HAL
open science

Influence des immunosuppresseurs sur les lymphocytes T régulateurs et les cellules dendritiques

Géraldine Dahlqvist

To cite this version:

Géraldine Dahlqvist. Influence des immunosuppresseurs sur les lymphocytes T régulateurs et les cellules dendritiques. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS291 . tel-03369782

HAL Id: tel-03369782

https://theses.hal.science/tel-03369782

Submitted on 7 Oct 2021

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.

Sorbonne Université

École doctorale 394 Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

UMR 938, CdR Saint-Antoine, Équipe du Professeur Chantal HOUSSET

Influence des immunosuppresseurs sur les lymphocytes T régulateurs et les cellules dendritiques

Par Géraldine DAHLQVIST

Thèse de doctorat de Physiologie et Physiopathologie

Dirigée par le Professeur Filomena CONTI

Présentée et soutenue publiquement le 28 mai 2020

Devant un jury composé de :

Professeur Yvon Calmus (Président du jury)

Professeur Alain Le Moine (Rapporteur),

Professeur Vincent Leroy (Rapporteur),

Professeur Isabelle Leclercq (Membre externe du jury),

Professeur Nadira Delhem (Membre externe du jury),

Docteur Makoto Miyara (Membre du jury),

Professeur Filomena Conti (Directrice de thèse)

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

A ma maman,

Remerciements

En 2012 et 2013, j'ai eu la chance de travailler à Paris dans le cadre de ma spécialisation en hépatologie et transplantation. Durant six mois j'ai pu travailler avec Filomena Conti, médecin très humain, motivée et très impliquée dans la prise en charge de ses patients. Elle est également à la pointe des avancées scientifiques en transplantation hépatique. Suite à nos discussions, nous avons décidé, une fois ma spécialité d'hépato-gastroentérologie terminée de réfléchir à un travail de recherche commun afin de réaliser une thèse de science. Forte de cette proposition, j'ai pu discuter avec le Professeur Yves Horsmans qui m'a soutenue dans ce projet.

C'est donc avec beaucoup d'enthousiasme que j'ai débuté ma thèse en février 2015 après avoir donné naissance à mon adorable Emma quelques mois auparavant. J'ai été accueillie au laboratoire du centre de recherche Saint-Antoine grâce au Professeur Chantal Housset. Merci à Lynda Aoudjehane et Clément Barjon de m'avoir initiée aux différentes techniques de recherche utiles à ma thèse et de m'avoir soutenue jusqu'à aujourd'hui encore. Merci à Annie Munier pour sa formation en cytométrie de flux et ses conseils. Merci à Margaux Legrand et Anaëlle Lorho pour les partages lors des pauses de midi, pas toujours possibles... Et merci à Thalys pour les transports quotidiens durant les périodes de travail au laboratoire. Le personnel du Thalys a été très bienveillant avec moi, principalement durant ma 2e grossesse me permettant une flexibilité au niveau des places dans le train lors de mes trajets.

Après ma deuxième grossesse, la logistique des trajets vers Paris est devenue plus compliquée. Lors des comités d'encadrement, nous avons donc décidé de modifier le plan de thèse et de demander l'aide de l'équipe de Nadira Delhem pour finaliser les expériences nécessaires à mon travail. Je remercie donc Nadira pour son accueil au sein du laboratoire de l'Institut de Biologie de Lille et Sarah Renaud pour ses compétences en cellules dendritiques, sa collaboration et son travail qui m'ont permis de finaliser ma thèse.

Ce travail de recherche a été réalisé à mi-temps grâce au financement FNRS comme clinicien chercheur. Ce mi-temps n'aurait jamais pu avoir lieu sans le soutien de mes collègues du service d'hépatogastroentérologie, Yves Horsmans, Hubert Piessevaux, Nicolas Lanthier, Bénédicte Delire, Ivan Borbath, Pierre Deprez, Tom Moreels, Olivier Dewit, Marie-Armelle Denis, Jean-François Colin et l'équipe du transplantation hépatique, Laurent Coubeau, Olga Ciccarelli, Eliano Bonaccorsi-Riani et nos deux coordinatrices de transplantation Aude et

Chantal. Je n'oublie pas de remercier Annik Uytterhoeven, infirmière chef de l'unité 83 pour son soutien et ses attentions. Je souhaiterais également remercier le Professeur Isabelle Leclercq pour sa disponibilité et ses conseils avisés et le Prof Arnaud Marchant de l'IMI, ULB pour son accueil dans le laboratoire de l'IMI à Gosselies.

Mes pensées vont ensuite à mes amies Gaëlle, Nathaly, Bénédicte, Bérangère, Marie-Bénédicte, Catherine, Claire et Françoise, je les remercie pour leurs encouragements.

Rien de tout ceci n'aurait été possible sans le soutien de ma famille, tant sur le plan de l'organisation que du maintien de ma motivation. Je remercie mon papa, ma marraine Françoise, mes frères Fredrik et Carl-Henrik et ma sœur Caroline. Je remercie Fredrik, Bernadette et Christiane pour leur relecture attentive. Je remercie Moumou, Grand-Papa, Henri et Bernadette pour leurs encouragements.

Enfin, je tiens à remercier Jérôme, mon mari pour son soutien sans faille et mes trois adorables enfants, Emma, Juliette et Oscar pour leur joie de vivre et leur amour.

Sommaire

Remerciements……..2

Sommaire ……..5

Liste des abréviations (ordre d'apparition dans le texte) ……7

Introduction ……..8

1. La réaction immunitaire après transplantation d'organe solide……..……9

1.1. La réaction allogénique……... 9
1.2. Les acteurs de la réaction allogénique…… 10
1.2.1. Les lymphocytes T …… 10
1.2.2. Les lymphocytes B ……..14
1.2.3. Les cellules dendritiques ……16
1.3. La tolérance immunitaire ……. 18
1.3.1. Lymphocytes T régulateurs (Tregs) ……21
1.3.2. Les lymphocytes B régulateurs (Bregs) ……23
1.3.3. Cellules dendritiques tolérogènes (Tol-DCs) ……...25
2. Les immunosuppresseurs utilisés en transplantation d'organes solides…… 27
2.1. Les anticalcineurines……. 27
2.1.1. La cyclosporine ……...27
2.1.2. Le tacrolimus ……..28
2.2. Les anti-métabolites ……...29
2.2.1. Le mycophenolate mofetil ……29
2.2.2. L'azathioprine ……30
2.3. Les inhibiteurs mTOR ……...31
2.4. Les anticorps ……...34
2.4.1. Les anticorps déplétants : Anti-thymoglobuline (ATG) ……34
2.4.2. Anticorps non-déplétants : Anti-récepteur de l'IL2, le Basiliximab……. 36
2.4.3. Anticorps inhibant la co-stimulation : Belatacept (Ig-CTLA4)……..36
3. Interactions des immunosuppresseurs avec les acteurs tolérogènes……...37
3.1. Immunosuppresseurs et lymphocytes T régulateurs……...37
3.1.1. Influence des lymphocytes T régulateurs en transplantation d'organe solide…..37
3.1.2. Modulation des lymphocytes T régulateurs par les immunosuppresseurs……38
3.2. Immunosuppresseurs et cellules dendritiques tolérogènes……41
3.2.1. Les cellules dendritiques tolérogènes en transplantation d'organe solide…….42
3.2.2. Impact des immunosuppresseurs sur les cellules dendritiques……..43

Objectifs de la thèse……51

Résultats……...53

Article 1 ……...54

Article 2 ……...74

Discussion et perspectives ……106

Conclusions…… 118

Table des tableaux……122

Table des illustrations…… 119

Résumé…….

BIBLIOGRAPHIE .....

Annexe 1……..

Annexe 2……..…….

Annexe 3……...

Liste des abréviations (ordre d'apparition dans le texte)

OMS : Organisation mondiale de la santé
DAMPS : Damage-associated molecular patterns
APC : Cellules présentatrices d'antigènes
MHC: Complexe majeur d'histocompatibilité
CD: Cluster de différentiation
AMR: Rejet médié par les anticorps
DSA : Anticorps spécifiques des donneurs
IL- : Interleukine-
Tregs: Lymphocytes T régulateurs
TGF-β: Transforming growth factor-beta
TCR : Récepteur des lymphocytes T
DCs: Cellules dendritiques
mDCs : Cellules dendritiques myéloïdes
moDCs : Cellules dendritiques dérivées des monocytes
cTregs : Tregs centraux
pTregs : Tregs périphériques
Bregs : Lymphocytes B régulateurs
iDCs : Cellules dendritiques immatures
TolDCs : Cellules dendritiques tolérogènes
IDO: Indoleamine 2,3dioxygénase
NFAT: Nuclear Factor Activating T-cells
CNI: Inhibiteurs de calcineurine
IFN-γ : Interféron gamma
CYP: Cytochrome
FKBP-12: FK506-binding protein-12
MMF: Mycophenolate Mofetil
IMPDH: Inosine monophosphate dehydrogenase
mTOR: Mammalian target of rapamycin
mTORC1: mTOR complex 1
mTORC2: mTOR complex 2
ATG: Anti-thymoglobuline
rATG : anti-thymoglobuline de lapin
IL-2R : Récepteur de l'IL-2
SIRS : syndrome de réponse inflammatoire systémique
ILT3 : Ig-like transcript 3
ILT4 : Ig-like transcript 4
CCR7 : C-C chemokine receptor 7
moDCs : Cellules dendritiques dérivées des monocytes
PGE2 : Prostaglandine E2
GvHd : Maladie de greffon contre l'hôte (graft versus host disease)
IS : Immunosuppresseurs

Introduction

1. La réaction immunitaire après transplantation d'organe solide

La transplantation d'organe solide est un traitement de choix pour le remplacement des organes dysfonctionnels par des organes fonctionnels de donneurs décédés ou vivants permettant d'augmenter la survie des patients. En effet, la dysfonction des organes solides, réduit considérablement la qualité de vie et l'espérance de vie des patients. Le rein, le foie, le cœur, les poumons et le pancréas sont les organes solides qui peuvent être transplantés.

La personne qui reçoit l'organe est appelée **receveur**, la personne qui donne l'organe est appelée **donneur.**

En 2017, 139,024 organes ont été transplantés dans le monde avec 16 transplantations par heure en moyenne, provenant notamment de 37,447 donneurs décédés. Les transplantations de reins proviennent pour 36,5% de donneurs vivants, et 19% pour les greffes de foie (***transplant-observatory.org*** pour l'OMS). Ces chiffres démontrent l'importance de la greffe d'organe solide en santé publique dans le monde. Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes qui sous-tendent les réactions immunologiques en transplantation, leurs potentielles modulations par les traitements immunosuppresseurs et les moyens à notre disposition pour réduire les complications de ces derniers.

La mise en contact d'un organe d'un **donneur** dans un corps **receveur** entraine une réaction immunitaire appelée **réaction allogénique**. Une fois passée la phase d'implantation de l'organe, la modulation de la réaction immunologique reste le défi majeur pour la survie du greffon et du donneur sur le long terme.

1.1. La réaction allogénique

La transplantation de cellules ou de tissus provenant d'individus non-identiques génétiquement entraine invariablement des phénomènes de rejet via une réaction immunitaire adaptative. Le rejet est la destruction de l'organe transplanté suite à une réaction immunologique trop importante. Les lymphocytes sont un des médiateurs principaux de ce phénomène immunologique.

A côté de cette réaction immunitaire adaptative, il existe une activation du système immunitaire inné, indépendante des différences génétiques des individus, qui apparait précocement dans la phase post-transplantatoire. Il s'agit d'une réaction immunitaire non spécifique, secondaire aux dommages cellulaires qui surviennent entre autre en raison des lésions d'ischémie-reperfusion lors de la préservation de l'organe (revue dans Wood et al. 2012 ; Figure 1)[1]. Cette réaction immunitaire innée orchestre l'activation de la réponse immunitaire adaptative après la greffe.

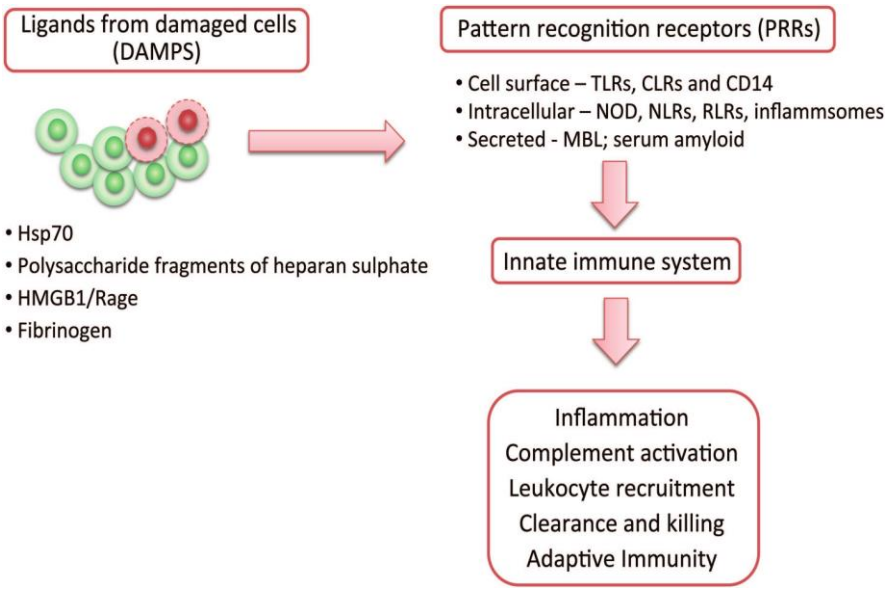


Figure 1. Le système immunitaire dresse la scène du phénomène de rejet. Le prélèvement d'organe et la transplantation entraine des lésions sur le greffons. Les molécules produites par ces dommages cellulaires dans l'allogreffe, connues comme les DAMPS pour damage-associated molecular patterns sont reconnues par des récepteurs spécifiques exprimés sur les cellules immunitaires innées du receveur activant la réaction immunitaire. Les lymphocytes activés ouvrent la voie à la cascade inflammatoire via des médiateurs inflammatoires, des cytokines, des chemokines attirant d'autres leucocytes. La cascade du complément est également activée avec le relargage de molécules vaso-actives pouvant causer des lésions supplémentaires sur le greffon (Wood et al. 2012).

1.2. Les acteurs de la réaction allogénique

1.2.1. Les lymphocytes T

Nous apprenons dans nos cours d'immunologie que l'activation du lymphocyte T se fait par interaction avec une cellule présentatrice d'antigène. L'activation des lymphocytes T se fait via trois signaux (Zubler et al. 1982)[2]. Le premier signal est la liaison du récepteur des

lymphocytes T (TCR) au complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) situé à la surface d'une cellule présentatrice d'antigènes (APC). Le deuxième signal est la liaison de molécules de co-stimulation CD28 du lymphocyte T au CD80/CD86 de l'APC. Il y a ensuite production de CTLA4 qui module de manière compétitive la liaison CD28-CD80/CD86. Le troisième signal est la sécrétion de cytokines polarisantes qui activent la différenciation vers des lymphocytes de profils cytokiniques différents : Th1, Th2, Th17, Tregs. Chacune des phases de l'activation peut être la cible d'un traitement immunosuppresseur spécifique (cfr ci-dessous).

Les lymphocytes T sont donc des acteurs essentiels de la réaction immunitaire adaptative après stimulation allogénique. En effet, il a été montré que des rats privés de lymphocytes T par irradiation et repeuplé par la moelle osseuse d'animaux sans thymus sont incapables de rejeter une allo-greffe cardiaque (Kupiec-Weglinski et al. 1984) [3].

En l'absence d'anticorps préformés contre le donneur, la reconnaissance de l'alloantigène par le lymphocyte T est la première étape de la réaction immunitaire adaptative chez le receveur d'organe. Les allo-antigènes sont des peptides d'origine du donneur liés au complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe 1 (présents à la surface des toutes les cellules) ou de classe 2 (présents à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC)) (Adorini et al. 1990 ; Snell 1976)[4, 5]. Ce sont les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ qui sont les premiers activés par les MHC de classe 2 et de classe 1 respectivement.

La transplantation d'organe est une situation immunologique unique où les lymphocytes T du receveur peuvent être activés par ***trois voies différentes***.

La ***voie directe*** avec une reconnaissance directe du MHC à la surface des APCs du donneur ; la ***voie indirecte*** avec la reconnaissance d'un alloantigène du greffon, internalisé et lysé puis présenté comme un peptide à la surface de l'APC du receveur. Enfin, la ***voie semi-directe*** où l'APC du receveur présente à sa surface un complexe MHC-peptide intact du donneur (Figure 2).

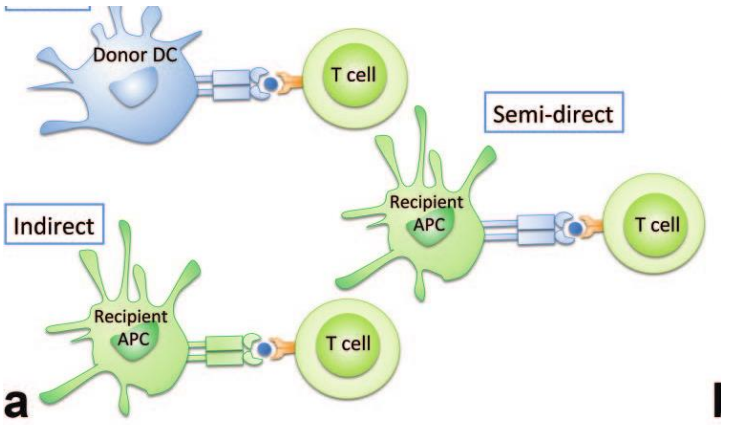


Figure 2 : Reconnaissance directe, semi-directe et indirecte dans la réaction allo-immune (adapté de Wood et al. 2012)

Classiquement et historiquement, la voie directe est considérée comme une réaction immunitaire de courte durée médiée par une activation des lymphocytes T $CD4^+$, responsable des rejets cellulaires aigus. La voie indirecte est considérée comme étant une réaction immunitaire dans la durée, médiée par une activation des lymphocytes T $CD4^+$ responsable de la progression vers le rejet cellulaire chronique (Siu et al. 2018)[6]. Mais cette vision est probablement trop simpliste. Les mécanismes expliquant les phénomènes immunologiques précoces sont probablement différents de ceux observés plus tardivement. La voie semi-directe est une voie via laquelle les lymphocytes T du receveur peuvent reconnaitre des MHC intactes du donneur comme observé dans la voie directe. Les clones des lymphocytes T activés dans la voie directe et semi-directe sont donc identiques alors que ceux de la voie indirecte sont différents.

