, V. Pancre, N. Delhem and P. Podevin (2009\*). "Analysis of gene transcription in sera during chronic hepatitis C infection." J Med Virol **81**(3): 473-480.

Carpentier, A., F. Conti, F. Stenard, L. Aoudjehane, C. Miroux, P. Podevin, O. Morales, S. Chouzenoux, O. Scatton, H. Groux, C. Auriault, Y. Calmus, V. Pancre and N. Delhem (2009). "Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation." American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **9**(9): 2102-2112.

Carpentier, A., F. Conti, F. Stenard, L. Aoudjehane, C. Miroux, P. Podevin, O. Morales, S. Chouzenoux, O. Scatton, H. Groux, C. Auriault, Y. Calmus, V. Pancre and N. Delhem (2009). "Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation." Am J Transplant **9**(9): 2102-2112.

Carrier, Y., J. Yuan, V. K. Kuchroo and H. L. Weiner (2007). "Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice." J Immunol **178**(1): 179-185.

Casares, N., L. Arribillaga, P. Sarobe, J. Dotor, A. Lopez-Diaz de Cerio, I. Melero, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta and J. J. Lasarte (2003). "CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination." J Immunol **171**(11): 5931-5939.

Castello, G., S. Scala, G. Palmieri, S. A. Curley and F. Izzo (2010). "HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer." Clin Immunol **134**(3): 237-250.

Chang, J. T., V. R. Palanivel, I. Kinjyo, F. Schambach, A. M. Intlekofer, A. Banerjee, S. A. Longworth, K. E. Vinup, P. Mrass, J. Oliaro, N. Killeen, J. S. Orange, S. M. Russell, W. Weninger and S. L. Reiner (2007). "Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses." Science **315**(5819): 1687-1691.

Charbonnier, L. M., L. M. van Duivenvoorde, F. Apparailly, C. Cantos, W. G. Han, D. Noel, C. Duperray, T. W. Huizinga, R. E. Toes, C. Jorgensen and P. Louis-Plence (2006). "Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells." J Immunol **177**(6): 3806-3813.

Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.-J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." The Journal of experimental medicine **198**: 1875-1886.

Chen, X., J. J. Subleski, R. Hamano, O. M. Howard, R. H. Wiltout and J. J. Oppenheim (2010). "Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood." Eur J Immunol **40**(4): 1099-1106.

Cheng, G., J. Zhong and F. V. Chisari (2006). "Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8499-8504.

Clarke, S. L., G. J. Betts, A. Plant, K. L. Wright, T. M. El-Shanawany, R. Harrop, J. Torkington, B. I. Rees, G. T. Williams, A. M. Gallimore and A. J. Godkin (2006). "CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer." PLoS One **1**: e129.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**: 566-569.

Conteduca, V., D. Sansonno, S. Russi, F. Pavone and F. Dammacco (2014). "Therapy of chronic hepatitis C virus infection in the era of direct-acting and host-targeting antiviral agents." J Infect **68**(1): 1-20.

Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2008). "Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor." J Exp Med **205**(8): 1903-1916.

Cotovio, P., M. Neves, L. Santos, F. Macario, R. Alves and A. Mota (2012). "Conversion to everolimus in kidney transplant recipients: to believe or not believe?" Transplant Proc **44**(10): 2966-2970.

Cox, A. L., T. Mosbrugger, G. M. Lauer, D. Pardoll, D. L. Thomas and S. C. Ray (2005). "Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C." Hepatology **42**(1): 104-112.

Cozzo, C., J. Larkin and A. J. Caton (2003). "Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **171**: 5678-5682.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-949.

Curry, M. P. (2004). "Hepatitis B and hepatitis C viruses in liver transplantation." Transplantation **78**(7): 955-963.

Davidson, T. S., R. J. DiPaolo, J. Andersson and E. M. Shevach (2007). "Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells." J Immunol **178**(7): 4022-4026.

De Maria, A., M. Fogli, S. Mazza, M. Basso, A. Picciotto, P. Costa, S. Congia, M. C. Mingari and L. Moretta (2007). "Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients." Eur J Immunol **37**(2): 445-455.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom and S. C. Robson (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-1265.

Delhem, N., F. Cottrez, A. Carpentier, C. Miroux, O. Morales, V. Francois, H. Groux, C. Auriault and V. Pancre (2008). "Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression." Bull Cancer **95**(11): 1029-1038.

Delpuech, O., D. B. Buffello-Le Guillou, E. Rubinstein, C. Feray and M. A. Petit (2001). "The hepatitis C virus (HCV) induces a long-term increase in interleukin-10 production by human CD4+ T cells (H9)." European cytokine network **12**(1): 69-77.

Demirkiran, A., A. Kok, J. Kwekkeboom, J. G. Kusters, H. J. Metselaar, H. W. Tilanus and L. J. van der Laan (2006). "Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation." Liver Transpl **12**(2): 277-284.

Demirkiran, A., V. D. Sewgobind, J. van der Weijde, A. Kok, C. C. Baan, J. Kwekkeboom, H. W. Tilanus, H. J. Metselaar and L. J. van der Laan (2009). "Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells." Transplantation **87**(7): 1062-1068.

Dijke, I. E., W. Weimar and C. C. Baan (2008). "Regulatory T cells after organ transplantation: where does their action take place?" Hum Immunol **69**(7): 389-398.

Dimova, T., O. Nagaeva, A. C. Stenqvist, M. Hedlund, L. Kjellberg, M. Strand, E. Dehlin and L. Mincheva-Nilsson (2011). "Maternal Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy decidua: a phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples." Am J Reprod Immunol **66 Suppl 1**: 44-56.

Dong, C. (2006). "Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells." Nat Rev Immunol **6**(4): 329-333.

Dreux, M., U. Garaigorta, B. Boyd, E. Decembre, J. Chung, C. Whitten-Bauer, S. Wieland and F. V. Chisari (2012). "Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity." Cell Host Microbe **12**(4): 558-570.

Dunn, G. P., C. M. Koebel and R. D. Schreiber (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." Nat Rev Immunol **6**(11): 836-848.

Ebinu, J. O., S. L. Stang, C. Teixeira, D. A. Bottorff, J. Hooton, P. M. Blumberg, M. Barry, R. C. Bleakley, H. L. Ostergaard and J. C. Stone (2000). "RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras." Blood **95**(10): 3199-3203.

Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg and C. Mauri (2004). "Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy." J Exp Med **200**(3): 277-285.

Fantini, M. C., S. Dominitzki, A. Rizzo, M. F. Neurath and C. Becker (2007). "In vitro generation of CD4+ CD25+ regulatory cells from murine naive T cells." Nat Protoc **2**(7): 1789-1794.

Firpi, R. J., C. Soldevila-Pico, G. G. Morelli, R. Cabrera, C. Levy, V. C. Clark, A. Suman, A. Michaels, C. Chen and D. R. Nelson (2010). "The use of cyclosporine for recurrent hepatitis C after liver transplant: a randomized pilot study." Dig Dis Sci **55**(1): 196-203.

Fisson, S., G. Darrasse-Jèze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau and B. L. Salomon (2003). "Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state." The Journal of experimental medicine **198**: 737-746.

Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr and A. Y. Rudensky (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3." Immunity **22**: 329-341.

Fontenot, J. D. and A. Y. Rudensky (2005). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3." Nat Immunol **6**(4): 331-337.

Fujio, K., T. Okamura and K. Yamamoto (2010). "The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells." Adv Immunol **105**: 99-130.

Gagliani, N., C. F. Magnani, S. Huber, M. E. Gianolini, M. Pala, P. Licona-Limon, B. Guo, D. R. Herbert, A. Bulfone, F. Trentini, C. Di Serio, R. Bacchetta, M. Andreani, L. Brockmann, S. Gregori, R. A. Flavell and M. G. Roncarolo (2013). "Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells." Nat Med **19**(6): 739-746.

Garin, M. I., C. C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait and R. I. Lechler (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." Blood **109**(5): 2058-2065.

Gasteiger, G., S. Hemmers, M. A. Firth, A. Le Floch, M. Huse, J. C. Sun and A. Y. Rudensky (2013). "IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells." J Exp Med **210**(6): 1167-1178.

Gavin, M. A., J. P. Rasmussen, J. D. Fontenot, V. Vasta, V. C. Manganiello, J. A. Beavo and A. Y. Rudensky (2007). "Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation." Nature **445**: 771-775.

Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs and A. Y. Rudensky (2006). "Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**: 6659-6664.

Gerlach, J. T., H. M. Diepolder, M. C. Jung, N. H. Gruener, W. W. Schraut, R. Zachoval, R. Hoffmann, C. A. Schirren, T. Santantonio and G. R. Pape (1999). "Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C." Gastroenterology **117**(4): 933-941.

Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda and A. Zlotnik (1993). "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." J Immunol **150**(10): 4244-4252.

Golden-Mason, L., B. Palmer, J. Klarquist, J. A. Mengshol, N. Castelblanco and H. R. Rosen (2007). "Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction." Journal of virology **81**(17): 9249-9258.

Gorelik, L. and R. A. Flavell (2000). "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease." Immunity **12**(2): 171-181.

Gregori, S., M. Casorati, S. Amuchastegui, S. Smiroldo, A. M. Davalli and L. Adorini (2001). "Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance." J Immunol **167**(4): 1945-1953.

Groux, H. (2003). "Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses." Transplantation **75**(9 Suppl): 8S-12S.

Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-742.

Gruener, N. H., F. Lechner, M. C. Jung, H. Diepolder, T. Gerlach, G. Lauer, B. Walker, J. Sullivan, R. Phillips, G. R. Pape and P. Klenerman (2001). "Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus." J Virol **75**(12): 5550-5558.

Grutz, G. (2005). "New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression." J Leukoc Biol **77**(1): 3-15.

Haque, A., S. E. Best, F. H. Amante, S. Mustafah, L. Desbarrieres, F. de Labastida, T. Sparwasser, G. R. Hill and C. R. Engwerda (2010). "CD4+ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo." PLoS Pathog **6**(12): e1001221.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.

Hendrikx, T. K., J. H. Velthuis, M. Klepper, E. van Gorp, A. Geel, W. Schoordijk, C. C. Baan and W. Weimar (2009). "Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4 CD25 FoxP3 T cells in renal recipients." Transpl Int **22**(9): 884-891.

Hindley, J. P., C. Ferreira, E. Jones, S. N. Lauder, K. Ladell, K. K. Wynn, G. J. Betts, Y. Singh, D. A. Price, A. J. Godkin, J. Dyson and A. Gallimore (2011). "Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors." Cancer Res **71**(3): 736-746.

Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge and S. Hirohashi (2006). "Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions." Clin Cancer Res **12**(18): 5423-5434.

Hoechst, B., J. Gamrekashvili, M. P. Manns, T. F. Greten and F. Korangy (2011). "Plasticity of human Th17 cells and iTreg is orchestrated by different subsets of myeloid cells." Blood **117**(24): 6532-6541.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.

Hsieh, C.-S., H.-M. Lee and C.-W. J. Lio (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus.

Hsieh, C.-S., Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot and A. Y. Rudensky (2006). "An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires." Nature immunology **7**: 401-410.

Huang, B., P. Y. Pan, Q. Li, A. I. Sato, D. E. Levy, J. Bromberg, C. M. Divino and S. H. Chen (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." *Cancer Res* **66**(2): 1123-1131.

Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake and D. A. A. Vignali (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." *Immunity* **21**: 503-513.

Ishida, T., T. Ishii, A. Inagaki, H. Yano, H. Komatsu, S. Iida, H. Inagaki and R. Ueda (2006). "Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege." *Cancer Res* **66**(11): 5716-5722.

Itose, I., T. Kanto, N. Kakita, S. Takebe, M. Inoue, K. Higashitani, M. Miyazaki, H. Miyatake, M. Sakakibara, N. Hiramatsu, T. Takehara, A. Kasahara and N. Hayashi (2009). "Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis." *J Viral Hepat* **16**(12): 844-852.

Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.

Ji, X. J., C. J. Ma, J. M. Wang, X. Y. Wu, T. Niki, M. Hirashima, J. P. Moorman and Z. Q. Yao (2013). "HCV-infected hepatocytes drive CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T-cell development through the Tim-3/Gal-9 pathway." *Eur J Immunol* **43**(2): 458-467.

Joffre, O., T. Santolaria, D. Calise, T. Al Saati, D. Hudrisier, P. Romagnoli and J. P. van Meerwijk (2008). "Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes." *Nat Med* **14**(1): 88-92.

Kamal, S. M., C. S. Graham, Q. He, L. Bianchi, A. A. Tawil, J. W. Rasenack, K. A. Khalifa, M. M. Massoud and M. J. Koziel (2004). "Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis." *The Journal of infectious diseases* **189**(7): 1140-1150.

Kared, H., T. Fabre, N. Bedard, J. Bruneau and N. H. Shoukry (2013). "Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C." *PLoS Pathog* **9**(6): e1003422.

Kasprowicz, V., J. Schulze Zur Wiesch, T. Kuntzen, B. E. Nolan, S. Longworth, A. Berical, J. Blum, C. McMahon, L. L. Reyor, N. Elias, W. W. Kwok, B. G. McGovern, G. Freeman, R. T. Chung, P. Klenerman, L. Lewis-Ximenez, B. D. Walker, T. M. Allen, A. Y. Kim and G. M. Lauer (2008). "High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome." *J Virol* **82**(6): 3154-3160.

Kawai, M., H. Kitade, C. Mathieu, M. Waer and J. Pirenne (2005). "Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine A on the development of regulatory T cells in vivo." *Transplantation* **79**(9): 1073-1077.

Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat Immunol* **3**(11): 999-1005.

Kim, J. M. and A. Rudensky (2006). "The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells." *Immunol Rev* **212**: 86-98.

Kim, S. H., E. J. Oh, J. Y. Ghee, H. K. Song, D. H. Han, H. E. Yoon, B. S. Choi, S. K. Yoon, J. Y. Choi, I. S. Moon, D. G. Kim and C. W. Yang (2009). "Clinical significance of monitoring circulating

CD4+CD25+ regulatory T cells in kidney transplantation during the early posttransplant period." J Korean Med Sci **24 Suppl**: S135-142.

Kono, K., H. Kawaida, A. Takahashi, H. Sugai, K. Mimura, N. Miyagawa, H. Omata and H. Fujii (2006). "CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers." Cancer Immunol Immunother **55**(9): 1064-1071.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.

Kowdley, K. V., S. C. Gordon, K. R. Reddy, L. Rossaro, D. E. Bernstein, E. Lawitz, M. L. Shiffman, E. Schiff, R. Ghalib, M. Ryan, V. Rustgi, M. Chojkier, R. Herring, A. M. Di Bisceglie, P. J. Pockros, G. M. Subramanian, D. An, E. Svarovskaia, R. H. Hyland, P. S. Pang, W. T. Symonds, J. G. McHutchison, A. J. Muir, D. Pound, M. W. Fried and I. O. N. Investigators (2014). "Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis." N Engl J Med **370**(20): 1879-1888.

Krishnadas, D. K., J. S. Ahn, J. Han, R. Kumar and B. Agrawal (2010). "Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms." Int Immunol **22**(6): 491-502.

Kuhns, M. S., M. M. Davis and K. C. Garcia (2006). "Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex." Immunity **24**(2): 133-139.

Kuklina, E. M. (2013). "Molecular mechanisms of T-cell anergy." Biochemistry. Biokhimiia **78**: 144-156.

Kullberg, M. C., D. Jankovic, P. L. Gorelick, P. Caspar, J. J. Letterio, A. W. Cheever and A. Sher (2002). "Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis." J Exp Med **196**(4): 505-515.

Kuniyasu, Y., T. Takahashi, M. Itoh, J. Shimizu, G. Toda and S. Sakaguchi (2000). "Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation." International immunology **12**: 1145-1155.

Lafaille, J. J., K. Nagashima, M. Katsuki and S. Tonegawa (1994). "High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice." Cell **78**: 399-408.

Lange, C. M., T. Y. Tran, H. Farnik, S. Jungblut, T. Born, T. O. Wagner and T. O. Hirche (2010). "Increased frequency of regulatory T cells and selection of highly potent CD62L+ cells during treatment of human lung transplant recipients with rapamycin." Transpl Int **23**(3): 266-276.

Lau, D. T., A. Negash, J. Chen, N. Crochet, M. Sinha, Y. Zhang, J. Guedj, S. Holder, T. Saito, S. M. Lemon, B. A. Luxon, A. S. Perelson and M. Gale, Jr. (2013). "Innate immune tolerance and the role of kupffer cells in differential responses to interferon therapy among patients with HCV genotype 1 infection." Gastroenterology **144**(2): 402-413 e412.

Lazarous, M. C. and F. A. Kerdel (2002). "Topical tacrolimus Protopic." Drugs Today (Barc) **38**(1): 7-15.

Lee, Y. K., H. Turner, C. L. Maynard, J. R. Oliver, D. Chen, C. O. Elson and C. T. Weaver (2009). "Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage." Immunity **30**: 92-107.

Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyra, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold and A. Hamann (2002). "Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets

of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 13031-13036.

Levitsky, J., J. M. Mathew, M. Abecassis, A. Tambur, J. Leventhal, D. Chandrasekaran, N. Herrera, P. Al-Saden, L. Gallon, A. Abdul-Nabi, G. Y. Yang, S. M. Kurian, D. R. Salomon and J. Miller (2013). "Systemic immunoregulatory and proteogenomic effects of tacrolimus to sirolimus conversion in liver transplant recipients." Hepatology **57**(1): 239-248.

Levitsky, J., J. Miller, E. Wang, A. Rosen, C. Flaa, M. Abecassis, J. Mathew and A. Tambur (2009). "Immunoregulatory profiles in liver transplant recipients on different immunosuppressive agents." Hum Immunol **70**(3): 146-150.

Li, M. O., S. Sanjabi and R. A. Flavell (2006). "Transforming Growth Factor-?? Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms." Immunity **25**: 455-471.

Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol **180**(9): 5916-5926.

Lim, D. G., S. K. Koo, Y. H. Park, Y. Kim, H. M. Kim, C. S. Park, S. C. Kim and D. J. Han "Impact of immunosuppressants on the therapeutic efficacy of in vitro-expanded CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in allotransplantation." Transplantation **89**(8): 928-936.

Lin, W., D. Haribhai, L. M. Relland, N. Truong, M. R. Carlson, C. B. Williams and T. A. Chatila (2007). "Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3." Nature immunology **8**: 359-368.

Lindley, S., C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman and T. I. Tree (2005). "Defective suppressor function in CD4(+)/CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes." Diabetes **54**(1): 92-99.

Lio, C. W. J. and C. S. Hsieh (2008). "A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development." Immunity **28**: 100-111.