La réponse allo-immune des lymphocytes T activés par la voie indirecte via des MHC de classe 1 est de plus longue durée alors que celle via les MHC de classe 2 serait de durée plus courte tout comme la réponse observée dans la voie directe (Ali et al. 2016)[7].

Des études animales sur des modèles de greffe cardiaque confortent cette hypothèse montrant l'importance de l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ via la voie indirecte dans l'apparition de vasculopathies chroniques des greffons (Lee et al. 2001)[8]. Les mêmes données ont été confirmées chez l'homme chez des patients transplantés du rein, du cœur et du poumon (Hornick et al. 2000 ; Baker et al 2001 ; Reznik et al 2001)[9-11].

Les lymphocytes T $CD8^+$ sont quant à eux essentiellement activés par des allo-antigènes présentés sur des molécules MHC de classe 1 par des cellules dendritiques (DCs) circulantes dans le contexte pro-inflammatoire post-greffe décrit ci-dessus. L'activation des lymphocytes T $CD8^+$ naïfs vers des effecteurs cytotoxiques nécessite néanmoins l'activation allo-spécifique des lymphocytes $CD4^+$. Cette activation du lymphocyte T $CD8^+$ par le lymphocyte T $CD4^+$ se fait via une APC intermédiaire créant ainsi un groupe de trois cellules. Cette tripartite cellulaire est identique à celle observée dans l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques en présence d'un antigène conventionnel mais la cellule présentatrice d'antigène provient ici du donneur (Figure 3 A et B). En théorie cette activation allo-spécifique ne peut se faire que dans la voie directe et donc très précocement après la transplantation.

Il existe néanmoins une activation allo-immune des lymphocytes $CD8^+$ plus tardive avec l'aide de lymphocytes T $CD4^+$ via la voie indirecte. Les évidences manquent encore dans la littérature pour confirmer les mécanismes qui sous-tendent cette activation tardive. Deux hypothèses non exclusives sont proposées. L'activation peut se faire via deux couples de cellules, une APC du receveur présentant un allo-antigène au lymphocyte $CD4^+$ et une cellule dendritique du donneur présentant une molécule MHC de classe 1 à un lymphocyte $CD8^+$. La voie semi-directe permet de réconcilier le triplet cellulaire si on accepte que la cellule présentatrice d'antigène présente simultanément une molécule MHC de classe 1 du donneur et MHC de classe 2 du receveur activant le lymphocyte $CD8^+$ et le lymphocyte $CD4^+$ (Figure 3C et 3D).

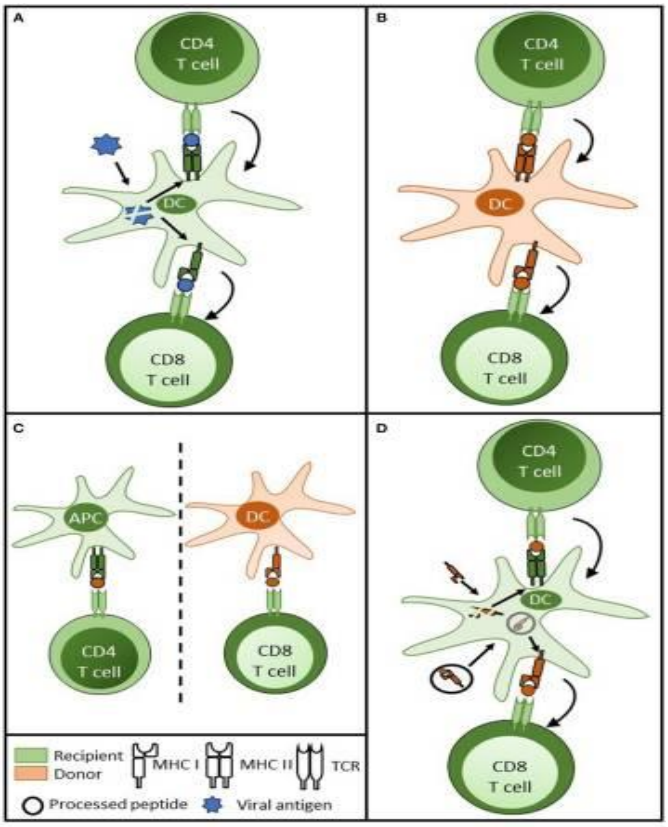


Figure 3. Adapté de Siu et al. 2018. A. Présentation d'antigène viral internalisé par une cellule dendritique aux lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ via une molécule MHC de classe 2 et de classe 1 respectivement, permettant une activation de la réponse $CD8^+$ cytotoxique plus efficace. B. En cas de transplantation on observe la formation similaire d'un cluster de trois cellules avec présentation par la cellule dendritique du donneur d'une molécule MHC de classe 2 et 1 intacte aux lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ respectivement. C. Activation d'un $CD4^+$ par la voie indirecte et activation par la voie directe d'un lymphocyte $CD8^+$ simultanément. D. Activation par la voie semi-directe d'un lymphocyte $CD8^+$ en présence d'une activation indirecte d'un lymphocyte $CD4^+$.

1.2.2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B et la production d'anticorps dirigés contre le greffon sont également des acteurs essentiels de la réaction allo-immune. De plus en plus de données cliniques semblent suggérer que le rejet humoral (antibody mediated rejection AMR) est une cause de dysfonction d'organe (Chong et al. 2019 ; Torija et al. 2019 ; Del Bello et al. 2019)[12-14]. La présence d'anticorps préformés circulants spécifiques du donneur (DSA) est associée à un risque accru de rejet cellulaire aigu dans les greffe de rein. Les DSA sont le plus souvent dirigés contre les molécules HLA (= MHC). Les DSA peuvent également cibler d'autres molécules incluant des antigènes d'histocompatibilité mineure et de temps en temps des autoantigènes non polymorphiques après rupture de la tolérance cellulaire B au soi. La signification clinique des

DSA non dirigés contre les molécules HLA n'est pas encore claire. La plupart des études sont focalisées sur les DSA anti-HLA.

L'apparition de DSA après la transplantation est associée, en transplantation rénale, à une évolution péjorative et des lésions vasculaires oblitérantes (Pouliquen et al. 2015.) Les DSA sont de plus en plus incriminés et étudiés dans la pathophysiologie du rejet chronique (Simpson et al. 2019)[15]. La réponse cellulaire B chronique impliquant une production prolongée d'anticorps est moins bien comprise à l'heure actuelle.

L'initiation de la réponse humorale dépendante de l'activation par les lymphocytes T se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires ou la rate (Figure 4.)

La présentation d'antigène aux lymphocytes B peut se faire par différentes voies. Classiquement on décrit la liaison directe à un antigène soluble intact bien que de plus en plus d'évidence laisse penser que la liaison du récepteur du lymphocyte B à un antigène lié à une membrane cellulaire (macrophage, cellule dendritique folliculaire, autre lymphocyte B non-spécifique) améliorerait la sélection des lymphocytes B de haute affinité (Heesters et al. 2016)[16]. Le lymphocyte B internalise ensuite l'antigène et son récepteur et présente les peptides après traitement sur des molécules MHC de classe 2 pour l'interaction antigène-spécifique du récepteur du lymphocyte $CD4^+$. Dans la relation allo-immune, les lymphocytes $CD4^+$ du receveur, spécifiques d'antigènes du donneur, sont les seuls capables de médier la différenciation des lymphocytes B vers des plasmocytes produisant des DSA.

Les DSA produits chez le receveur activent les mêmes cascades que celles présentes lors des infections, l'activation du complément (rejet aigu), l'activation des neutrophiles, des macrophages et des cellules NK (rejet chronique) (Hirohashi et al. 2011) [17]. La plupart des cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules HLA classe 2, on comprend que les vaisseaux du greffon soient le siège des lésions médiées par le rejet humoral.

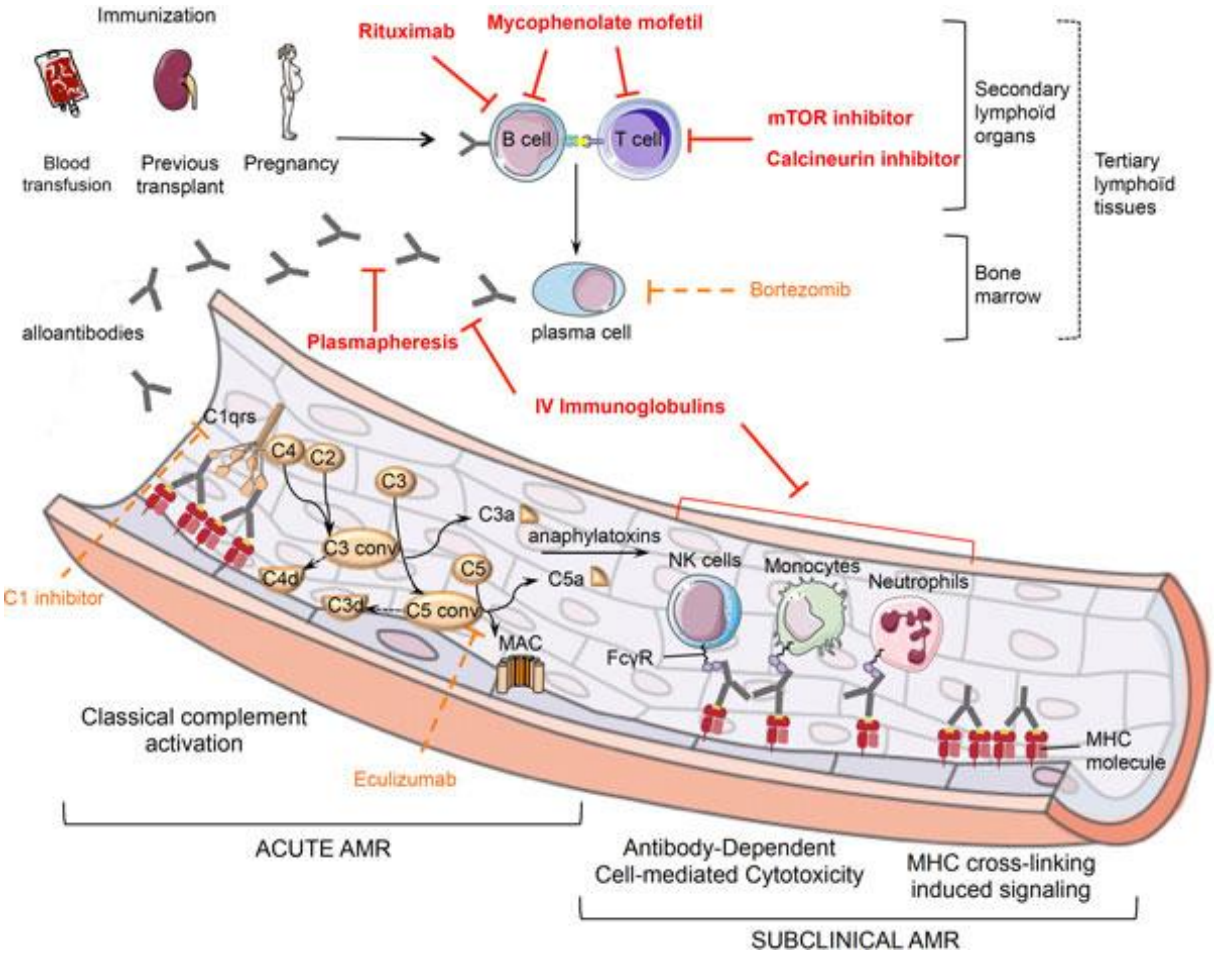


Figure 4. Adapté de Pouliquen et al. 2015. Représentation schématique de la physiopathologie du rejet cellulaire humoral. AMR, antibody-mediated rejection; Conv, convertase; IV, intravenous; MAC, membrane attack complex; MHC, major histocompatibility complex; mTOR, mammalian target of rapamycin; NK, natural killer. Les thérapies à notre disposition sont en rouge.

Le rôle des lymphocytes B dépasse la production de DSA. Ce sont également des acteurs de l'immunorégulation, pesant dans la balance rejet/tolérance dans le contexte des greffes d'organes solides (Chesneau et al. 2013)[18].

1.2.3. Les cellules dendritiques (DCs)

Les cellules dendritiques forment une famille hétérogène et ubiquitaire de cellules présentatrices d'antigène, dérivées de la moelle osseuse, jouant le rôle important de sentinelle du corps humain (Tableau 1, Dai et al. 2019)[19]. Elles font le lien entre l'immunité innée et adaptative. Les cellules dendritiques sont divisées en cellules matures, immatures et régulatrices selon leur degré de maturation et leur statut fonctionnel. Il existe des DCs conventionnelles

myéloïdes (mDCs) et des DC non-conventionnelles, plasmacytoïdes. Une troisième famille comprend des cellules dérivées des monocytes (moDCs) avec des propriétés similaires aux cellules dendritiques. La dernière famille se retrouve dans l'épiderme, il s'agit des cellule de Langerhans (Tableau 1).

A côté de leurs rôles importants de capture, de transformation et de présentation d'antigène à leur surface activant les lymphocytes T comme décrit dans les précédentes sections, les cellules dendritiques ont également un rôle essentiel dans la préservation de la tolérance au soi (voir point cellules dendritiques tolérogènes.)

Human DC subsets	Phenotype	Location	Function
Plasmacytoid DC	CD123 CD303/BDCA-2 CD304/BDCA-4	Blood, tonsil, non-lymphoid tissues	Production of type I and III IFN
Myeloid cDC1	CD141/BDCA-3	Blood, tissues, and lymphoid organs	Present Ag to CD8+T cells and produce type III IFN
Myeloid cDC2	CD1c/BDCA-1 CD2 CD11c CD11b	Blood, tissues and lymphoid organs	Activate Th1/Th2/Th17 and $CD8^+$T cells
Langerhans cells	CD207 CD1a E-Cadherin	Skin (epidermis)	Transfer Ag to afferent lymphatics, stimulate $CD8^+$T cells
Mo-DC	CD11c CD1c/BDCA-1 CD1a	*Ex vivo*-generated	

Tableau 1. Types de cellules dendritiques rencontrées chez l'homme, phénotypes, localisation et fonction.

Directement après la transplantation d'organe, les cellules dendritiques sont d'abord impliquées dans la réponse immunitaire innée, au même titre que les macrophages, les cellules NK et les monocytes. Leur activation se fait par la reconnaissance des DAMPs relargués par les cellules du donneur entrainant l'activation des récepteurs toll-like (TLRs) et la cascade du complément (Wood et al 2012 ; Ochando et al. 2019 ; Grafals et al. 2019)[1, 20, 21]. L'ensemble de ces phénomènes entraine la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (notamment IL-12) faisant le lit de la réaction immunitaire adaptative observée lors du rejet cellulaire aigu.

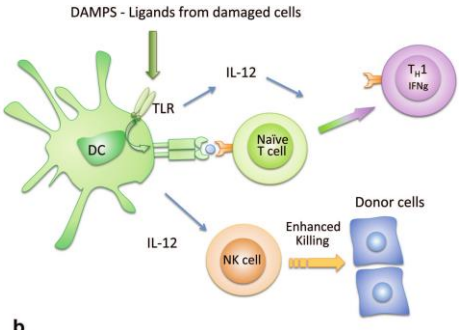


Figure 5. Adapté de Wood et al. 2012. L'activation des TLRs par les DAMPs entraine le relargage d'IL12 et l'activation des lymphocyte T naïfs ainsi que des cellules NK.

1.3. La tolérance immunitaire

La tolérance immunitaire en transplantation d'organe solide est l'absence d'activation délétère du système immunitaire à l'encontre de l'organe transplanté, en l'absence de thérapie immunosuppressive ou anti-inflammatoire. Un parallèle peut être fait entre la tolérance à une allogreffe et la tolérance au soi. Les mécanismes impliqués sont entre autres l'anergie, la délétion des lymphocytes T allo-réactifs et la suppression des lymphocytes allo-réactifs (Figure 6, adapté de *Cellular and Molecular immunology* de Abbas, Elsevier 2015).

L'induction de la tolérance en transplantation d'organe est souhaitable afin de réduire les thérapeutiques immunosuppressives qui induisent une susceptibilité aux infections, une majoration du risque de cancer via leur effet sur le système immunitaire en plus de leur toxicité propre.