Liu, V. C., L. Y. Wong, T. Jang, A. H. Shah, I. Park, X. Yang, Q. Zhang, S. Lonning, B. A. Teicher and C. Lee (2007). "Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta." J Immunol **178**(5): 2883-2892.

Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J. A. Drebin, S. M. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure and D. C. Linehan (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-2761.

Lopez-Hoyos, M., D. S. Segundo, G. Fernandez-Fresnedo, M. J. Marin, V. Gonzalez-Martin and M. Arias (2009). "Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression." Transplantation **88**(3 Suppl): S31-39.

Loser, K., J. Apelt, M. Voskort, M. Mohaupt, S. Balkow, T. Schwarz, S. Grabbe and S. Beissert (2007). "IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice." J Immunol **179**(1): 365-371.

Lund, J. M., L. Hsing, T. T. Pham and A. Y. Rudensky (2008). "Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells." Science **320**(5880): 1220-1224.



Lyssuk, E. Y., A. V. Torgashina, S. K. Soloviev, E. L. Nasonov and S. N. Bykovskaia (2007). "Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." Adv Exp Med Biol **601**: 113-119.

Maasoumy, B. and H. Wedemeyer (2012). "Natural history of acute and chronic hepatitis C." Best Pract Res Clin Gastroenterol **26**(4): 401-412.

MacDonald, A. J., M. Duffy, M. T. Brady, S. McKiernan, W. Hall, J. Hegarty, M. Curry and K. H. Mills (2002). "CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons." The Journal of infectious diseases **185**(6): 720-727.

Magnani, C. F., G. Alberigo, R. Bacchetta, G. Serafini, M. Andreani, M. G. Roncarolo and S. Gregori (2011). "Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells." Eur J Immunol **41**(6): 1652-1662.

Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. Weaver (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-234.

Manigold, T., E. C. Shin, E. Mizukoshi, K. Mihalik, K. K. Murthy, C. M. Rice, C. A. Piccirillo and B. Rehermann (2006). "Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C." Blood **107**(11): 4424-4432.

Marie, J. C., J. J. Letterio, M. Gavin and A. Y. Rudensky (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells." J Exp Med **201**(7): 1061-1067.

Marie, J. C., D. Liggitt and A. Y. Rudensky (2006). "Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor-?? Receptor." Immunity **25**: 441-454.

Marshall, N. A., L. E. Christie, L. R. Munro, D. J. Culligan, P. W. Johnston, R. N. Barker and M. A. Vickers (2004). "Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma." Blood **103**(5): 1755-1762.

Martinez-Llordella, M., I. Puig-Pey, G. Orlando, M. Ramoni, G. Tisone, A. Rimola, J. Lerut, D. Latinne, C. Margarit, I. Bilbao, S. Brouard, M. Hernandez-Fuentes, J. P. Soullillou and A. Sanchez-Fueyo (2007). "Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation." Am J Transplant **7**(2): 309-319.

Masetti, M., R. Montalti, G. Rompianesi, M. Codeluppi, R. Gerring, A. Romano, B. Begliomini, F. Di Benedetto and G. E. Gerunda (2010). "Early withdrawal of calcineurin inhibitors and everolimus monotherapy in de novo liver transplant recipients preserves renal function." Am J Transplant **10**(10): 2252-2262.

Matarese, G., P. B. Carrieri, A. La Cava, F. Perna, V. Sanna, V. De Rosa, D. Aufiero, S. Fontana and S. Zappacosta (2005). "Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(14): 5150-5155.

Meloni, F., P. Vitulo, A. M. Bianco, E. Paschetto, M. Morosini, A. Cascina, I. Mazzucchelli, L. Ciardelli, T. Oggionni, A. M. Fietta, E. Pozzi and M. Vigano (2004). "Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome." Transplantation **77**(5): 762-766.

Metz, P., A. Reuter, S. Bender and R. Bartenschlager (2013). "Interferon-stimulated genes and their role in controlling hepatitis C virus." J Hepatol **59**(6): 1331-1341.

Miller, A. M., K. Lundberg, V. Ozenci, A. H. Banham, M. Hellstrom, L. Egevad and P. Pisa (2006). "CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients." *J Immunol* **177**(10): 7398-7405.

Miracco, C., V. Mourmouras, M. Biagioli, P. Rubegni, S. Mannucci, I. Monciatti, E. Cosci, P. Tosi and P. Luzzi (2007). "Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma." *Oncol Rep* **18**(5): 1115-1122.

Miyara, M., Z. Amoura and G. Gorochov (2009). "Human lupus, fewer Treg cells indeed: comment on the article by Venigalla et al." *Arthritis Rheum* **60**(2): 630.

Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai and H. Fujii (2008). "Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer." *Br J Cancer* **98**(1): 148-153.

Molitor-Dart, M. L., J. Andrassy, J. Kwun, H. A. Kayaoglu, D. A. Roenneburg, L. D. Haynes, J. R. Torrealba, J. L. Bobadilla, H. W. Sollinger, S. J. Knechtle and W. J. Burlingham (2007). "Developmental exposure to noninherited maternal antigens induces CD4+ T regulatory cells: relevance to mechanism of heart allograft tolerance." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**: 6749-6761.

Monteiro, M., C. F. Almeida, M. Caridade, J. C. Ribot, J. Duarte, A. Agua-Doce, I. Wollenberg, B. Silva-Santos and L. Graca (2010). "Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**: 2157-2163.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-2357.

Motzer, R. J., B. Escudier, S. Oudard, T. E. Hutson, C. Porta, S. Bracarda, V. Grunwald, J. A. Thompson, R. A. Figlin, N. Hollaender, G. Urbanowitz, W. J. Berg, A. Kay, D. Lebwohl and A. Ravaud (2008). "Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial." *Lancet* **372**(9637): 449-456.

Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 933-944.

Nakamoto, N., H. Cho, A. Shaked, K. Olthoff, M. E. Valiga, M. Kaminski, E. Gostick, D. A. Price, G. J. Freeman, E. J. Wherry and K. M. Chang (2009). "Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade." *PLoS Pathog* **5**(2): e1000313.

Nakamoto, N., D. E. Kaplan, J. Coleclough, Y. Li, M. E. Valiga, M. Kaminski, A. Shaked, K. Olthoff, E. Gostick, D. A. Price, G. J. Freeman, E. J. Wherry and K. M. Chang (2008). "Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization." *Gastroenterology* **134**(7): 1927-1937, 1937 e1921-1922.

Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969). "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice." *Science* **166**(906): 753-755.

O'Garra, A. (1998). "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets." *Immunity* **8**(3): 275-283.

Ochando, J. C., A. C. Yopp, Y. Yang, A. Garin, Y. Li, P. Boros, J. Llodra, Y. Ding, S. A. Lira, N. R. Krieger and J. S. Bromberg (2005). "Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells." *J Immunol* **174**(11): 6993-7005.

Ojo, A. O., P. J. Held, F. K. Port, R. A. Wolfe, A. B. Leichtman, E. W. Young, J. Arndorfer, L. Christensen and R. M. Merion (2003). "Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ." N Engl J Med **349**(10): 931-940.

Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita and E. Nakayama (1999). "Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody." Cancer Res **59**(13): 3128-3133.

Ormandy, L. A., T. Hillemann, H. Wedemeyer, M. P. Manns, T. F. Greten and F. Korangy (2005). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma." Cancer Res **65**(6): 2457-2464.

Ostergaard, H. L., K. P. Kane, M. F. Mescher and W. R. Clark (1987). "Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase." Nature **330**(6143): 71-72.

Pandiyan, P., H. R. Conti, L. Zheng, A. C. Peterson, D. R. Mathern, N. Hernandez-Santos, M. Edgerton, S. L. Gaffen and M. J. Lenardo (2011). "CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model." Immunity **34**(3): 422-434.

Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol **8**(12): 1353-1362.

Parish, C. R. and F. Y. Liew (1972). "Immune response to chemically modified flagellin. 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin." J Exp Med **135**(2): 298-311.

Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.

Park, S. H. and B. Rehermann (2014). "Immune responses to HCV and other hepatitis viruses." Immunity **40**(1): 13-24.

Pawlotsky, J. M. (2004). "Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease." Trends Microbiol **12**(2): 96-102.

Pecheur, E. I. (2012). "Lipoprotein receptors and lipid enzymes in hepatitis C virus entry and early steps of infection." Scientifica (Cairo) **2012**: 709853.

Perrella, A., G. Arenga, D. Pisaniello, B. Rampone, G. G. Di Costanzo, L. Atripaldi, C. Esposito, E. Di Florio, O. Perrella and O. Cuomo (2009). "Elevated CD4+/CD25+ T-cell frequency and function during hepatitis C virus recurrence after liver transplantation." Transplant Proc **41**(5): 1761-1766.

Peterson, R. A. (2012). Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. **40**: 186-204.

Pham, T. N. and T. I. Michalak (2008). "Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection." World J Gastroenterol **14**(18): 2789-2793.

Piazzolla, G., C. Tortorella, O. Schiraldi and S. Antonaci (2000). "Relationship between interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 production in chronic hepatitis C and in vitro effects of interferon-alpha." J Clin Immunol **20**(1): 54-61.

Picca, C. C., S. Oh, L. Panarey, M. Aitken, A. Basehoar and A. J. Caton (2009). "Thymocyte deletion can bias Treg formation toward low-abundance self-peptide." European Journal of Immunology **39**: 3301-3306.

Piconese, S., E. Timperi, I. Pacella, V. Schinzari, C. Tripodo, M. Rossi, N. Guglielmo, G. Mennini, G. L. Grazi, S. Di Filippo, S. Brozzetti, K. Fazzi, G. Antonelli, M. A. Lozzi, M. Sanchez and V. Barnaba (2014). "Human OX40 tunes the function of regulatory T cells in tumor and nontumor areas of hepatitis C virus-infected liver tissue." Hepatology.

Powell, J. D., K. N. Pollizzi, E. B. Heikamp and M. R. Horton (2012). "Regulation of immune responses by mTOR." Annu Rev Immunol **30**: 39-68.

Prabhala, R. H., P. Neri, J. E. Bae, P. Tassone, M. A. Shamma, C. K. Allam, J. F. Daley, D. Chauhan, E. Blanchard, H. S. Thatte, K. C. Anderson and N. C. Munshi (2006). "Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma." Blood **107**(1): 301-304.

Prado, C., J. Gomez, P. Lopez, B. de Paz, C. Gutierrez and A. Suarez (2011). "Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity." Immunobiology **216**(3): 386-392.

Rahmoun, M., A. Foussat, H. Groux, J. Pene, H. Yssel and P. Chanez (2006). "Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity." Int Arch Allergy Immunol **140**(2): 139-149.

Rayhill, S. C., R. Barbeito, D. Katz, M. Voigt, D. Labrecque, P. Kirby, R. Miller, A. Stolpen, Y. Wu and W. Schmidt (2006). "A cyclosporine-based immunosuppressive regimen may be better than tacrolimus for long-term liver allograft survival in recipients transplanted for hepatitis C." Transplant Proc **38**(10): 3625-3628.

Read, S., V. Malmström and F. Powrie (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." The Journal of experimental medicine **192**: 295-302.

Rehermann, B. (2009). "Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence." J Clin Invest **119**(7): 1745-1754.

Rehermann, B. (2013). "Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells." Nat Med **19**(7): 859-868.

Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong and Y. Wang (2007). "Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." Cell Death Differ **14**(12): 2076-2084.

Riezu-Boj, J. I., E. Larrea, R. Aldabe, L. Guembe, N. Casares, E. Galeano, I. Echeverria, P. Sarobe, I. Herrero, B. Sangro, J. Prieto and J. J. Lasarte (2010). "Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection." J Hepatol.

Rodriguez-Luna, H. and D. D. Douglas (2004). "Natural history of hepatitis C following liver transplantation." Curr Opin Infect Dis **17**(4): 363-371.

Rodriguez-Peralvarez, M., M. De la Mata and A. K. Burroughs (2014). "Liver transplantation: immunosuppression and oncology." Curr Opin Organ Transplant **19**(3): 253-260.

Romagnani, S. (2000). "The role of lymphocytes in allergic disease." J Allergy Clin Immunol **105**(3): 399-408.

Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer and M. K. Levings (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." Immunol Rev **212**: 28-50.

Roncarolo, M. G., S. Gregori, B. Lucarelli, F. Ciceri and R. Bacchetta (2011). "Clinical tolerance in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Immunol Rev **241**(1): 145-163.

Roumestan, C., C. Gougat, D. Jaffuel and M. Mathieu (2004). "[Glucocorticoids and their receptor: mechanisms of action and clinical implications]." Rev Med Interne **25**(9): 636-647.