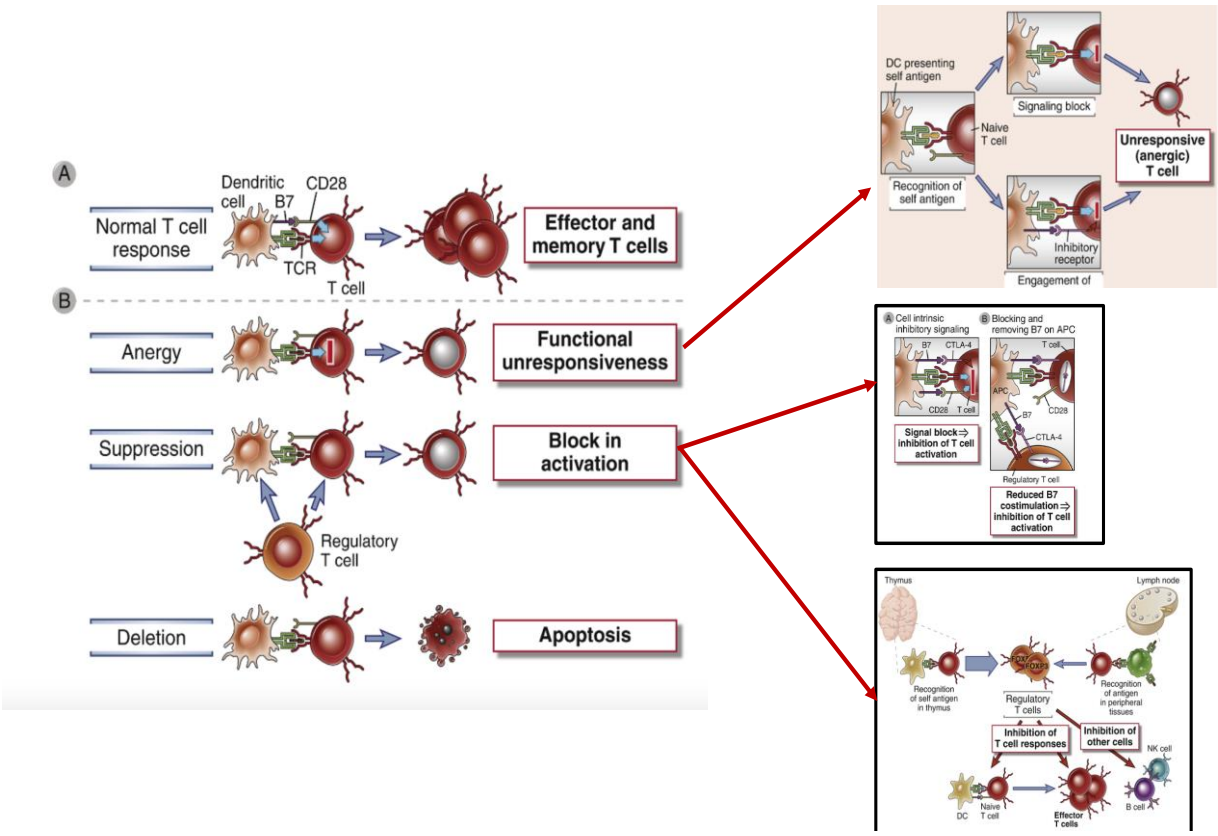


Figure 6. Mécanismes de tolérance cellulaire T périphériques. A. Réponse cellulaire T normale. B. Les mécanismes impliqués sont l'anergie, la suppression et la délétion. L'anergie est l'absence de stimulation du lymphocyte T après contact avec l'APC. La suppression peut survenir en l'absence de co-stimulation ou en présence d'un récepteur inhibiteur comme CTLA-4 ou PD-1. Les lymphocytes T régulateurs sont générés par reconnaissance d'auto-antigènes dans le thymus et d'antigène dans les organes lymphoïdes périphériques.

Contrairement aux autres organes, le foie est un organe privilégié sur le plan de la tolérance immunitaire. Son anatomie particulière avec un apport sanguin mixte, artériel et veineux d'une part, les nombreuses cellules immunitaires qui y résident d'autre part, confèrent au foie des propriétés particulièrement intéressantes lorsqu'on le transplante seul mais également lorsqu'il est associé à une transplantation d'autres organes, principalement le rein. Ces propriétés sont connues depuis plus de 50 ans. Il avait été montré que les foies transplantés à des porcs avaient une survie prolongée sous immunosuppression réduite, par rapport aux autres organes comme la peau, le cœur et les reins qui étaient quant à eux rapidement rejetés (Calne et al. 1965)[22]. Ce phénomène a été observé ensuite sur d'autres modèles animaux. Des études réalisées chez l'homme ont montré qu'il était également possible de se passer totalement d'immunosuppression chez des patients très sélectionnés (Feng et al. 2012)[23]. Des études sont en cours pour comprendre quelles sont les meilleures stratégies à adopter en terme

d'immunosuppression pour augmenter encore les chances d'arriver à une tolérance opérationnelle (Abrol et al. 2019)[24].

Durant les deux dernières décennies, des progrès impressionnants ont été réalisés dans la compréhension de la biologie des cellules régulatrices et leur rôle dans l'auto-immunité, les infections, les cancers et la transplantation. Les cellules les mieux connues sont les lymphocytes T régulateur $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$.

Différentes stratégies ont été envisagées jusqu'à présent pour favoriser la tolérance au greffon. Elles sont basées sur les principes de déplétion des lymphocytes T périphériques effecteurs, l'augmentation des cellules régulatrices (Tableau 2), principalement les lymphocytes T régulateurs (Tregs) qui sont les plus étudiées, et l'induction d'un chimérisme du donneur par la transplantation simultanée de cellules souches hématopoïétiques.

Plus récemment la modulation de l'immunité innée, via les cellules dendritiques, a été envisagée. Les cellules dendritiques sont une cible intéressante compte tenu du rôle central qu'elles jouent en transplantation. C'est principalement dans la voie de reconnaissance indirecte que devrait se concentrer les recherches compte tenu de son rôle dans le développement du rejet chronique. Sa modulation pourrait être potentiellement la voie de l'induction de la tolérance.

The immunoregulatory cells.

Immunoregulatory cell	Cell Makers	Function of immunomodulatory
Regulatory T cell(Treg)	$CD4^{+}$ $CD25^{+}$ $Foxp3^{+}$	Cytolysis; Secretion of IL-10, TGF-β, and IL-34; Interference of targeted cell metabolism; Inhibition of immune response through targeted dendritic cells;
Regulatory B cell (Breg)	$CD19^{+}$ $CD24^{high}$ $CD38^{high}$ (Not yet a criterion for its makers)	Secretion of cytokines such as IL-10; Cognate suppression; Cell contact-mediated inhibition; Bystander suppression and indirect suppression;
Immature dendritic cell (iDC)	$CD8^{+}$ $CD11^{+}$ $CD80^{low}$ $CD83^{-}$ $CD86^{low}$ MHC-II^{low}	Killing specific $CD8^{+}$ T cell through perforin and granzyme A ; Inducing naive T cells to differentiate into Tregs rather than effector T cells;
Mesenchymal stem cell (MSC)	$CD105^{+}$ $CD73^{+}$ $CD90^{+}$ $CD14^{low}$ $CD34^{low}$ $CD45^{low}$ HLA-DR^{low} (Different cell makers in different kinds of cells)	Suppression of natural killer cell; Promotion of maturation of dendritic cells; Inhibition of allogeneic T cells response; Induction of Tregs proliferation ;
Myeloid derived suppressor cell (MDSC)	Lin^{-} HLA^{-} DR^{-} $CD33^{+}$ /$CD11b^{+}$ $CD14^{-}$ $CD33^{+}$	Inhibition of proliferation of T cells through the expression of high levels of Arg1 and Inos; Inhibition of T cell peptide/MHC interaction; Inhibition of allogeneic immune responses by heme oxygenase-1 (HO-1) in combination with IL-10; Induction of Tregs proliferation;
Facilitating cells	$CD8^{+}$ TCR^{-}	Enhancing engraftment of HSCs through inducation of IL-10 $^{+}$ Bregs and inducation of antigen-specific Tregs;
Plasmacytoid dendritic cells (pDC)	$CD123^{+}$ $CD303^{+}$ $CD3^{-}$ $CD19^{-}$	Down-regulation of pro-inflammatory T cell subsets; Induction of Tregs proliferation ;
Regulatory macrophage (Mreg)	$CD14^{+}$ $CD16^{+}$ $CD80^{+}$ $CD86^{+}$	Induction of T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by IFN-γ; Contact-dependent deletion of activated T cells;
Natural killer cell (NK cell)	$CD3^{-}$ $CD16^{+}$ $CD56^{+}$	Secretion of cytokines such as IL-10; Promotion of Th2 cells differentiation; Induction of Tregs proliferation; Killing of allogeneic DCs;

Tableau 2. Cellules immuno-régulatrices, marqueurs cellulaires et fonctions immuno-modulatrices (adapté de Zeng et al. 2020)[25].

Une meilleure connaissance des mécanismes qui sous-tendent cette tolérance immunitaire permet également de définir des biomarqueurs permettant au clinicien de mieux détecter les patients potentiellement tolérants (Mastoridis et al. 2016, Levitsky et al. 2019)[26, 27]. Les biomarqueurs sont probablement différents en fonction de l'organe transplanté et la signature de tolérance doit donc être individualisée. Les lymphocytes T régulateurs semblent néanmoins être un acteur commun essentiel dans les mécanismes de tolérance (Taubert et al. 2015 ; Lozano et al. 2011)[28, 29].

1.3.1. Lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les Tregs sont une sous-classe particulière de lymphocyte T $CD4^+$ auxiliaires ayant une fonction régulatrice de la réponse immunitaire et d'induction de la tolérance immunitaire (Vignali et al. 2008 ; Sharma et al. 2018) [30, 31] (Figure 6). Les Tregs constituent approximativement 1 à 3% de la population globale des lymphocytes T $CD4^+$ circulant en périphérie.

La majorité de ces Tregs exprime de manière importante à leur surface le marqueur CD25, chaine α du récepteur de l'IL-2. Le CD25 étant également un marqueur de tous les lymphocytes T activés, il n'est pas suffisant pour définir les Tregs. Ils sont également caractérisés par un facteur de transcription appelé FoxP3, de la famille des facteurs de transcription « forkhead » qui joue un rôle crucial dans leur développement et leur fonction.

Le syndrome IPEX (**I**mmune dysregulation, **P**olyendocrinopathy, **E**nteropathy, **X**-linked) est une maladie génétique rare causée par une mutation dans le gène *FoxP3* mettant en évidence l'importance des Tregs dans le maintien de la tolérance du soi. Les souris *Scurfy* présentent une délétion du FoxP3 et développent une pathologie auto-immune fatale, mais contrairement au modèle murin où l'induction de FoxP3 suffit à lui seul à conférer aux lymphocytes T des capacités régulatrices, chez l'homme cela n'est pas suffisant (Wang et al. 2007)[32]. Il a donc fallu trouver d'autres marqueurs de Tregs chez l'homme. Il a ainsi été montré que le marqueur CD127 (ou IL-7R) avait une expression réduite dans les Tregs. On peut donc définir les Tregs par les marqueurs suivants : $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ (Liu et al. 2007)[33].

Les mécanismes de suppression des Tregs ont été décrits in vitro. Les quatre modes d'action principaux sont : le détournement métabolique, la modulation de la maturation des APC, la

production de cytokines anti-inflammatoires et l'induction d'apoptose dans des cellules cibles (Figure 7 ; Safinia et al. 2015)[34].

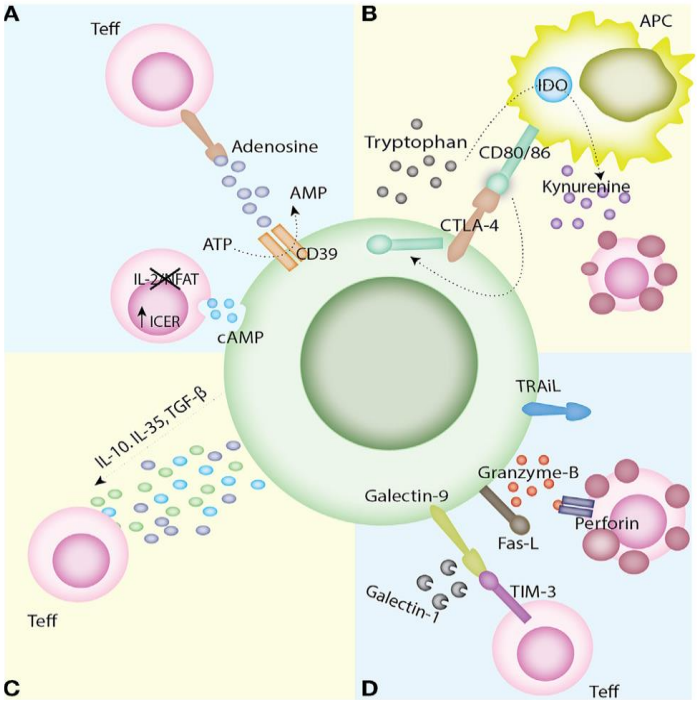


Figure 7. Adapté de Safinia et al. 2015. Mécanismes de suppression par les Tregs A. Perturbation des voies enzymatiques. L'ectoenzyme CD39 utilise l'ATP qu'il transforme en AMP et adénosine. On observe des taux intracellulaires d'AMP cyclique importants. L'AMP cyclique est transféré vers les lymphocytes T effecteurs avec comme effet un régulation de ICER, une inhibition de NFAT et un défaut de transcription d'IL-2 entrainant une mort par apoptose des lymphocytes T par déprivation d'IL-2. B. Modulation des fonctions des APC. Le CTLA-4 des Tregs se lie au CD80/86 des APC avec un signal de contrôle négatif vers le lymphocyte T. C. Production de cytokines anti-inflammatoires. D. Induction d'apoptose par le granzyme A/B et la perforine, TRAIL, la voie Fas/Fas-Ligand et la voie Galectin-9/TIM3. *Abréviations : APC, antigen presenting cell; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CD, cluster differentiation; CTLA-4-cytotoxic T lymphocyte antigen-4; DC, dendritic cells; ICER, inducible cAMP early repressor, IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase IL, interleukin; NFAT, nuclear factor of activated T cells; TGF-β, transforming growth factor-β; TIM-3, T cell immunoglobulin and mucin domain-3; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand; Treg, regulatory T cells.*

Il existe plusieurs sous-types de Tregs, des Tregs centraux (cTregs) développés au sein du thymus et des Tregs périphériques (pTregs) induits. Les premiers sont sélectionnés négativement au sein des thymocytes, les seconds sont développés dans un environnement pro-tolérogène avec la présence d'IL-10, de TGF-β et d'IL-2.

La sélection négative des lymphocytes $CD4^+$ dans le thymus dépend de l'intensité du signal que reçoit le récepteur des lymphocytes T (TCR) (Review de Caramalho et al. 2015)[35]. Un signal

très fort va entrainer l'apoptose de la cellule par sélection négative. Un signal intermédiaire permettra au lymphocyte d'échapper à la délétion et de se différencier vers un lymphocyte T régulateur. Il est possible que la qualité du message reçu par le TCR diffère également lors de la différenciation des lymphocytes T régulateurs ou T conventionnels.

Les lymphocytes T $CD4^+$ FoxP3 négatifs peuvent donc également être différenciés en périphérie vers des cellules $FoxP3^+$. Les pTregs sont promus par des antigènes étrangers contrairement au cTregs. Ces pTregs ont un répertoire TCR avec une affinité très haute et le répertoire est seulement partiellement superposable à celui des cTregs. La génération de pTregs se fait in vivo également lorsque la co-stimulation CD28-CD80/CD86 est suboptimale. On peut donc conclure qu'un taux faible de molécules de co-stimulation en présence de cytokines anti-inflammatoires sécrétées par des cellules dendritiques tolérogènes promeut la différenciation des pTregs (Romano et al. 2019)[36]. L'IL-2 joue également un rôle essentiel dans la formation des Tregs. Les souris qui n'ont pas d'IL-2 ou d'IL-2Rα ont une diminution des thymocytes $Foxp3^+$.

Il existe un autre type de Tregs périphériques inductibles, les Tr1. Ces lymphocytes T sont caractérisés par la production de l'IL-10, cytokine immunosuppressive, de TGF-β mais ne sécrète pas ou peu d'IL-2, IL-4 ou IL-17. Ils sont caractérisés par $CD4^+CD49b^+LAG3^+$ et sont $FoxP3^-$ (Huang et al. 2018)[37]. Ils sont capables de stimuler uniquement transitoirement le FoxP3. Leur rôle dans le maintien de la tolérance périphérique et la modulation de la réponse cellulaire T effectrice a été démontré dans des pathologies auto-immunes comme le diabète et dans la prévention du rejet de greffe (Gregori et al. 2018)[38].

1.3.2. Les lymphocytes B régulateurs (Bregs)

Alors que les lymphocytes B sont traditionnellement cantonnés à leur rôle de production d'anticorps, de présentation d'antigène et de production de cytokines, des études ont montré qu'il existait des lymphocytes B avec des propriétés régulatrices. Ces cellules par analogie aux Tregs sont appelées Bregs. Initialement, ces cellules ont été décrites dans les pathologies auto-immunes, les cancers et les infections. Elles peuvent également être impliquées dans la modulation de la réaction allo-immune observée en transplantation. (Wortel et al. 2017 ; Chesneau et al. 2013)[18, 39].

Les Bregs ont été principalement caractérisés chez la souris. Il existe une multitude de sous-classes de Bregs définies par leur marqueurs membranaires. Les plus largement étudiées sont les cellules B10, caractérisées par les marqueurs $CD19^{+}CD1d^{+}CD5^{+}$ et productrices d'IL-10. Ils représentent 1 à 2% des cellules spléniques murines.

Chez l'homme, les Bregs sont encore moins bien connus en raison d'une accessibilité limitée à la rate. Les Bregs décrits sont les cellules B transitionnelles caractérisées par $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$, les plasmablastes ($CD19^{+}CD27^{int}CD38^{+}$), les cellules B régulatrices 1 (Br1) ($CD19^{+}CD25^{+}CD71^{+}CD73^{-}$) . Un équivalent des cellules B10 de la souris a également été décrit chez l'homme avec les caractéristiques suivantes $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$. Leur fonction régulatrice est médiée par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, IL-35 et le TGFβ et par la promotion des Tregs (Figure 8. Adapté de Wortel et al. 2017). Pour exercer leur fonction tolérogène, les Bregs ont besoin d'autres cellules, notamment les Tregs (Kimura et al. 2019 ; Lee et al. 2012)[40, 41].

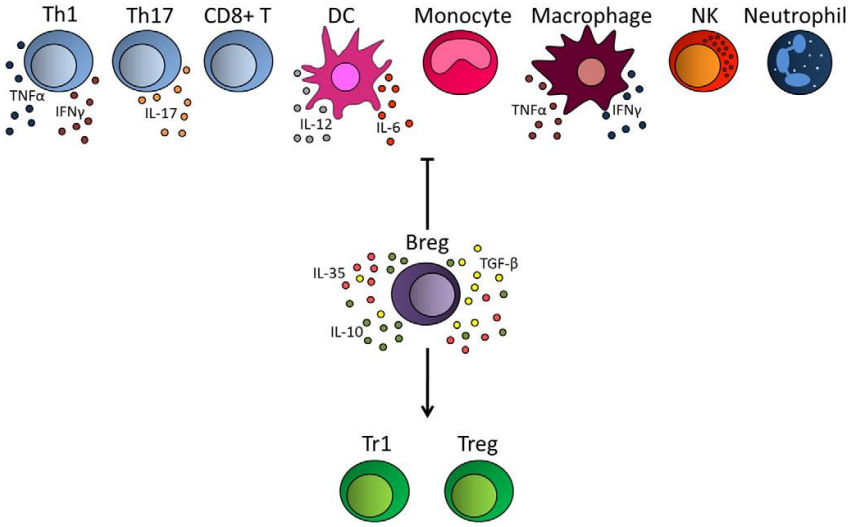


Figure 8. Les Bregs empêchent la différenciation et la fonction de cellules proinflammatoires comme les lymphocytes T CD 4^{+} auxiliaires, Th17 et les lymphocytes T $CD8^{+}$. Ils promeuvent la différenciation des cellules anti-inflammatoires, Treg et Tr1 via la production de cytokines IL-10, IL-35 et TGF-β.