Rousalova, I. and E. Krepela (2010). "Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review)." Int J Oncol **37**(6): 1361-1378.

Rowe, J. H., J. M. Ertelt, M. N. Aguilera, M. A. Farrar and S. S. Way (2011). "Foxp3(+) regulatory T cell expansion required for sustaining pregnancy compromises host defense against prenatal bacterial pathogens." Cell Host Microbe **10**(1): 54-64.

Ruggenenti, P., N. Perico, E. Gotti, P. Cravedi, V. D'Agati, E. Gagliardini, M. Abbate, F. Gaspari, D. Cattaneo, M. Noris, F. Casiraghi, M. Todeschini, D. Cugini, S. Conti and G. Remuzzi (2007). "Sirolimus versus cyclosporine therapy increases circulating regulatory T cells, but does not protect renal transplant patients given alemtuzumab induction from chronic allograft injury." Transplantation **84**(8): 956-964.

Rushbrook, S. M., S. M. Ward, E. Unitt, S. L. Vowler, M. Lucas, P. Klenerman and G. J. Alexander (2005). "Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection." J Virol **79**(12): 7852-7859.

Rushbrook, S. M., S. M. Ward, E. Unitt, S. L. Vowler, M. Lucas, P. Klenerman and G. J. Alexander (2005). "Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection." Journal of virology **79**(12): 7852-7859.

Sabahi, A. (2009). "Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle." Virol J **6**: 117.

Saint-Ruf, C., K. Ungewiss, M. Groettrup, L. Bruno, H. J. Fehling and H. von Boehmer (1994). "Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene." Science **266**(5188): 1208-1212.

Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." Nature reviews. Immunology **10**: 490-500.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-1164.

Salama, P., M. Phillips, F. Grieu, M. Morris, N. Zeps, D. Joseph, C. Platell and B. Iacopetta (2009). "Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer." J Clin Oncol **27**(2): 186-192.

San Segundo, D., J. C. Ruiz, G. Fernandez-Fresnedo, M. Izquierdo, C. Gomez-Alamillo, E. Cacho, M. J. Benito, E. Rodrigo, R. Palomar, M. Lopez-Hoyos and M. Arias (2006). "Calcineurin inhibitors affect circulating regulatory T cells in stable renal transplant recipients." Transplant Proc **38**(8): 2391-2393.

Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr and A. G. Betz (2008). "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." Immunity **28**(3): 402-413.

Sasada, T., M. Kimura, Y. Yoshida, M. Kanai and A. Takabayashi (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression." Cancer **98**(5): 1089-1099.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer and M. E. Peter (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-1687.

Scott-Browne, J. P., S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan and K. B. Urdahl (2007). "Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis." J Exp Med **204**(9): 2159-2169.

Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. F. Bachmann and P. S. Ohashi (1999). "Selection of the T cell repertoire." Annu Rev Immunol **17**: 829-874.

Segundo, D. S., J. C. Ruiz, M. Izquierdo, G. Fernandez-Fresnedo, C. Gomez-Alamillo, R. Merino, M. J. Benito, E. Cacho, E. Rodrigo, R. Palomar, M. Lopez-Hoyos and M. Arias (2006). "Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients." Transplantation **82**(4): 550-557.

Selvaraj, R. K. and T. L. Geiger (2007). "A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta." J Immunol **178**(12): 7667-7677.

Semmo, N., C. L. Day, S. M. Ward, M. Lucas, G. Harcourt, A. Loughry and P. Klenerman (2005). "Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection." Hepatology **41**(5): 1019-1028.

Seo, N., S. Hayakawa, M. Takigawa and Y. Tokura (2001). "Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity." Immunology **103**(4): 449-457.

Serra, A., S. Nuti, S. Tavarini, C. Sammicheli, D. Rosa, G. Saletti, E. Soldaini, S. Abrignani and A. Wack (2008). "Coligation of the hepatitis C virus receptor CD81 with CD28 primes naive T lymphocytes to acquire type 2 effector function." J Immunol **181**(1): 174-185.

Sharma, S., S. C. Yang, L. Zhu, K. Reckamp, B. Gardner, F. Baratelli, M. Huang, R. K. Batra and S. M. Dubinett (2005). "Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer." Cancer Res **65**(12): 5211-5220.

Shevach, E. M. (2006). "From Vanilla to 28 Flavors: Multiple Varieties of T Regulatory Cells." Immunity **25**: 195-201.

Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." Immunity **30**(5): 636-645.

Shiina, M. and B. Rehermann (2008). "Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function." Hepatology **47**(2): 385-395.

Shimizu, J., S. Yamazaki and S. Sakaguchi (1999). "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." J Immunol **163**(10): 5211-5218.

Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida and S. Sakaguchi (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." Nature immunology **3**: 135-142.

Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel and D. Calvin (1992). "Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease." Nature **359**: 693-699.

Smyk-Pearson, S., I. A. Tester, J. Klarquist, B. E. Palmer, J. M. Pawlotsky, L. Golden-Mason and H. R. Rosen (2008). "Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help." J Virol **82**(4): 1827-1837.

Steger, U., C. I. Kingsley, M. Karim, A. R. Bushell and K. J. Wood (2006). "CD25+CD4+ regulatory T cells develop in mice not only during spontaneous acceptance of liver allografts but also after acute allograft rejection." Transplantation **82**(9): 1202-1209.

Stepkowski, S. M. (2000). "Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs." Expert Rev Mol Med **2**(4): 1-23.

Strauss, L., C. Bergmann, M. Szczepanski, W. Gooding, J. T. Johnson and T. L. Whiteside (2007). "A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment." Clin Cancer Res **13**(15 Pt 1): 4345-4354.

Strauss, L., C. Bergmann and T. L. Whiteside (2009). "Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis." J Immunol **182**(3): 1469-1480.

Sugimoto, K., F. Ikeda, J. Stadanlick, F. A. Nunes, H. J. Alter and K. M. Chang (2003). "Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection." Hepatology **38**(6): 1437-1448.

Sugiyama, H., R. Gyulai, E. Toichi, E. Garaczi, S. Shimada, S. R. Stevens, T. S. McCormick and K. D. Cooper (2005). "Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation." J Immunol **174**(1): 164-173.