En transplantation d'organe, les Bregs jouent un rôle important. Clatworthy et al. ont décrit en 2009 une augmentation inattendue du nombre de rejets chez des patients transplantés du rein qui recevaient du rituximab (un anti-CD20) en l'absence de corticoïdes comme traitement inducteur en post-opératoire en comparaison au daclizumab (un anti-CD25). La déplétion des

lymphocytes B serait donc délétère pour la tolérance au greffon directement après la transplantation (Clatworthy et al. 2009)[42].

En 2014, Cherukuri et al. ont montré une diminution des Bregs transitionnels $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ chez des patients transplantés du rein qui présentaient un rejet du greffon en comparaison avec les patients ayant une fonction du greffon stable ou avec les contrôles sains (Cherukuri et al. 2014)[43].

Le rôle que jouent réellement les Bregs dans la tolérance au greffon reste néanmoins encore à définir. Au vu des capacités pro-tolérogènes de ces cellules, l'infusion de Bregs pourrait devenir un outil thérapeutique de promotion de la tolérance en transplantation d'organe.

1.3.3. Cellules dendritiques tolérogènes (Tol-DCs)

Le rôle essentiel des cellules dendritiques et l'hétérogénéité de leur population cellulaire ont été décrits plus haut.

Un des rôles physiologiques des cellules dendritiques est de coordonner une réponse adéquate face aux auto-antigènes afin de préserver la tolérance du soi. Des études récentes ont mis en lumière la possibilité de générer des cellules dendritiques tolérogènes *in vitro/ex vivo* selon des procédures bien codifiées.

Le modèle « naturel » de cellules dendritiques tolérogènes est la cellule dendritique immature qui possède en effet de nombreuses caractéristiques attendues chez les tol-DCs. Ces iDCs sont malheureusement instables en condition pro-inflammatoire et ne préservent pas leurs fonctions tolérogènes. Les tol-DCs modulent la réponse des lymphocytes T effecteurs par divers mécanismes dont l'induction d'anergie et la délétion clonale suite à une expression inadéquate de molécules de co-stimulation. L'apoptose des lymphocytes T naïfs et mémoires via la voie Fas/FasL et une expression majorée de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui entraine une consommation du tryptophane nécessaire à la prolifération cellulaire T sont d'autres mécanismes tolérogènes. Les tol-DCs sont également capables de promouvoir des cellules régulatrices Tregs, Tr1, Bregs. Enfin on observe également la sécrétion de molécules immuno-modulatrices comme PD-L1 et des cytokines anti-inflammatoires IL-10, TFGβ (Moreau et al. 2012 ; Obregon et al. 2017 ; Rosen et al. 2018 ; Ochando et al. 2019)[44-47]. Une dernière voie via laquelle les tol-DCs peuvent moduler la réaction allo-immune sont les exosomes. Ces

nanovésicules de membrane ont été décrites dans les années 1980 et sont produites par différents types cellulaires dont les cellules dendritiques. On peut observer à leur surface différentes molécules qui sont le reflet de leur cellule d'origine. Les exosomes portant à leur surface des MHC peuvent activer une réponse allo-immune. En 2016, Liu et al. ont démontré dans un modèle murin de greffe cardiaque que des vésicules extracellulaires du donneur pouvaient activer les cellules dendritiques du receveur générant une réponse allo-immune spécifique[48]. En 2003, Pêche et al. avaient également montré chez le rat que la présentation de MHC du donneur sur des exosomes dérivés de cellules dendritiques du donneur prolongeait la durée de vie des greffons cardiaques s'ils étaient administrés avant la transplantation[49].

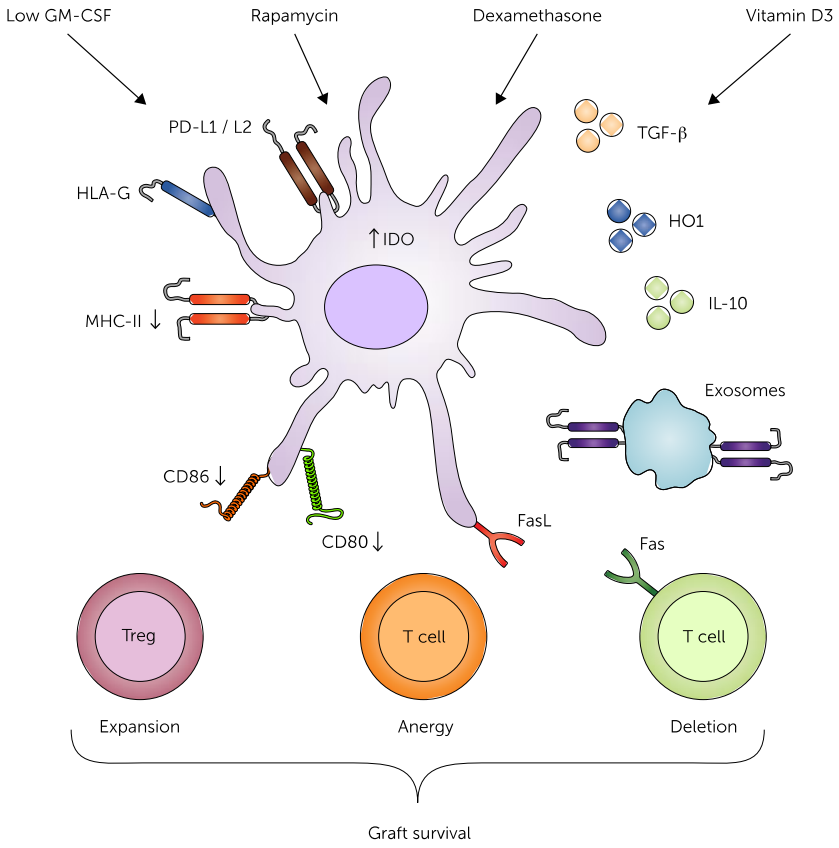


Figure 9. Adapté de Ochando et al. 2019. Facteurs promouvant la génération de cellules dendritiques tolérogènes, leur phénotype, les produits qui régulent la réponse allo-immune et induisent la tolérance du greffon.

Le rôle potentiel des tolDCs comme nouvelle approche de thérapie cellulaire induisant la tolérance du greffon tout en réduisant la dépendance aux immunosuppresseurs sera décrit dans les perspectives de ce travail.

2. Les immunosuppresseurs utilisés en transplantation d'organes solides

La cible de choix des immunosuppresseurs classiquement utilisés en transplantation est le lymphocyte T. Les molécules agissent en bloquant les différents signaux d'activation du lymphocyte T en fonction de leur cible thérapeutique.

2.1.Les anti-calcineurines

Les inhibiteurs de calcineurines (CNI) sont la colonne vertébrale de l'immunosuppression moderne. Ils comprennent la cyclosporine et le tacrolimus.

2.1.1. **La cyclosporine**

La découverte de la ***cyclosporine*** a révolutionné la transplantation d'organe solide en améliorant la survie des greffons et des patients et en ouvrant la voie à de nouvelles perspectives.

La cyclosporine est un polypeptide cyclique lipophile de 11 acides aminés, isolé au départ d'un champignon, le *Tolypocladium inflatum*, initialement découverte en 1969. C'est en 1972 que ses propriétés immunosuppressives ont été identifiées (Calne et al. 1978). Utilisée en pratique clinique pour la première fois en 1978, l'équipe de Cambridge a montré sa capacité à prévenir le rejet cellulaire aigu chez des patients transplantés du rein. L'équipe de Denver/Pittsburgh a ensuite montré ce même rôle chez des patients transplantés du foie (Starzl et al. 1981)[50, 51].

La cyclosporine agit en se liant à la cyclophiline dans le cytoplasme cellulaire. Ce complexe lie ensuite la calcineurine. Le bloquage de la calcineurine entraine une inhibition de la phosphorylation du NFAT qui prévient la transcription de l'IL-2, l'IFN-γ maintenant le lymphocytes en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire. Il y a donc finalement un blocage de la prolifération des lymphocytes T et par ce biais une immunosuppression. (Figure 10)

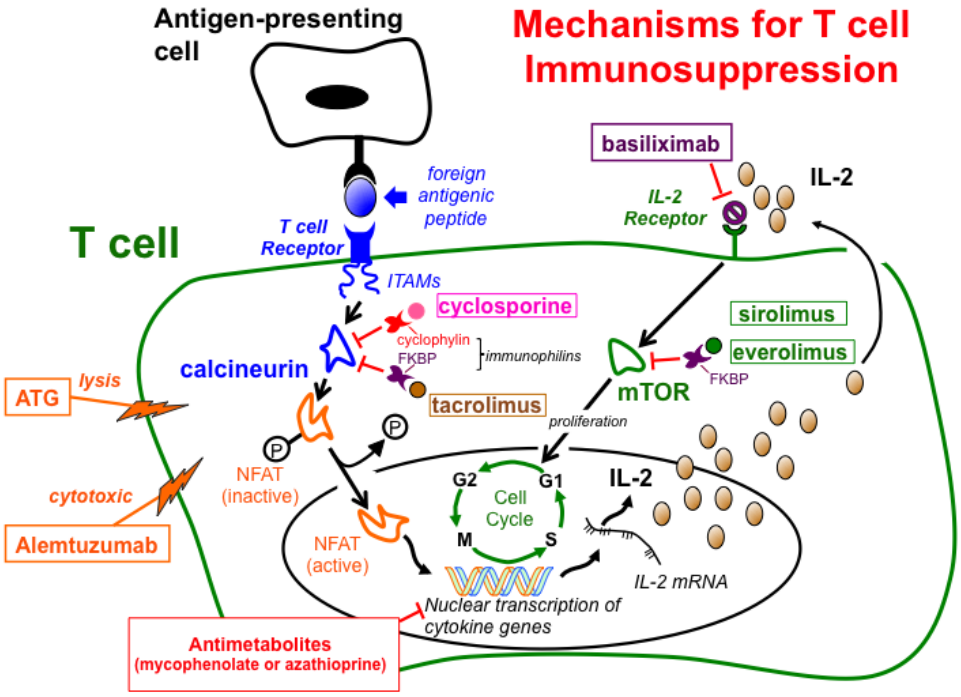


Figure 10 : (adapté de Wood and Goto 2012[1]) Cibles thérapeutiques des immunosuppresseurs utilisés en transplantation d'organes solides.

La cyclosporine a une faible biodisponibilité et une fenêtre thérapeutique restreinte. Une formulation spécifique dans des capsules pour microémulsion a été développée depuis sa découverte permettant une amélioration de sa biodisponibilité. La métabolisation de la cyclosporine se fait par le CYP P-450 3A4 qui métabolise de nombreuses autres molécules. De nombreuses interactions médicamenteuses sont donc documentées et un suivi du dosage sérique est indispensable pour éviter la survenue d'effets secondaires (Fahr et al. 1993 ; Faulds et al. 1993)[52, 53].

Les effets secondaires principaux de la cyclosporine sont une néphrotoxicité, une neurotoxicité (céphalées, tremblements, confusion, dysarthrie) et une hyperplasie gingivale ainsi qu'un hirsutisme.

2.1.2. Le tacrolimus

Le ***tacrolimus*** a été développé plus récemment. Initialement connu comme FK506, il s'agit d'un macrolide isolé au départ du *Streptomyces*, un actinomycète (Kino et al. 1987)[54]. La première utilisation clinique s'est faite chez les patients transplantés du rein en 1989. Starzl et al. ont ensuite décrit leur expérience chez les transplantés hépatiques, rénaux et pancréatiques

la même année (Starzl et al. 1989)[55]. Le tacrolimus se lie à la FKBP-12, une immunophiline qui se lie à la calcineurine prévenant, tout comme la cyclosporine, la phosphorylation de NFAT avec comme conséquence une inhibition de la transcription d'IL2, d'IFNγ maintenant le lymphocytes en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire (Figure 10).

La puissance du tacrolimus est cent fois supérieure à celle de la cyclosporine en raison d'une affinité plus haute de son immunophiline pour la calcineurine. La biodisponiblité est également 20% plus importante en condition de jeûne. La métabolisation se fait également par le CYP P-450 3A4 avec les mêmes précautions en termes d'interaction médicamenteuse que la cyclosporine. La demi-vie du médicament est de 11,7 heures. Une formulation avec une demi-vie plus longue permettant une prise unique quotidienne (Advagraf ®) est également utilisée, permettant une compliance plus importante et une diminution de certains effets secondaires notamment rénaux et neurologiques (Danguilan et al. 2019 ; Cassuto et al. 2016)[56, 57].

Les effets secondaires du tacrolimus sont une néphrotoxicité, menant parfois à une insuffisance rénale terminale justifiant une (re-)transplantation rénale, une neurotoxicité avec essentiellement des tremblements, du diabète sucré *de novo* et une hypertension artérielle.

Compte tenu de ces effets secondaires importants, d'autres stratégies sont envisagées afin de limiter les taux sériques de tacrolimus et de favoriser la tolérance immunitaire.

2.2. Les anti-métabolites

2.2.1. Le mycophénolate mofetil (MMF)

Le MMF est une prodrogue de l'acide mycophénolique active après hydrolyse. La molécule agit sur le 3e signal du lymphocyte T. Il inhibe de manière non compétitive et réversible l'IMPDH. L'activité de cet enzyme est une étape limitante de la synthèse de novo des nucléotides puriques et donc par ce biais inhibe la prolifération des lymphocytes T. Les autres cellules ont la capacité de recycler les bases puriques via une voie de sauvetage, ce qui n'affecte donc pas leur synthèse (Bardsley-Elliot et al. 2012)[58].

La molécule a été essayée pour la première fois en 1995 dans le contexte de la transplantation rénale. Elle a ensuite été largement utilisée dans les schémas de maintenance d'immunosuppression cardiaque, hépatique, pulmonaire et pancréatique. Son efficacité dans la

prévention des rejets aigus et chroniques en association avec les anticalcineurines a largement été démontrée (Bardsley-Elliot et al. 2012)

Le mycophenolate mofetyl a été prouvé supérieur à l'azathioprine pour la prévention des rejets cellulaires aigus chez les patients transplantés du rein. Il en est de même en transplantation cardiaque où une large étude multicentrique randomisée et contrôlée a montré une nette amélioration de la survie des greffons et également des patients traités par MMF par rapport à ceux traités par azathioprine (Bardsley-Elliot et al. 2012).

Le MMF est rapidement et complètement converti vers le métabolite actif après administration orale. La biodisponibilité orale de l'acide mycophénolique est estimée à 94% (Coelho et al. 2012)[59]. L'absorption est réduite par les aliments. La demi-vie est de 17 heures.

L'effet secondaire principal est une neutropénie, surtout au cours des six premiers mois suivant la transplantation. On observe également fréquemment des troubles gastro-intestinaux, de la diarrhée mais également de la nausée et des douleurs abdominales. L'acide mycophénolique sodique avec enrobage entérique peut être utilisé en cas de problèmes digestifs récidivants (Myfortic®). Notons enfin une tératogénicité qui empêche son utilisation durant la grossesse et impose une double contraception chez les patientes.

2.2.2. L'azathioprine

L'azathioprine est une des plus anciennes molécules immunosuppressives utilisée en transplantation d'organe solide. Elle est utilisée depuis plus de 50 ans. C'est une pro-drogue de la 6-mercaptopurine, un inhibiteur de l'IMPDH tout comme l'acide mycophénolique (Figure 11). Elle inhibe donc également la division du lymphocyte T.

Les effets secondaires sont essentiellement une cytopénie et des problématiques gastro-intestinales de type nausée et vomissements. Les cytopénies sont favorisées par des mutations de la thiopurine méthyl-transférase, enzyme de conjugaison inactivant l'azathioprine.

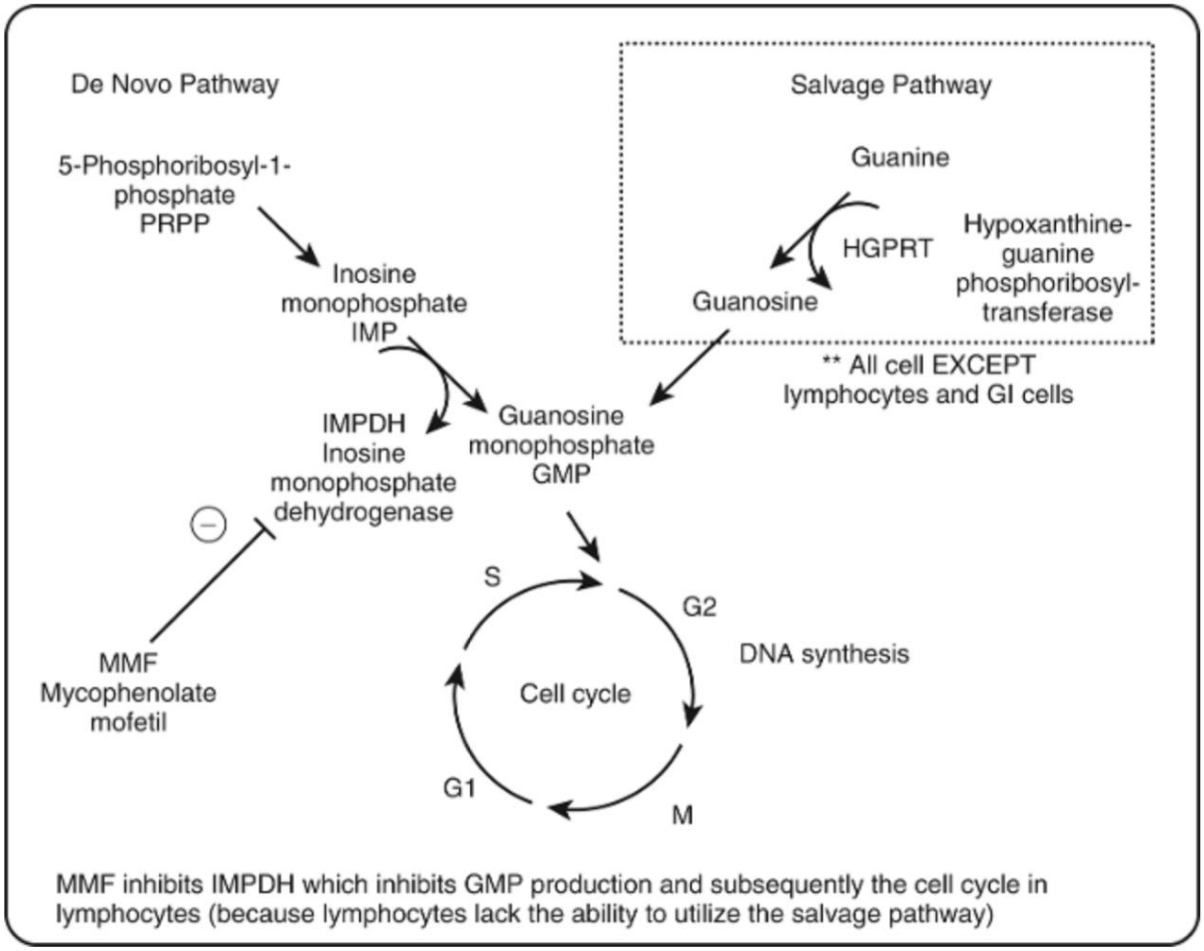


Figure 11. Le 6-mercaptopurine et l'acide mycophénolique bloquent l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) de la voie de synthèse *de novo* des bases puriques. Les lymphocytes n'ayant pas la voie de sauvetage tout comme les cellules intestinales voient donc leur synthèse des purines bloquée, limitant la prolifération cellulaire (Transplantation of the liver, Ronald Busuttil 2015).

2.3. Les inhibiteurs mTOR

Les inhibiteurs mTOR, ***sirolimus*** et ***everolimus,*** sont des immunosuppresseurs également utilisés en thérapie anti-cancéreuse, agissant au niveau de la même immunophiline que le tacrolimus, la FKBP-12. Ce complexe n'interagit pas avec la calcineurine mais est un inhibiteur hautement spécifique de mTOR.

La voie mTOR est un senseur clé de l'homéostasie cellulaire intégrant les informations de l'environnement extra- et intra-cellulaire. mTOR est une kinase sérine/threonine qui est un enzyme clé dans la voie menant au cycle cellulaire en réponse à l'IL2. La voie mTOR permet de coordonner la croissance cellulaire, la prolifération et la nutrition cellulaire. Le complexe inhibiteur mTOR/FKBP-12 bloque la prolifération des lymphocytes T et B en réponse à l'IL2

et l'IL15 nécessaires à la cellule pour passer de la phase G1 à S (Dancey et al. 2002)[60] (Figure 12). On observe une anergie cellulaire T malgré la sécrétion d'IL2 et l'activation de la cellule par le TCR (Powell et al. 1999)[61].

L'activité des inhibiteurs mTOR n'est pas limitée à l'action sur les cellules lymphoïdes. Ces agents ont également des propriétés cytostatiques et cytotoxiques contre des cellules tumorales et sont également utilisés dans les stents pharmacodynamiques utilisés par les cardiologues (Klawitter et al. 2015)[62].

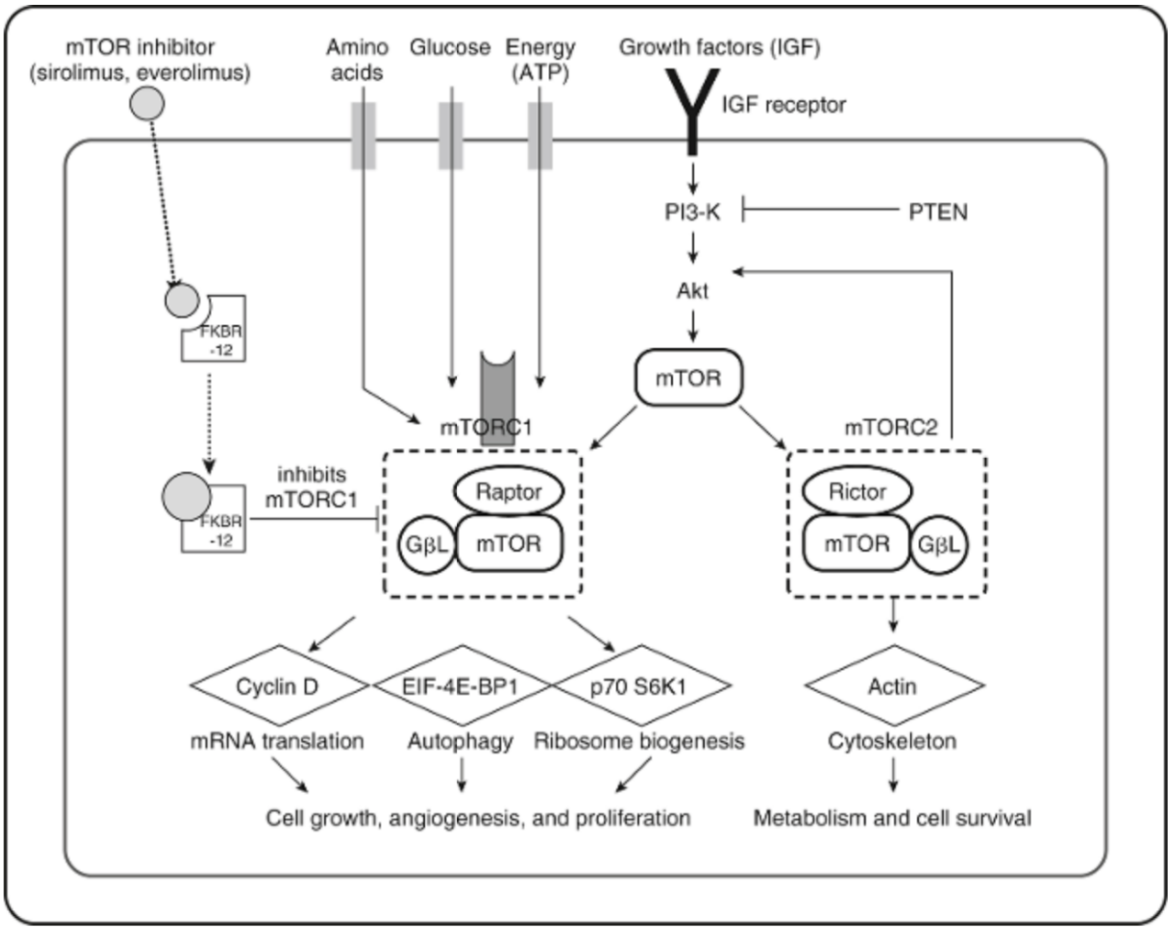


Figure 12 : La voie mTOR est un senseur essentiel de l'homéostasie cellulaire intégrant des informations intra- et extra-cellulaires. La compréhension des événements en amont et en aval de mTOR permettent d'appréhender les effets secondaires et les effets potentiellement bénéfiques des inhibiteurs mTOR. *Akt : protéine kinase B ; ATP : adénosine trophosphate ; EIF-4^{E}-BP1, eukaryotic translation initiation factor E4 binding protein ; GβL, G-protein beta-subunit-like ; IGF, insulin growth factor ; mRNA, ARN messager ; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1 ; mTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2 ; p13-K, posphoinositide kinsae 3 ; p70 S6K1, ribosomal protein S6 kinase ; PTEN, homologues phosphatase et tensine.*

Les inhibiteurs mTOR sont une alternative ou un traitement adjuvant aux inhibiteurs des calcineurines, pierre angulaire du traitement immunosuppresseur après greffe d'organe solide. Ils ont été extensivement étudiés dans diverses études en transplantation hépatique, rénale et cardiaque (Manito et al. 2010 ; Yost et al. 2011 ; Saliba et al. 2017) [63-65]. Ils sont considérés comme potentiellement tolérogène et augmentent l'effet immunosuppresseur des anti-calcineurines de manière synergique (Levitsky et al. 2019)[66].

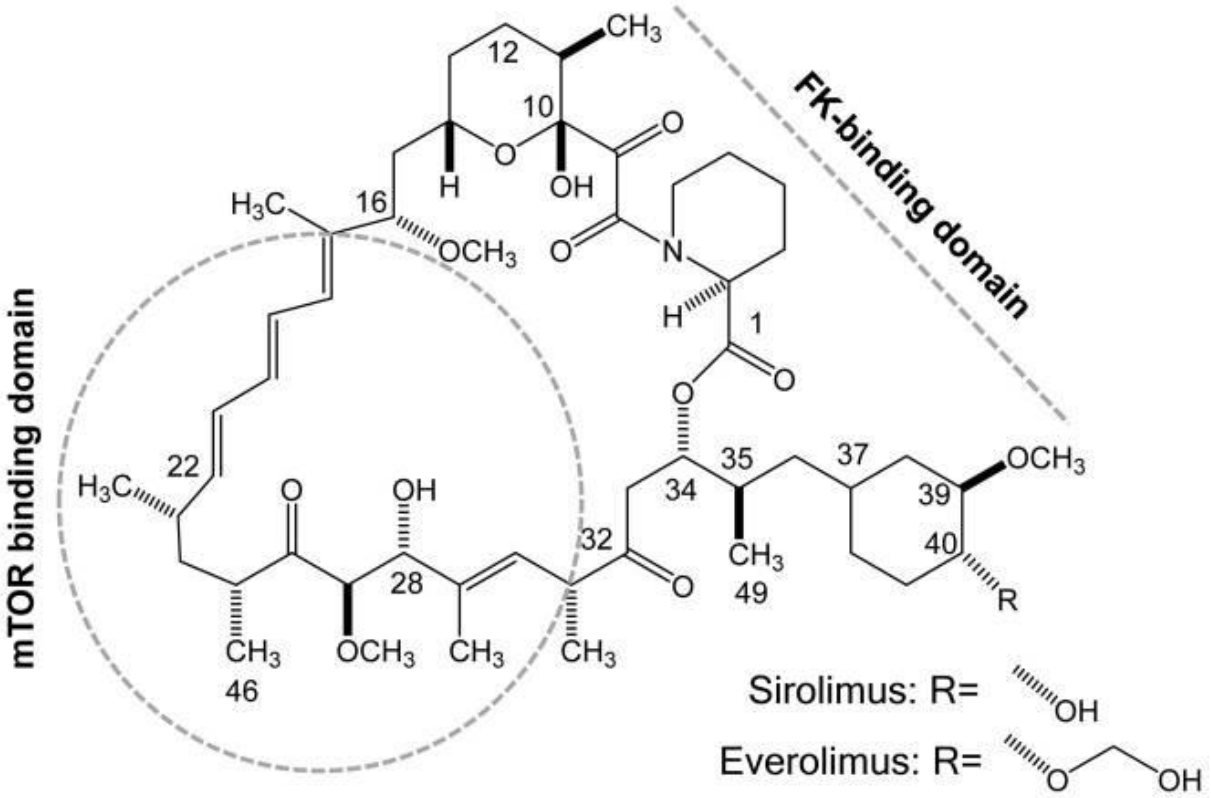


Figure 13. Structure chimique du sirolimus et de l'everolimus.

Le sirolimus est un macrolide, dérivé de l'actinomycète Streptomyces hygroscopicus initialement développé comme agent antifongique et qui a montré des propriétés immunosuppressives. L'everolimus est une molécule dérivée du sirolimus. Leur structure chimique est très proche (Figure 13).

La kinase mTOR est formée de deux complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) et mTOR complex 2 (mTORC2). La voie mTOR joue des rôles différents en fonction du type cellulaire où elle est présente (Figure 14, Figure 15). Le sirolimus est un inhibiteur incomplet de mTORC1

limitant son action anti-tumorale (Vilar et al. 2011)[67]. L'évérolimus a une action anti-mTORC1 et anti-mTORC2.

L'évérolimus a une biodisponiblité orale plus importante et une meilleure stabilité métabolique par rapport au sirolimus. La demi-vie de l'évérolimus est également plus courte que celle du sirolimus.

Les effets secondaires du sirolimus sont des cytopénies, des problèmes de cicatrisation, des pneumonies interstitielles, des ulcères buccaux et des protéinuries sur glomérulonéphrites aiguës/chroniques. Les effets secondaires sont identiques pour l'évérolimus mais sont moins souvent associés à l'interruption du traitement (Moro et al. 2008)[68].

2.4. Les anticorps

2.4.1. Anticorps déplétants : Anti-thymoglobuline (ATG)

Les anticorps anti-thymocytes ont été utilisés en transplantation d'organes solides depuis plusieurs décennies. Utilisés dans les années 1960 dans des modèles de transplantation de souris et de chien et ensuite en pratique clinique chez l'homme, les anti-thymoglobulines ont d'abord été dérivées du sérum de cheval humanisé. Ces anticorps étaient utilisés en induction en complément du traitement immunosuppresseur de base qui comprenait l'azathioprine et la prednisone[69].

Les effets secondaires principaux observés à l'époque étaient des éruptions cutanées, du prurit, des arthalgies, des réactions cutanées aux sites d'injection. Au niveau hématologique, une thrombopénie peut également être observée[70].

La production de sérum de cheval a été arrêtée et l'industrie a ensuite développé une thymoglobuline au départ de sérum de lapin (rATG). Le rATG sont des anticorps polyclonaux dirigés directement contre des marqueurs lymphocytaires T et B qui entrainent une déplétion lymphocytaire induisant un effet immunosuppresseur. Ce sont donc les trois signaux d'activation du lymphocyte T qui sont ciblés par ce traitement.

Le rATG déplète les lymphocytes par une action dirigée contre plusieurs antigènes des lymphocytes T tel que CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD25, CD44 et CD45 et également des lymphocytes B CD19, CD20, CD21 et CD40. Via une opsonisation des lymphocytes, on

observe une lyse cellulaire, une apoptose et une destruction cellulaire dépendante du complément (Préville et al. 2001) [71].

Les effets secondaires du rATG sont les mêmes que ceux décrits pour le sérum de cheval. Avec une meilleure connaissance de l'ATG en clinique, on a également observé des syndromes de relargage cytokinique ayant pour conséquence des syndromes similaires au syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) avec de la fièvre, une hypotension, parfois de l'œdème pulmonaire. On a également décrit des maladies sériques qui sont une réaction dirigée contre des protéines de source non-humaine et dont le traitement se fait par des corticoïdes à haute dose et des plasmaphérèses. Enfin une propension à faire des lymphomes a également été observée suite à des réactivations virales.

En transplantation rénale, le rATG a une place dans l'induction de patients à risque immunologique élevé ou modéré, ce risque est notamment défini par la présence d'Ac anti-HLA et d'anticorps spécifiques du donneur en pré-transplantation (Review dans Guirado et al. 2018 et Mohty et al. 2014) [72] [73]. Le rATG a également une place en cas de reprise retardée de la fonction du greffon rénal. Chez les patients à faible risque immunologique, le rATG sera proposé si on souhaite réduire au maximum la dose d'inhibiteurs de calcineurine ou si on souhaiterait obtenir un sevrage plus rapide des corticoïdes.

En transplantation hépatique, les thérapies d'induction par des anticorps déplétants sont beaucoup plus rarement proposées. Certaines études ont néanmoins suggéré une possible protection envers la cholangiopathie ischémique par rapport aux patients induits par le basiliximab (Halldorson et al. 2013). Les études prospectives n'ont pas révélé d'impact sur l'incidence de rejet aigu ou chronique chez les patients traités (Iesari et al. 2018) [74]. Chez les patient greffés du foie, le rATG est également utilisé en cas de rejet cellulaire aigu résistant aux corticoïdes.

Les études menées chez des patients transplantés cardiaques et pulmonaires sont encore moins nombreuses. Un des intérêts principaux de l'induction est de retarder l'introduction du tacrolimus afin de préserver la fonction rénale des patients transplantés (revue de Reichart et al. 2018 et Mohty et al. 2014)[75, 76]. Il y aurait également un intérêt en terme d'induction de tolérance qui sera développé plus bas.

2.4.2. Anticorps non-déplétants : Anti-récepteur de l'IL2 : Basiliximab

Le basiliximab est un anticorps chimérique, murin humanisé et monoclonal dirigé contre la chaine α du récepteur de l'IL-2 (IL-2R), également connu comme CD25. C'est le signal 3 du lymphocyte T qui est ciblé par cette drogue. La demi-vie est de 7 jours. Il se donne au premier et au quatrième jour post-greffe et permet de retarder le traitement par CNI.

Le basiliximab est une drogue très sûre qui présente très peu d'effets secondaires.

Il cible donc essentiellement les lymphocytes T effecteurs activés. Les Tregs exprimant également un taux très élevé de CD25 à leur surface sont également des cibles potentielles du basiliximab. Vondran et al. ont montré chez des patients greffés du rein que le basiliximab réduisait le nombre de cellules $CD4^{+}CD25^{high}$ pour une durée de six semaines mais qu'il n'y avait pas de disparition complète des lymphocytes T régulateurs mais plutôt un transfert de la population précitée vers une population$CD4^{+}CD25^{-}Foxp3^{+}CD127^{-}$ avec des propriétés suppressives identiques (Vondran et al. 2010)[77].

Comme le rATG, le basiliximab peut être proposé chez les patients à haut risque immunologique ou chez les patients chez qui une épargne cortisonée ou un délai d'instauration des anti-calcineurines est souhaitable (De Ataide et al. 2017, revue Rostaing et al. 2012)[78, 79].

2.4.3. Anticorps inhibant la co-stimulation : Belatacept (Ig-CTLA4)

Le belatacept est une immunoglobuline recombinante fusionnant le CTLA4 et une IgG1, développée pour se lier au CD80/CD86 nécessaire à la co-stimulation lors de l'activation du lymphocyte T. Ce médicament a été approuvé en 2011 par la FDA pour l'utilisation en transplantation rénale mais n'est pas approuvé en greffe hépatique en raison d'une étude négative montrant une augmentation de la mortalité à un an et une réduction de la survie du greffon (Klintmalm et al. 2014)[80].

Cette molécule agit sur le signal 2 d'activation des lymphocytes T.