Sulkowski, M. S., D. F. Gardiner, M. Rodriguez-Torres, K. R. Reddy, T. Hassanein, I. Jacobson, E. Lawitz, A. S. Lok, F. Hiney, P. J. Thuluvath, H. Schwartz, D. R. Nelson, G. T. Everson, T. Eley, M. Wind-Rotolo, S. P. Huang, M. Gao, D. Hernandez, F. McPhee, D. Sherman, R. Hindes, W. Symonds, C. Pasquinelli, D. M. Grasela and A. I. S. Group (2014). "Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection." N Engl J Med **370**(3): 211-221.

Tafuri, A., J. Alferink, P. Moller, G. J. Hammerling and B. Arnold (1995). "T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy." Science **270**(5236): 630-633.

Taguchi, O. and Y. Nishizuka (1981). "Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse." Clin Exp Immunol **46**(2): 425-434.

Tai, P., J. Wang, H. Jin, X. Song, J. Yan, Y. Kang, L. Zhao, X. An, X. Du, X. Chen, S. Wang, G. Xia and B. Wang (2008). "Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen." J Cell Physiol **214**(2): 456-464.

Takahashi, K., S. Asabe, S. Wieland, U. Garaigorta, P. Gastaminza, M. Isogawa and F. V. Chisari (2010). "Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(16): 7431-7436.

Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak and S. Sakaguchi (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-310.

Tan, M. C., P. S. Goedegebuure, B. A. Belt, B. Flaherty, N. Sankpal, W. E. Gillanders, T. J. Eberlein, C. S. Hsieh and D. C. Linehan (2009). "Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer." J Immunol **182**(3): 1746-1755.

Tang, Q. and J. A. Bluestone (2008). "The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." Nature immunology **9**: 239-244.

Taylor, A. L., C. J. Watson and J. A. Bradley (2005). "Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy." Crit Rev Oncol Hematol **56**(1): 23-46.

Thimme, R., D. Oldach, K. M. Chang, C. Steiger, S. C. Ray and F. V. Chisari (2001). "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection." J Exp Med **194**(10): 1395-1406.

Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." The Journal of experimental medicine **188**: 287-296.

Tiemessen, M. M., T. J. Mitchell, L. Hendry, S. J. Whittaker, L. S. Taams and S. John (2006). "Lack of suppressive CD4+CD25+FOXP3+ T cells in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma." J Invest Dermatol **126**(10): 2217-2223.

Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M. L. Tykocinski, M. I. Greene and M. Tone (2008). "Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer." Nature immunology **9**: 194-202.

Tournadre, A., M. Porcherot, P. Ch??rin, I. Marie, E. Hachulla and P. Miossec (2009). "Th1 and Th17 balance in inflammatory myopathies: Interaction with dendritic cells and possible link with response to high-dose immunoglobulins." Cytokine **46**: 297-301.

Tseng, C. T. and G. R. Klimpel (2002). "Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions." J Exp Med **195**(1): 43-49.

Turk, M. J., J. A. Guevara-Patino, G. A. Rizzuto, M. E. Engelhorn, S. Sakaguchi and A. N. Houghton (2004). "Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells." J Exp Med **200**(6): 771-782.

Urbani, S., B. Amadei, P. Fisicaro, D. Tola, A. Orlandini, L. Sacchelli, C. Mori, G. Missale and C. Ferrari (2006). "Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses." Hepatology **44**(1): 126-139.

van Santen, H.-M., C. Benoist and D. Mathis (2004). "Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells." The Journal of experimental medicine **200**: 1221-1230.

Velasquez-Lopera, M. M., V. L. Eaton, N. M. Lerret, L. A. Correa, R. P. Decresce, L. F. Garcia and A. Jaramillo (2008). "Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells." Transpl Immunol **19**(2): 127-135.

Verdonk, R. C., A. P. van den Berg, M. J. Slooff, R. J. Porte and E. B. Haagsma (2007). "Liver transplantation: an update." Neth J Med **65**(10): 372-380.

Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H. L. Weiner and D. A. Hafler (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." J Exp Med **199**(7): 971-979.



Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol **8**(7): 523-532.

Viguier, M., F. Lemaitre, O. Verola, M. S. Cho, G. Gorochoy, L. Dubertret, H. Bachelez, P. Kourilsky and L. Ferradini (2004). "Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells." J Immunol **173**(2): 1444-1453.

Villamil, F., G. Levy, G. L. Grazi, S. Mies, D. Samuel, F. Sanjuan, M. Rossi, J. Lake, S. Munn, F. Muhlbacher, L. Leonardi and U. Cillo (2006). "Long-term outcomes in liver transplant patients with hepatic C infection receiving tacrolimus or cyclosporine." Transplant Proc **38**(9): 2964-2967.

Vlad, G., E. K. Ho, E. R. Vasilescu, J. Fan, Z. Liu, J. W. Cai, Z. Jin, E. Burke, M. Deng, M. Cadeiras, R. Cortesini, S. Itescu, C. Marboe, D. Mancini and N. Suciuc-Foca (2007). "Anti-CD25 treatment and FOXP3-positive regulatory T cells in heart transplantation." Transpl Immunol **18**(1): 13-21.

von Boehmer, H. (2005). "Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate." Nat Rev Immunol **5**(7): 571-577.

Wan, Y. Y. and R. A. Flavell (2007). "Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression." Nature **445**: 766-770.

Wang, H., L. Zhao, Z. Sun, L. Sun, B. Zhang and Y. Zhao (2006). "A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells in mice." Transplantation **82**(11): 1484-1492.

Wang, W., R. Lau, D. Yu, W. Zhu, A. Korman and J. Weber (2009). "PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells." Int Immunol **21**(9): 1065-1077.

Wang, Z., B. Shi, H. Jin, L. Xiao, Y. Chen and Y. Qian (2009). "Low-dose of tacrolimus favors the induction of functional CD4(+)/CD25(+)/FoxP3(+) regulatory T cells in solid-organ transplantation." Int Immunopharmacol **9**(5): 564-569.

Wedemeyer, H., X. S. He, M. Nascimbeni, A. R. Davis, H. B. Greenberg, J. H. Hoofnagle, T. J. Liang, H. Alter and B. Rehermann (2002). "Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection." J Immunol **169**(6): 3447-3458.

Wei, S., I. Kryczek and W. Zou (2006). "Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking." Blood **108**(2): 426-431.

Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." Immunol Rev **182**: 207-214.

Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most and R. Ahmed (2003). "Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment." J Virol **77**(8): 4911-4927.

Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura and S. Sakaguchi (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." Science **322**(5899): 271-275.

Woo, E. Y., C. S. Chu, T. J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S. C. Rubin, L. R. Kaiser and C. H. June (2001). "Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." Cancer Res **61**(12): 4766-4772.

Xu, L., A. Kitani, I. Fuss and W. Strober (2007). "Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **178**: 6725-6729.

Yamaguchi, T., J. B. Wing and S. Sakaguchi (2011). Two modes of immune suppression by Foxp3+ regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. **23**: 424-430.

Yang, J., M. O. Brook, M. Carvalho-Gaspar, J. Zhang, H. E. Ramon, M. H. Sayegh, K. J. Wood, L. A. Turka and N. D. Jones (2007). "Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 19954-19959.

Yang, Z. Z., A. J. Novak, M. J. Stenson, T. E. Witzig and S. M. Ansell (2006). "Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma." Blood **107**(9): 3639-3646.

Yates, A. J. (2014). "Theories and Quantification of Thymic Selection." Frontiers in immunology **5**: 13-13.

Yi, T., Y. Chen, L. Wang, G. Du, D. Huang, D. Zhao, H. Johnston, J. Young, I. Todorov, D. T. Umetsu, L. Chen, Y. Iwakura, F. Kandeel, S. Forman and D. Zeng (2009). "Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease." Blood **114**: 3101-3112.

Yu, L. Z., Y. Fang, L. Zhu, Z. G. Sun and H. Xu (2012). "Immunomodulation of human CD8(+) T cells by thymoglobulin in vitro." Transplant Proc **44**(4): 1052-1054.

Zeiser, R., V. H. Nguyen, A. Beilhack, M. Buess, S. Schulz, J. Baker, C. H. Contag and R. S. Negrin (2006). "Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production." Blood **108**(1): 390-399.

Zenclussen, M. L., C. Thuere, N. Ahmad, P. O. Wafula, S. Fest, A. Teles, A. Leber, P. A. Casalis, I. Bechmann, J. Priller, H. D. Volk and A. C. Zenclussen (2010). "The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy." Am J Reprod Immunol **63**(3): 200-208.

Zhang, Q., F. H. Qian, H. Liu, L. F. Zhou, M. Huang, X. L. Zhang and K. S. Yin (2008). "Expression of surface markers on peripheral CD4+CD25high T cells in patients with atopic asthma: role of inhaled corticosteroid." Chin Med J (Engl) **121**(3): 205-212.

Zhang, S., K. Kodys, K. Li and G. Szabo (2013). "Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon-lambda and amplify interferon-alpha in response to hepatitis C virus infection." Gastroenterology **144**(2): 414-425 e417.

Zhao, J. X., Y. Y. Zeng and Y. Liu (2007). "Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy." J Reprod Immunol **75**(2): 71-81.

Zheng, Y., S. Josefowicz, A. Chaudhry, X. P. Peng, K. Forbush and A. Y. Rudensky (2010). "Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate." Nature **463**: 808-812.

Zhu, J., L. Guo, C. J. Watson, J. Hu-Li and W. E. Paul (2001). "Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion." J Immunol **166**(12): 7276-7281.

Zhu, M. L., A. Nagavalli and M. A. Su (2013). "Aire deficiency promotes TRP-1-specific immune rejection of melanoma." Cancer Res **73**(7): 2104-2116.

*Thèse de science, Khaldoun GHAZAL, 2014.*

Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1997). The discovery of MHC restriction. **18**: 14-17.

## Table des illustrations

FIGURE 1 : LES STADES DE DEVELOPPEMENT THYMIQUE DES LYMPHOCYTES T CD4 ET CD8 .:	13
FIGURE 2 : SCHEMATISATION DES PROCESSUS DE SELECTION THYMIQUE. ....	15
FIGURE 3 : ORGANISATION DE COMPLEXE TCR/CD3 .....	16
FIGURE 4 : VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL DANS LES LYMPHOCYTES T APRES LE TCR.....	18
FIGURE 5 : LES ORIGINES DES SOUS POPULATIONS REGULATRICES . ....	24
FIGURE 6 : DIFFERENCIATION INTRA-THYMIQUE DE TREG . ....	30
FIGURE 7 : L'IMPORTANCE DU SIGNAL TCR DANS LA SELECTION DES TREG . ....	31
FIGURE 8. BOUCLES D'ACTION DES CYTOKINES IMMUNOSUPPRESSIVES PRODUITES PAR LES TREG .....	34
FIGURE 9 : LES PERTURBATIONS METABOLIQUES PROVOQUEES PAR LES TREG SUR LEURS CIBLES .....	35
FIGURE 10. LES DIFFERENTS MECANISMES D'ACTION DES CELLULES TREG.....	37
FIGURE 11 INTERACTION DES TREG DANS L'IMMUNO-SURVEILLANCE ANTI-TUMORALE. ....	44
FIGURE 12: MECANISME DU REJET AIGU CELLULAIRE .....	45
FIGURE 13: MECANISME DU REJET CHRONIQUE.....	46
FIGURE 14 : SCHEMA DE LA FONCTION DES TREG AU COURS DE LA TRANSPLANTATION.. ....	47
FIGURE 15 : HISTORIQUE D'INTRODUCTION DES TRAITEMENTS IMMUNOSUPPESSEURS .....	49
FIGURE 16 : MECANISMES D'ACTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS IMMUNOSUPPESSEURS.....	50
FIGURE 17 : PREVALENCE DU VIRUS DE L'HEPATITE C PAR PAYS EN 2011.....	55
FIGURE 18 : PREVALENCE DES HEPATITES B ET C EN FRANCE EN 2004. ....	55
FIGURE 19 : DISTRIBUTION MONDIALE DES GENOTYPES DU VHC. AU NIVEAU MONDIALE .....	56
FIGURE 20, STRUCTURE DU VHC .....	56
FIGURE 21: L'HISTOIRE NATURELLE D'HEPATITE C .....	58
FIGURE 22 : REPONSE A LA BITHERAPIE IFNA / RIBAVIRINE, SELON LE GENOTYPE VIRAL .....	59
FIGURE 23 : RECONNAISSANCE DE L'ARN VIRAL DANS LES HEPATOCYTES.....	61
FIGURE 24 : SCHEMA DE LA REPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE AU COURS DES PHASES AIGUE ET CHRONIQUE DE L'INFECTION PAR LE VHC. ....	63