En transplantation rénale, le belatacept est à réserver aux patients qui ne peuvent pas recevoir de CNI ou ceux qui ont une néphropathie du greffon. Dans l'étude BENEFIT on a observé une amélioration de la fonction rénale à un an post-greffe chez les patients traités par belatacept par

rapport aux patients traitées par cyclosporine. Il y avait plus d'épisodes de rejets cellulaires aigus la première année dans le groupe belatacept en comparaison avec le groupe cyclosporine (Vincenti et al. 2010)[81]. En raison de cette augmentation du risque de rejet la première année mais au vu des avantages en terme d'amélioration de la fonction rénale au long cours, des équipes ont proposé des relais retardé des CNIs vers le belatacept avec une bonne sécurité et une amélioration de la fonction rénale dans certains cas (Perez et al. 2018)[82].

En conclusion*, les schémas classiques d'immunosuppression en transplantation d'organe solide se basent en premier lieu sur un schéma d'induction, d'une part par des anticorps qui ont pour but de bloquer la réaction allo-immune de manière forte en agissant principalement sur les lymphocytes T et d'autre part par des corticoïdes qui inhibent plus globalement les acteurs de cette réaction immunitaire. Les autres traitements ont pour but de pérenniser le blocage de cette réaction délétère pour l'organe transplanté. Les CNIs ont montré la meilleure efficacité pour prévenir les rejets aigus sur le court et le long terme mais ils ne sont pas dénués d'effets secondaires. D'autres stratégies sont donc importantes sur le long terme afin de préserver la fonction de l'organe transplanté tout en préservant l'individu lui-même.*

3. Interactions des immunosuppresseurs avec les acteurs tolérogènes

3.1. Immunosuppresseurs et Tregs

3.1.1. **Influence des Tregs en transplantation d'organe solide**.

Plusieurs études cliniques ont démontré une corrélation positive entre le taux de lymphocytes T régulateurs circulants chez le receveur et la tolérance opérationnelle.

La modulation du taux de Tregs circulants par les immunosuppresseurs est une des stratégies permettant d'atteindre la tolérance immunitaire. Les immunosuppresseurs classiquement utilisés ont un impact différent sur cette population cellulaire.

En transplantation hépatique, il est montré que le taux de Tregs circulants est plus faible chez les patients présentant un rejet aigu par rapport au patient n'ayant pas de rejet (Demirkiran et al. 2006, He et al. 2011)[83, 84]. Les patients immunotolérants quant à eux ont un taux circulant de lymphocytes T $CD4^{+}FoxP3^{+}$ plus élevé que les patients non tolérants ou les donneurs sains (Martinez-Llordella et al 2007)[85].

En transplantation rénale on observe également une corrélation entre le taux de Tregs circulants et la présence ou non de rejet. Akl et al. ont pu observer en 2008 que le taux de lymphocytes $CD4^{+}CD25^{high}$ circulants était plus élevé chez les patients transplantés du rein avec une fonction rénale stable en comparaison aux patients présentant une dysfonction d'organe chronique (Akl et al. 2008)[86]. D'autres articles suggèrent un lien entre le taux circulant des Tregs et l'évolution du greffon rénal sans toutefois pouvoir utiliser les Tregs circulants comme marqueurs précoces de rejet. (Herrera-Gomez et al., 2018)[87].

En transplantation pulmonaire, une étude rétrospective récente de Ius et al. a confirmé qu'un taux périphérique circulant élevé de Tregs, défini par $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}$, avait un effet protecteur pour la dysfonction chronique du greffon pulmonaire et un effet bénéfique en terme de morbi-mortalité (Ius et al. 2020, Meloni et al. 2004) [88, 89].

En transplantation cardiaque, il a été observé qu'un ratio diminué, Tregs : cellules progénitrices endothéliales, était prédictif d'un rejet cellulaire aigu (Choi et al. 2018)[90]. De la même manière, Roldàn et al. ont rapporté dans une étude observationnelle prospective d'une durée de 2 ans qu'un ratio Th1 :Tregs plus élevé était significativement corrélé à un risque de vasculopathie du greffon cardiaque (Roldàn et al. 2015)[91].

Le nombre de Tregs circulants semble donc offrir un bénéfice au receveur d'organe solide en termes de survie du greffon. La modulation du pool circulant de Tregs est donc une option valable pour favoriser la tolérance.

3.1.2. Modulation des Tregs par les immunosuppresseurs

Les anti-calcineurines réduisent significativement le nombre de Tregs circulants et diminue leur capacité suppressive.

Dans les modèles murins, la cyclosporine réduit le nombre de Tregs et réduit leurs propriétés suppressives dans les réactions mixtes leucocytaires (Zeiser et al. 2006 ; Kawai et al. 2005)[92, 93]. L'analyse *in vitro* sur des cellules $CD4^{+}CD25^{high}$ humaines confirme un effet négatif de la cyclosporine. On observe une réversibilité de cet effet négatif par le mycophénolate mofetil lorsqu'il est donné en association alors que les corticoïdes ne le modifient pas. (Miroux et al. 2012)[94].

In vivo, on observe dans des études sur des receveurs de rein un nombre de Tregs circulants plus faible chez des patients recevant de la cyclosporine en comparaison à des patients recevant du sirolimus (Zhao et al. 2013)[95]. D'autres études ont montré une majoration du nombre de Tregs circulants après l'arrêt de la cyclosporine chez des receveurs de rein avec une fonction rénale stable (van de Wetering et al. 2011)[96]. Il y aurait une corrélation entre la diminution des Tregs et la concentration sérique plus élevée de cyclosporine et de tacrolimus chez des patients transplantés du foie (San Segundo et al. 2007)[97].

Le tacrolimus tout comme la cyclosporine diminue le nombre de Tregs et réduit leur propriété suppressive par rapport à la rapamycine (Segundo et al. 2006 ; Baan et al. 2005)[98, 99]. Une faible dose de tacrolimus pourrait toutefois être bénéfique pour les Tregs circulants et ce *in vivo* et *in vitro* (Wang et al. 2009 ; Akimova et al. 2012)[32, 100, 101].

Les inhibiteurs mTOR augmentent le pool de Tregs et pourraient favoriser la tolérance immunitaire.

L'inhibition de mTOR favorise la différenciation des lymphocytes T activés vers un phénotype Tregs (revue dans Chi et al. 2012 ; Araki et al. 2011) (Figure 14) [102, 103].

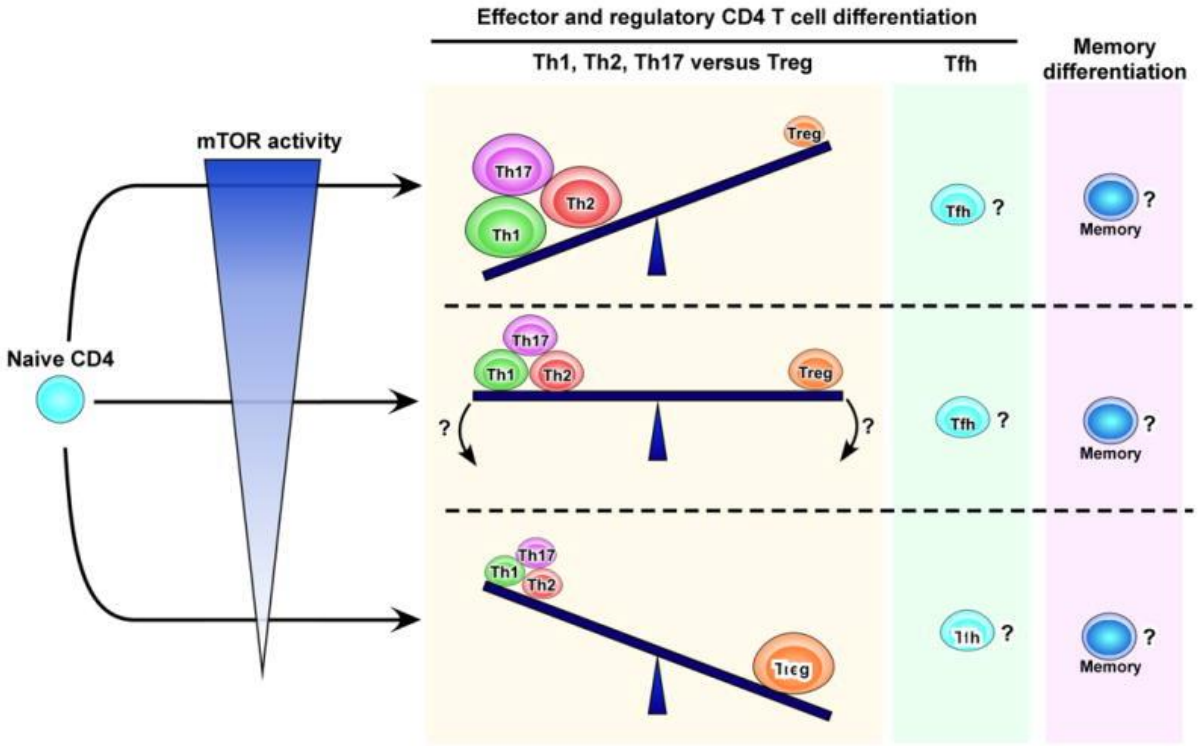


Figure 14. Rôle de mTOR dans la différenciation des lymphocytes T auxiliaires et régulateurs ; Une activité importante de mTOR favorise les lymphocytes T CD4 auxiliaires effecteurs. Un blocage du signal prévient la génération de ces lymphocytes T effecteurs pour favoriser l'apparition de lymphocytes T régulateurs.

Contrairement aux anti-calcineurines, les inhibiteurs mTOR semblent favoriser la prolifération des Tregs tant *in vitro* que *in vivo*. La rapamycine a montré une capacité à augmenter le pool de Tregs. Il a été démontré dans des modèles murins que la rapamycine, en présence d'IL2 induisait la prolifération de Tregs *in vitro*. L'activité suppressive des Tregs est augmentée par la rapamycine (Battaglia et al. 2005)[104]. Le même groupe de recherche a confirmé ces données chez l'homme, principalement dans le contexte de patient diabétique de type 1, le diabète étant une des pathologies auto-immunes les plus répandues (Battaglia et al. 2006)[105].

Levitsky et al. ont également démontré en 2016 que l'évérolimus avait un profil tolérogène *in vitro*. L'analyse du tacrolimus, du sirolimus, de l'évérolimus et de l'acide mycophénolique dans des réactions mixtes leucocytaires de donneurs sains a montré que la combinaison la plus tolérogène était l'évérolimus associé à une faible dose d'acide mycophénolique (Levitsky et al. 2016)[106].

Ces propriétés observées *in vitro* confèrent aux inhibiteurs mTOR la réputation d'immunosuppresseurs tolérogènes. Comme décrit plus haut, Baan et al. ont démontré que la rapamycine contrairement aux anti-calcineurines n'altérait pas la capacité régulatrice des Tregs (Baan et al. 2005)[98]. La rapamycine promeut l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques après activation et en parallèle la génération des Tregs spécifiques du donneur. Un mécanisme supplémentaire est la réduction des molécules de co-stimulation à la surface des cellules dendritiques qui favorise la balance lymphocytaire T vers les Tregs plutôt que vers les lymphocytes T effecteurs (Welles et al. 1999 ; Turnquist et al. 2007)[107, 108].

Des études plus récentes ont montré que l'arrêt de l'immunosuppression par le sirolimus chez des patients transplantés du foie bien sélectionnés était réalisable et que les patients tolérants avaient plus de Tregs circulants que les patients non tolérants (Levitsky et al. 2019)[26].

Le mycophénolate mofétil a démontré un effet tolérogène dans un modèle murin de transplantation d'ilot pancréatique, en présence de 1,25-vitamine D (Gregori et al. 2001)[109]. Dans cette étude cependant, l'effet sur l'induction des Tregs était probablement indirect, secondaire à l'induction de cellules dendritiques et de macrophages tolérogènes favorisant eux-mêmes l'expansion des Tregs. Il existe néanmoins un effet probablement direct sur les

lymphocytes T et le développement de Tregs comme le montrait l'étude de Miroux et al. en 2012[94]. Dans une étude évaluant des transplantés rénaux convertis d'un anticalcineurine vers le MMF à cause d'une toxicité rénale en comparaison aux patients maintenus sous anticalcineurine, Demirkiran et al. ont démontré que le nombre de Tregs circulants augmentait significativement sous MMF après six mois de traitement. (Demirkiran et al. 2009)[110]. Dans le même ordre d'idée, une série récente de patients transplantés du foie traités soit par tacrolimus seul , soit par tacrolimus + MMF, a montré un bénéfice en terme de Tregs circulant dans le deuxième groupe [111].

3.2. Immunosuppresseurs et cellules dendritiques tolérogènes (TolDCs)

La cible première des immunosuppresseurs est le lymphocyte T en raison de son rôle central dans la réaction allo-immune. Mais le lymphocyte T ne serait rien sans son activation par les cellules dendritiques, présentant les antigènes.

Depuis une vingtaine d'année, les chercheurs se sont donc intéressés aux effets de différents anti-rejets classiquement utilisés sur les cellules dendritiques. La modélisation *in vitro* des DCs sont les cellules dendritiques dérivées des monocytes (moDCs) en présence d'IL-4 et de GM-CSF (Woltman et al. 2000)[112]. Une meilleure connaissance de la biologie des cellules dendritiques a permis de mieux appréhender les différents points de contrôle qui sont des cibles potentielles des immunosuppresseurs. On retient la différenciation, la migration, l'expansion des cellules dendritiques, la captation et la transformation des antigènes, la maturation et la survie cellulaire. La modulation de certains points de contrôle peut également promouvoir l'apparition de profils tolérogènes.

3.2.1. Les cellules dendritiques tolérogènes en transplantation d'organe solide

La signature tolérogène *in vivo* des cellules dendritiques de patients transplantés d'organes solides n'est pas totalement consensuelle.

Après transplantation, il a été proposé qu'un élévation du rapport DC2/DC1 serait tolérogène, les cellules dendritiques plasmacytoides (DC2), induisant plutôt une réponse Th2 et les cellules dendritiques monocytoïdes (DC1), induisant plutôt une réponse Th1 (Mazariegos et al. 2003, Levitsky et al. 2009)[113, 114]. La présence de récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4, considérés

comme essentiels au phénotype tolérogène des APC, est une autre signature tolérogène utilisée dans les études cliniques (Chang et al. 2002)[115].

Des études sur différents groupes de patients transplantés d'organes solides ont permis d'observer l'influence de ces profils tolérogènes sur l'évolution des organes transplantés.

En 2009, chez des patients transplantés du foie, avec une fonction stable, Levitsky et al. ont mis en évidence une signature tolérogène des cellules dendritiques chez les patients traités par tacrolimus plutôt que chez ceux traités par sirolimus ou MMF, cette différence disparait néanmoins lorsqu'on exclut les patients transplantés pour une hépatite C ou avec des épisodes de rejets [114]. Plus récemment, Levitsky et al. ont montré dans une étude pilote que des patients traités par sirolimus qui présentaient un profil tolérogène tant au niveau des Tregs que des cellules dendritiques pouvaient atteindre la tolérance immunitaire opérationnelle [26]. Cette étude n'avait malheureusement pas de groupe contrôle de patients traités par CNI rendant difficile la conclusion que le sirolimus est tolérogène.

Une étude menée chez des patients transplantés rénaux a montré que les patients traités par du sirolimus en monothérapie présentait un profil transcriptionnel lié à l'activation de la voie NF-kB pro-inflammatoire et non tolérogène (Brouard et al.2010)[116]. Stallone et al. ont montré dans une études de 40 patients transplantés du rein que le shift des CNI vers la rapamycine entrainait une majoration de l'ILT3 et de l'ILT4 à la surface des DCs avec en parallèle une majoration des Tregs (Stallone et al. 2014, Rosborough 2014)[117, 118].

Karimi et al. ont décrit dans une cohorte de patients transplantés du rein, traités soit par CNI/MMF, soit par CNI/inhibiteur mTOR, que les patients qui recevaient du MMF avait un profil de DCs plus tolérogène avec une expression d'ILT3 et d'ILT4 plus importante (Karimi et al. 2020)[119].

En transplantation cardiaque, une étude plus ancienne de Barten et al. avait démontré que les patients convertis d'un traitement par CNI ou sirolimus vers l'évérolimus avait un rapport DC2/DC1 en faveur d'un profil tolérogène (Barten et al. 2006)[120].

On observe donc dans la littérature de nombreuses illustrations de ces définitions de profil tolérogène *in vivo*, qui ne sont pas toujours applicable *in vitro*. On peut conclure que les traitements immunosuppresseurs modifient la signature immunologique des cellules

dendritiques mais qu'il est actuellement prématuré de donner à ces signatures une valeur importante pour le développement de la tolérance immunitaire.

3.2.2. Impact des immunosuppresseurs sur les cellules dendritiques.

Les anti-calcineurines n'impactent pas le phénotype des cellules dendritiques.

Le tacrolimus et la cyclosporine ont peu d'effet sur la différenciation et la maturation des cellules dendritiques lorsqu'ils sont mis en culture dès le début du processus de différenciation (Szabo et al. 2001 ; Woltman et al. 2000.)[121]. Si on regarde les caractéristiques phénotypiques, il n'y a pas de différences entre les cellules traitées par les inhibiteurs de calcineurine et les contrôles.

Les corticoïdes ont par contre un effet inhibiteur profond sur les cellules dendritiques en cours de différenciation. On note une production réduite de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS contrairement aux cellules contrôles et une production identique d'IL-10, entrainant une balance cytokinique en faveur de cytokine anti-inflammatoire diminuant la capacité de recrutement des lymphocytes T (Szabo et al. 2001).

Les modifications phénotypiques des cellules dendritiques en présence de tacrolimus ne sont observées qu'après six jours d'une concentration largement supra-thérapeutique de 5000ng/mL, maintenant les cellules dendritiques dans un phénotype immature (Cos et al. 2002)[122].

Le tacrolimus inhibe les lymphocytes T par une fonction de réservoir de médicament dans les cellules dendritiques avec un relargage de la drogue durant plusieurs jours après exposition. L'équipe de Darnell et al. a montré en 2013 chez la souris que les cellules dendritiques traitées par le tacrolimus agissait de manière antigène-spécifique en délivrant la drogue au contact des lymphocytes T activés (Orange et al. 2013)[123].

Le mycophénolate mofétil modifie le phénotype des cellules dendritiques vers un phénotype immature et réduit la capacité d'activer les lymphocytes T.

Mehling et al. ont analysé l'effet du mycophénolate mofétil dans un modèle murin analysant des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse. Le MMF réduit de manière dose dépendante des molécules de co-stimulation : CD40, CD80, CD86 (Mehling et al. 2000)[124].

Colic et al. dans un modèle de culture de cellules dendritiques humaines, dérivées des monocytes, ont montré que le MMF augmentait la mortalité des cellules dendritiques de manière dose-dépendante via une apoptose majorée. Ceci n'est pas confirmé par Lagaraine et al.. Le MMF diminue également l'expression du CD80, CD86 et CD83 mais n'a que peu d'influence sur le CD40 et les MHC de classe 2. On observe une réduction de la sécrétion d'IL-12 et une augmentation de sécrétion d'IL-10. On note également une capacité réduite à induire les lymphocytes T allogéniques, réduction qui est dose-dépendante(Colic et al. 2003 ; Lagaraine et al. 2005)[125, 126].

Dans un modèle de cellules dendritiques porcine, Pilon et al. ont observé que les cellules traitées par du MMF favoriseraient une réponse tolérogène avec l'induction de cellules régulatrices inhibitrices (Pilon et al. 2009)[127].

Les inhibiteurs mTOR sont potentiellement tolérogènes et ce également via une activité spécifique sur les cellules dendritiques.

La voie mTOR joue un rôle critique dans la coordination des modifications du métabolisme et de la fonction des cellules dendritiques (revue de Snyder et al. 2019). Les caractéristiques des moDCs traitées par la rapamycine sont résumées dans le tableau 3.

Rapa-DCs	Modèle murin	Modèle Humain
	Phénotype	
Molécules de co-stimulation	⇓⇓	⇓
MHC de classe II	⇓	-
PD-L1	⇓	⇓
	Migration	
CCR-7	-	⇑
	Apoptose	
	⇑	⇑
	Cytokines	
IL-12p70	**⇑ (after LPS)**	**⇑ (mDC) /- or ⇓(moDC)**
IL-10	⇓	⇓
	Lymphocytes T	
MLR	⇓⇓	⇓

Expansion Tregs	⇑	-/ ⇑

Tableau 3. Effet de la rapamycine sur les cellules dendritiques (adapté Macedo et al. 2012)[128].

Les premières données étudiant l'effet de la rapamycine sur les cellules présentatrices d'antigènes humaines ont montré que la rapamycine induisait *in vitro* l'apoptose des cellules dendritiques dérivées des monocytes mais pas des macrophages ni des monocytes eux-mêmes (Woltman et al. 2001 et 2003)[129, 130].

Dans un modèle murin, Hackstein et al. ont montré un effet très net de la rapamycine sur la différenciation et la maturation des cellules dendritiques *in vitro*. Cette inhibition de la différenciation et de la maturation n'est pas liée à l'apoptose et peut être contrecarrée par le tacrolimus (FK506). La génération de cellules dendritiques *in vivo* était réduite chez les souris traitées par la rapamycine par rapport aux souris témoins. Les cellules dendritiques générées *in vivo* en utilisant la rapamycine exprimaient moins de molécules de co-stimulation (CD80, CD86) mais les MHC de classe II n'étaient pas affectées (Hackstein et al. 2003)[131].

La rapamycine diminue la capacité des cellules dendritiques à capter et internaliser des antigènes (Monti et al. 2003)[132].

La rapamycine, contrairement au tacrolimus exercerait également son action immunosuppressive par l'augmentation du CCR7 entrainant une activité migratoire accentuée (Sordi et al. 2006)[133].

Sur des modèles de moDCs humaines traitées par la rapamycine, il est démontré que la diminution de la réponse lymphocytaire T à la stimulation allogénique est essentiellement due à la réduction des molécules de co-stimulation (Fedoric et al. 2008)[134].

Plusieurs modulations de la sécrétion cytokinique des cellules dendritiques ont été observées avec la rapamycine. La rapamycine diminue la sécrétion d'IL-18 (Ko et al. 2008) dans des moDCs, stimule la sécrétion d'IL-12 et d'IL-23 (Haidinger et al. 2010) mais bloque la sécrétion d'IL-10 dans des cellules dendritiques myéloïdes fraichement isolées [135, 136]. Ceci se fait par l'activation de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires par NF-κB et l'inhibition d'IL-10 par STAT3. La voie STAT3 est sous la dépendance de la voie mTOR dans les cellules immunitaires myéloïdes (Weichhart et al. 2015)[137].

Haidinger et al. ont finalement montré que la voie mTOR avait des fonctions différentes en fonction du type de cellule dendritique (Figure 16).

Les figures 15 et 16 permettent de nous aider à comprendre comment l'inhibition de mTORC1 peut entrainer un profil pro-inflammatoire. Le blocage de mTOR par la rapamycine entraine une sécrétion accrue d'IL-12, une inhibition de la sécrétion d'IL-10, une stimulation du CCR7, une inhibition du PD-L1 et une stimulation de la production de MHC de classe 2. Ces observations vont à l'encontre de l'effet pro-tolérogène suggéré des inhibiteurs mTOR en général et prônent plutôt une action pro-inflammatoire qu'on comprend bien dans le rôle anti-tumoral des inhibiteurs mTOR et les complications inflammatoires observées chez certains patients (pneumonie interstitielle, glomérulonéphrite, rejet cellulaire aigu) (Macedo et al. 2013)[138]. Cet effet pro-inflammatoire n'est néanmoins pas observé pour l'ensemble des cellules dendritiques, s'agissant d'une famille de cellules très hétérogènes dans leur phénotypes et leurs attributions, ni dans l'ensemble des modèles de culture. Il faut donc nuancer l'effet de l'inhibition mTOR en fonction du type cellulaire dans lequel l'inhibition se produit.

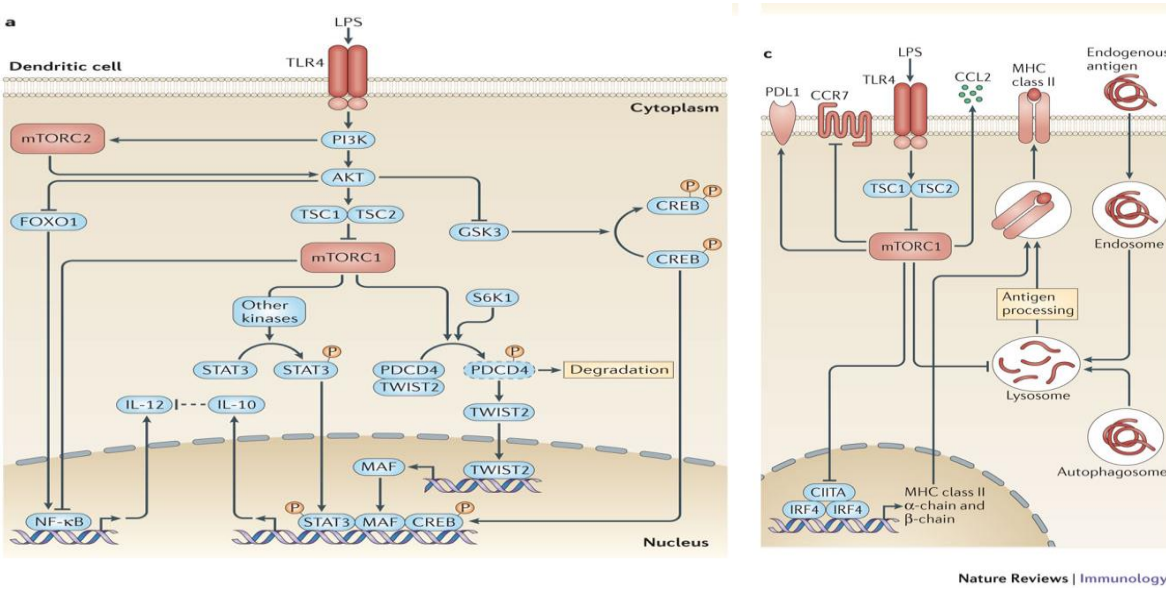


Figure 15 : Adapté de Weichhart et al. 2015. a. Le récepteur TLR 4 régule la sécrétion d'IL-10 et d'IL-12 d'une manière complexe à partir de mTORC1 et mTORC2. La voie Akt-mTORC1 régule positivement l'expression d'IL-10,via SAT3, MAF et CREB. mTORC1 diminue l'activité de NF-κB et l'expression d'IL-12. mTORC2 régule également négativement la production d'IL-12 via une voie Akt-dépendante par l'inactivation de forkheadbox O1 (FOXO1). c. Le LPS active mTORC1 et inhibe la transcription du MHC classe II ; promeut

l'expression du PD-L1 qui limite l'activation des lymphocytes T. Il régule positivement le CCL2 et inhibe le CCR7.

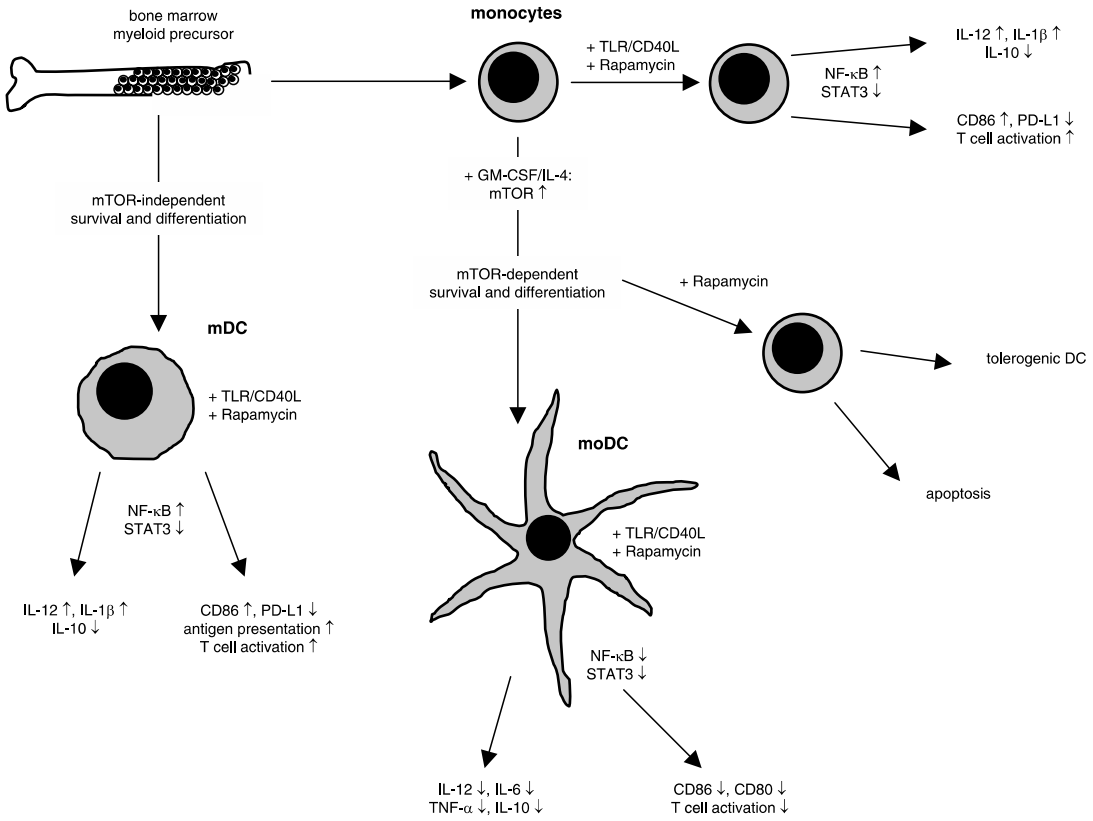


Figure 16. Haidinger et al. ont démontré un effet différent de la rapamycine en fonction du type de cellule dendritique, mettant en évidence un effet stimulant du NF-kB et inhibiteur du STAT3 dans les cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) mais un effet inhibiteur tant sur NFkB que STAT3 sur les moDCs. Ceci explique un profil plutôt pro-inflammatoire des mDCs traités par Rapamycin et anti-inflammatoire tolérogène des moDCs.

In vivo, dans différentes études sur des patients transplantés d'organes solides, des signatures cellulaires tolérogènes ont pu être observées chez des patients traités par inhibiteurs mTOR en comparaison aux CNI[139].

L'ATG initialement dirigé contre les lymphocytes T a montré un effet immunomodulateur sur les cellules dendritiques dérivées des monocytes.

Roider et al. ont montré un effet pro-tolérogène de l'ATG sur les cellules dendritiques immatures. L'ATG agit par liaison à différentes protéines de surface tel que le CD1a, le CD80, le CD86, le CD209 et l'HLA-DR (Roider et al. 2016)[140]. L'ATG induit la sécrétion d'IL-10

mais pas d'IL-12 et augmente la synthèse d'IDO. Ces données confirment des données publiées dix ans plus tôt avec d'autres ATG (Gillet-Hladky et al. 2006)[141]. L'ATG agit donc non seulement en déplétant les lymphocytes T mais serait intéressant dans un projet d'induction de tolérance au vu de ses effets sur les cellules dendritiques.

Autres modèles de cellules dendritiques tolérogènes

D'autres modèles de cellules dendritiques potentiellement tolérogènes ont été étudiés les dernières année en vue principalement de développer des traitements favorisants l'acceptation des greffons.

Naranjo-Gomez et al. ont comparé différents modèles de cellules dendritiques réputées comme tolérogènes (Naranjo-Gomez et al. 2011)[142]. Parmi celles qui ont été explorées, les cellules dendritiques traitées par la dexamethasone et les cellules traitées par la vitamine D3. Ces deux modèles présentent un phénotype tolérogène, à savoir une diminution de l'expression membranaire des molécules de co-stimulation et sont caractérisés par une sécrétion accrue d'IL-10.

Un modèle de tol-DCs différencié en présence d'IL-10 a montré un profil tolérogène complet et stable en condition pro-inflammatoire. (Boks et al. 2012)[143].

La minocycline, une tétracycline semi-synthétique de deuxième génération, a également montré la capacité de promouvoir la génération de moDCs dans des modèles murins avec des propriétés tolérogènes qui sont potentialisées par le traitement concomitant avec la dexamethasone (Lee et al. 2017) [144].

D'autres modèles ont étudié des cocktails de cytokines permettant d'obtenir un profil tolérogène.

La prostaglandine E2 (PGE2)a également été utilisée pour différencier les moDCs en Tol-DCs. Les Tol-DCs différenciées en présence de PGE2 expriment plus d'indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), un enzyme limitant de la voie des kynurenines qui dégrade l'acide aminé essentiel tryptophane. Suite à la dégradation du tryptophane dans l'environnement cellulaire, IDO inhibe la prolifération des lymphocytes T, induit la formation des Tregs (Trabanelli et al. 2015)[145].

Plusieurs équipes dont celle d'Aurelie Moreau à Nantes ont utilisé un modèle décrit en 2008 de tol-DCs générées uniquement en présence de GM-CSF, en l'absence d'IL4. Ce modèle confère un profil immature aux cellules dendritiques avec une stabilité du phénotype même en présence de stimuli inflammatoires (Chitta et al. 2008)[146]. Ces tol-DCs sont caractérisées par une diminution de l'expression de MHC classe II et l'expression de CD11c, une intégrine transmembranaire de la lignée myéloïde. Ce modèle est à la base d'études d'infusion de Tol-DC chez des patients transplantés du rein (revue de Marin et al. 2018)[147].

En conclusion, *de nombreuses études ont analysé les effets des immunosuppresseurs connus sur les acteurs tolérogènes de l'immunité. Ces études ouvrent la voie vers plusieurs modèles cliniques possibles d'induction de tolérance : d'une part, le choix des immunosuppresseurs permettrait de favoriser in vivo l'émergence de Tregs et DCregs et indirectement une tolérance à l'organe transplanté, d'autre part la modulation ex vivo/ in vitro de cellules tolérogènes stables et leur infusion in vivo pourraient induire la tolérance au greffon en présence de faibles doses d'immunosuppresseurs.*

Objectifs de la thèse

La transplantation est le traitement de choix pour améliorer la qualité de vie et prolonger la vie des patients présentant des dysfonctions terminales d'organes solides.

La réaction allo-immune nécessite la mise en route d'un traitement immunosuppresseur non dénué d'effets secondaires. Dans ce contexte, la modulation de la réponse allo-immune en promouvant les cellules immunitaires tolérogènes est une piste pour minimiser les médications potentiellement toxiques.

Cette modulation peut se faire soit par des molécules spécifiques comme les inhibiteurs m-TOR, soit par l'infusion de cellules tolérogènes comme les Tol-DCs ou les Tregs.

Une bonne compréhension des mécanismes d'action des immunosuppresseurs *in vivo* et *in vitro* permet de mieux appréhender la problématique.

Dans la première partie de la thèse, nous présentons les résultats d'une étude ancillaire d'une étude prospective randomisée et contrôlée, l'étude SIMCER (Saliba et al. 2019)[65]. L'objectif est de confirmer les données *in vitro* suggérant un effet bénéfique de inhibiteurs mTOR sur le développement de lymphocytes T régulateurs (revue dans Chi et al. 2012 ; Araki et al. 2011 ; Levitsky 2016)[102, 103, 106]. Une étude pilote avait été menée en monocentrique dans notre laboratoire par Ghazal et al., publiée en 2018 et avait permis de mettre en évidence une augmentation significative du nombre de Tregs après conversion de CNI vers un inhibiteur mTOR (Annexe 1) [148].

L'étude SIMCER a pour but premier l'analyse de l'évolution des patients transplantés hépatiques après randomisation un mois après la greffe hépatique en deux groupes, un groupe recevant une immunosuppression basée sur le tacrolimus et un groupe recevant une immunosuppression basée sur l'everolimus. L'objectif est de démonter la non-infériorité en termes d'efficacité de l'immunosuppression par les inhibiteurs mTOR, la sécurité de ce schéma IS et le bénéfice sur les effets secondaires induits par le tacrolimus, principalement l'insuffisance rénale. L'étude CERTITUDE, une étude observationnelle ouverte faisant suite à l'étude SIMCER a démontré une effet bénéfique significatif sur la fonction rénale et l'absence de différence significative en termes de rejet à 2 ans après la transplantation hépatique [65, 149].

Cette étude ancillaire de l'étude SIMCER analyse le taux de lymphocytes T régulateurs circulants à différents temps après la transplantation chez trente patients. C'est la première étude randomisée chez des patients transplantés du foie qui permet d'analyser la différence entre ces traitements sur ce paramètre essentiel de la tolérance immunitaire.

La deuxième partie de la thèse se concentre sur l'effet des immunosuppresseurs, CNI et inhibiteur mTOR sur la différenciation et la maturation des cellules dendritiques dérivées des monocytes. Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans la réaction immunitaire allo-immune. Leur manipulation permettrait de les différencier vers des cellules dendritiques tolérogènes et de promouvoir la tolérance des greffons.

Résultats

Article n°1:

Influence of everolimus-based treatment on circulating regulatory T cells in thirty liver transplanted patients: comparative study with tacrolimus-based treatment.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article, soumis à American Journal of Transplantation.

Contributions de l'auteur : Le design de l'étude a été imaginé par le Docteur Filomena Conti, Clément Barjon et moi-même. Le Docteur Clément Barjon et moi-même avons généré, analysé, interprété les données et écrit le présent manuscrit.

Il s'agit d'une étude ancillaire d'une étude multicentrique randomisée française, l'étude SIMCER, qui a permis d'analyser les taux circulants de lymphocytes T régulateurs au moment de la transplantation, à 14 jours, 1 mois, 3 mois et 6 mois après la transplantation. L'originalité de l'étude est qu'il s'agit d'une étude multicentrique, randomisée à un mois de la transplantation entre un bras dont l'IS est basée sur le tacrolimus et un autre bras om l'IS est basée sur l'everolimus. L'étude initiale avait pour but d'analyser l'influence sur la fonction rénale. Notre étude ancillaire permet de montrer une signature tolérogène sur le plan des Tregs dans le groupe everolimus par rapport au groupe tacrolimus.

Influence of everolimus-based treatment on circulating regulatory T cells in thirty liver transplanted patients: comparative study with tacrolimus-based treatment.

Clément Barjon*[1,3], Géraldine Dahlqvist*[1,2], Khaldoun Ghazal[1], Faouzi Saliba[4], François Durand[5], Christophe Duvoux[6], Lynda Aoudjehane[1], Yvon Calmus[1,7] and Filomena Conti[1,7]

Author's affiliations:

1. UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France

2. Hepatogastroenterology unit, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium

3. de Duve Institute, UCLouvain, 1200 Brussels, Belgium

4. Centre Hépato-Biliaire, Hôpital Paul Brousse, AP-HP, Villejuif, France

5. Liver intensive care unit, Hôpital Beaujon, Assistance Publique-Hopitaux de Paris and University of Paris, Paris, France

6. Department of hepatology, Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France.

7. Liver transplantation unit, AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 75012, Paris, France

* both authors equally contributed to this work

Corresponding author: Géraldine Dahlqvist, geraldine.dahlqvist@uclouvain.be

CONFIDENTIAL

Abbreviations

CNI: calcineurin inhibitors

HD: healthy donors

IS: immunosuppression

Tregs : regulatory T cells

Abstract

Liver transplantation remains the only treatment for terminal liver disease. However, immunosuppressive drugs required for allograft acceptance are toxic and may be responsible for severe side effects. Modulating the immune system to induce tolerance is a promising approach to reduce immunosuppressive regimen. More particularly, promoting natural $CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ Tregs could be crucial in achieving tolerance. Contrary to calcineurin inhibitors, reports indicate that mTOR inhibitors may have a positive impact on Tregs.

Here we present the first randomized prospective clinical study where Tregs levels from liver transplanted patients receiving either tacrolimus or everolimus were monitored for 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 ($CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^-$ $FoxP3^+$) was. Functional assays with Tregs were performed to assess their immunosuppressive. Levels of Tregs were significantly reduced after one month of standard tacrolimus-based immunosuppressive regimen ($p<0.05$). Four months after conversion, levels of Tregs from patients treated with everolimus was significantly higher than patients under tacrolimus ($p<0.02$). Functional assays demonstrated that Tregs conserved their capacity to suppress the proliferation of activated PBMC.

CONFIDENTIAL

Introduction

Immunosuppressive regimen mainly based on calcineurin inhibitors (CNI) have drastically reduced rejection rates after transplantation. However, transplanted patients must undergo a permanent drug-induced immunosuppression (IS) and suffers from deleterious side effects, such as nephrotoxicity and opportunistic infections.

The immune status of the liver is unique, being considered a 'tolerogenic' organ. 5% up to 63% of liver transplanted patients are able to complete IS withdrawal without rejection of the graft[1,2]. The systematic achievement of this 'operational tolerance' in transplanted patients is one of the main focus of the research in transplantation.

Operational tolerance may be defined as having a stable function of the graft one year after complete discontinuation of immunosuppression drug regimen, while maintaining a functional immune system[3]. Contrary to the process of 'true' tolerance which consists in the clonal deletion of autoreactive immune cells, it is believed that the operational tolerance is an active inhibitory process mediated through multiple suppressive immune cell population, such as regulatory T cells.

Regulatory T cells (Tregs) are defined as $CD4^+$ T lymphocytes expressing a high level of the interleukin-2 (IL2) receptor (CD25) as well as the transcription factor FoxP3. They are also characterized by a low expression of the IL7 receptor (CD127). Tregs are able to efficiently suppress immunological response through multiple mechanisms such as direct cytotoxicity and the secretion of the immunosuppressive cyokines IL10 and active TGFb. As such, Tregs have been described as promoters of graft tolerance. Preserving them as well as promoting their development might be crucial to achieve operational tolerance [4].

Multiple reports have shown that immunosuppressive drugs may influence the Tregs levels in transplanted patients [5-7]. CNI such as the tacrolimus seems to have

CONFIDENTIAL

mostly a deleterious effect on Tregs, while rapamycin analogues such as the everolimus seem to preserve them. This disparate effect may be linked to the mechanism of action of the drugs on the IL2 pathway, which is critical for the survival of Tregs. Indeed, mTOR inhibitors act downstream of the IL2 pathway and do not prevent its production whereas CNI act upstream and prevent it.

The SIMCER study is a prospective, multicenter clinical study aiming to compare a tacrolimus-based IS regimen to an everolimus-based regimen on multiple aspects, with an emphasis on nephrotoxicity [8,9]. The protocol includes an ancillary study focusing on the evolution of Tregs levels for 30 patients up to six months after the liver transplantation. This study, which results are presented here, is the first to demonstrate the positive effect of everolimus on Tregs using a simultaneous control group of patients who remained treated with tacrolimus.

CONFIDENTIAL

Material and methods

Patients and clinical protocol

SIMCER study was a 6-months, prospective, multicentre, randomized, open-label study in *de novo* liver transplant patients from 15 transplant centres in France between 2012 and 2015 (ClinicalTrials.gov identifier NCT01625377). The study protocol was approved by the French Health Products Safety Agency (Afssaps/ANSM) and the relevant institutional review board. Written informed consent was obtained from all participants [8] . In this ancillary study blood samples from a total of 30 patients from four centers were analysed. Samples were obtained at day 0, day 14, one month, three months and six months post-transplantation.

Immunosuppressive regimens were given as followed. Basiliximab induction (20mg) at days 0 and day 4. Between transplantation and randomization at week 4, patients received tacrolimus targeting a trough level of 6-10ng/mL and mycophenolate mofetil at

a minimal dose of 360mg twice daily. At the moment of randomization, patients randomized in the everolimus group received 1mg of everolimus twice daily adjusted to target a trough level of 6-10 ng/mL. Patients randomized in the tacrolimus group received the same regimen as before week 4. Steroids could be given depending on local practice.

Patients were compared to seven healthy donors (HD) buffy coarts from which Tregs levels were measured. Buffy coats were obtained from healthy donors, according to the approval by the Ethics Committee (CPP) for Ile de France III.

Regulatory T cells immunophenotyping

Fresh PBMC from patients (EDTA tubes) were isolated from whole blood using Ficoll gradient centrifugation. The absolute number of cells (cells/L) were calculated as [number of cells/ml of sampled blood * 1000]. Cells were stained with anti-CD4, anti-CD25 and anti-CD127 (Miltenyi Biotech) for 30 min at 4°C. After washing, cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) then stained with anti-FoxP3 (eBiosciences) for 1h at 4°C. Flow cytometry data was acquired with Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter) and results were analysed using Kaluza software (Beckman Coulter). Tregs were defined as $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^{-/low}$ $FoxP3^+$ lymphocytes and expressed as percentages of $CD4^+$ lymphocytes (Supplementary Figure 1).

Regulatory T cells functional assay

Tregs from patients ($CD4^+$ $CD25^+$ T cells) were isolated from PBMC using magnetic microbeads (Miltenyi Biotech) when the volume of sampled blood was superior or equal to 1 ml. PBMC were co-cultured with Tregs in 96-wells microplates using 10^5 cells and 0,5 x 10^5 cells respectively (ratio 2 :1). PBMC were activated using anti-CD3 (1 µg/ml) and anti-CD28 (100 ng/ml) antibodies (eBiosciences). Cells were cultured during 48 hours (hrs) in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum

CONFIDENTIAL

and H3 radioactive thymidine was added during the last 18 hrs to measure the proliferation. Wells containing PBMC only, non-activated PBMC only and Tregs only were used as controls. Results are expressed as inhibition percentages compared to wells containing activated PBMC only.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5 software for Mac OS X. Unpaired t-tests with Welch's correction were performed with p-value <0.05 considered as significant.

For correlation, Spearman's rank correlation coefficient was calculated and tested with a t-test. P-value are noted (*) for $p<0.05$ and (**) $p<0.01$.

CONFIDENTIAL

Results

Regulatory T cells levels before conversion to everolimus

Tregs are expressed as percentage (%) of $CD4^+$ lymphocytes. Baseline characteristics of the patients were not significantly different (Table 1). Twenty-one patients were transplanted for alcoholic related liver disease, 11 patients in the tacrolimus group (73,3% of the patients in the group) and 10 patients in the everolimus group (66,6% of the patients in the group). Six patients were transplanted for HCV related cirrhosis, 2 patients in the tacrolimus group and 4 patients in the everolimus group. Mean MELD score was 20,1 for the total cohort. The repartition was not significantly different in both cohorts. There was no significant correlation in our cohort between MELD score and Tregs levels (data not shown, $R^2= 0.079$).

Baseline Tregs levels were measured the day of the liver transplantation in 17/30 patients (D0). The mean baseline level in our patients was 2.70 % with a standard deviation (SD) of 2.4 % (Figure 1A). Although a high SD was observed in healthy donors (HD), the increased variability in patients probably resulted from their diverse

pathologies and the severity of the disease (Table 1 and Supplementary Table 1) [10]. Two patients were transplanted for ductal plate malformations and interestingly had higher Tregs levels than cirrhotic patients (mean 6.52%+/- 1.7). However, the difference between Tregs levels of HD and patients at D0 was not statistically significant. During the first month after transplantation, all patients received the same immunosuppressive (IS) regimen based on tacrolimus (see material and methods). Tregs levels were reduced significantly compared baseline at D14 (mean level of 0.99 %, $p < 0.01$ vs HD; $p < 0.05$ vs baseline) and further reduced one month (M1) after transplantation (mean level of 0.80 %, $p < 0.001$; $p < 0.01$ vs baseline). Tregs absolute numbers were also calculated (Figure 1B). Although the mean level of Tregs per litre of blood tended to decrease during the first month of tacrolimus based IS regimen, no significant differences could be observed at this step.

Regulatory T cells levels after conversion to everolimus

One month after the transplantation, all patients were randomized into two groups: the first group remained treated with a tacrolimus-based IS regimen (TAC) while the second group switched progressively to an everolimus-based IS regimen (EVR). Tregs levels of patients from the TAC group remained statistically lower than both the baseline Tregs level and HD Tregs level three months (M3) after the transplantation ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively) (Figure 2A). This was confirmed six months (M6) after the transplantation.

Tregs levels of patients from the EVR group were significantly higher than Tregs levels of the TAC group at M3, with a mean of 3.98 % vs 1.19 % respectively ($p < 0.05$). This significant difference was confirmed at M6 with a mean Tregs level of 3.62 % for the EVR group and a mean Tregs level of 1.02 % for the TAC group ($p < 0.05$). Tregs levels of the EVR group were similar to HD Tregs levels (mean of 3.77 %).

CONFIDENTIAL

Finally, the absolute Tregs counts of the EVR group was statistically higher to the Tregs absolute count of the TAC group at M6 (mean of 14118 x 10^3 cells/L vs. mean of 5170 x 10^3 cells/L respectively; $p < 0.05$) (Figure 2B).

Functional characteristics of Tregs isolated from patients

Tregs were isolated from patients' blood when enough material was available (N= 14 at D0, N= 7 at D14, N= 8 at M3 and N= 9 at M6). An autologous proliferation assay was performed using total PBMC from patients at a PBMC:Tregs ratio of 2:1 (Figure 3). Overall, no significant differences could be established but a high variability was observed for all time points as well as all patients group.

Influence of the serum concentration of the IS drugs on Tregs levels

The dynamic of the conversion of patients from tacrolimus to everolimus was not the same in all medical centers involved. As a result, not all patients in the EVR group at the time point M3 were cleared of tacrolimus and had received the same dose of everolimus. A subgroup of patients from one center had higher blood level of tacrolimus and/or a lower blood level of everolimus than other EVR patients (Figure 4). Those patients had the lowest level of Tregs of the EVR group at M3. However, the coefficient of correlation between tacrolimus concentration in the EVR group at M3 and the percentage of Tregs was not statistically significant (r= -0.5230, p=0.1475.)

Discussion

Here we describe the first multicenter, prospective study comparing Tregs levels of two patient groups receiving concurrently either a TAC-based IS regimen or an EVR-based IS regimen in liver transplanted patients. While several clinical studies have shown that mTOR inhibitors favour the increase of Tregs in patients converted from calcineurin inhibitors, a 'natural' recovery of Tregs could not be excluded [11-13].

CONFIDENTIAL

This study demonstrates that patients under TAC treatment keep low levels of Treg even six months after the transplantation. Conversely, patients who were concurrently converted to an EVR treatment recover a level of Tregs similar to the level of healthy donors.

Interestingly, our study suggests that two other factors might directly influence Tregs levels in liver transplanted patients. Firstly, the hepatis C virus (HCV) infection status is a cause of higher Tregs levels. As the antiviral sofosbuvir treatment was made available during the study, very few patients were positive for HCV infection at the moment of the transplantation. However, in the EVR subgroup, patients infected with HCV had a higher level of Tregs than uninfected patients, one of them displaying the highest level of Tregs of the whole study, with 12.78% of $CD4^+$ T cells at M3. Indeed, HCV infection is known to rapidly reinfect the graft after transplantation and to increase Tregs levels potentially favouring graft acceptance [14-16].

Secondly, the drug dose might directly influence circulating Tregs levels. In our study, the slower conversion from TAC to EVR seemed to have a negative effect on Tregs circulating levels for an EVR subgroup. However, we could not demonstrate a global quantitative correlation between drug doses and Tregs levels in this study. This might be due to the fact that drug doses are constantly being adjusted in recently transplanted patients and thus one sample at one given time point might not reflect the overall quantity of the drug received.

One limit of our study is that we only had access to circulating Tregs and not intrahepatic Tregs. While comparing both levels of Tregs would be interesting, it is known that in steady state circulating Tregs levels are representative of intrahepatic levels after liver transplantation but that in a situation of acute rejection, circulating Tregs levels are lower and Tregs are homed to the liver graft.[17,18] Only one patient in the

CONFIDENTIAL

EVR group experienced one episode of acute rejection at M6 and had a lower percentage of circulating Tregs compared to M3 (1.8% vs 3.7%.)

Other limitations of our work were the small sample size and the impossibility to have all the time points for all the patients and also the different local practices leading to longer TAC treatment in some patients of the EVR group. However, this study clearly suggests that EVR-based IS helps to increase Tregs levels compared to TAC based IS. Together with the recent encouraging clinical results obtained, these results makes EVR an interesting alternative to the calcineurin-inhibitor based IS to potentially improve the long-term quality of life of transplanted patients.[8]

While the positive effect of mTOR inhibitors on circulating Tregs levels is largely accepted, future studies should involve longer term analysis to determine if expanding circulating and intrahepatic Tregs can lead to graft tolerance and become a tool to predict better immunological outcome.

CONFIDENTIAL

Acknowledgements

With grateful thanks to the SIMCER study investigators and to Novartis Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France for the funding of the SIMCER study.

Thanks to Annie Munier (Sorbonne University, Inserm, Mixed Unit of Production and Data Analysis Service in Life Sciences and Health-UMS37, F-75005, Paris, France) core facility for flow cytometry (CISA), of the Saint-Antoine Research Center (INSERM UMR_S938).

Figure legends

Figure 1. (A) Tregs levels of patients at day 0 (D0, baseline), day 14 (D14) and one month (M1) after transplantation. Tregs levels of healthy donors (HD) are shown. Tregs are expressed as percentage of $CD4^+$ lymphocytes. **(B)** Tregs absolute counts of patients at baseline, D14 and M1, expressed as cells per liter of blood.

Figure 2. (A) Tregs levels of patients three months (M3) and six months (M6) after transplantation. TAC group includes patients who remained treated with tacrolimus, EVR group includes patients who were switched from tacrolimus to everolimus at one month post-transplantation. Tregs are expressed as percentage of $CD4^+$ lymphocytes. **(B)** Tregs absolute counts of patients at M3 and M6 from TAC and EVR groups, expressed as cells per liter of blood.

Figure 3. Tregs functional assay. $CD4^+$ $CD25^+$ cells were isolated from the blood of patients using magnetic beads. Tregs were co-cultured with autologous total PBMC activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies at a ratio 1:2 respectively. Proliferation index was determined by measuring the incorporation of radioactive thymidine. Results are expressed as inhibition percentages of the proliferation of PBMC cultured without Tregs.

Figure 4. Treg levels (% of $CD4^+$ T cells) of patients from the EVR group at M3. Levels are plotted according to the blood dosage of everolimus and tacrolimus at M3. The size of the plot indicates the level of Treg, larger size meaning higher level.

Supplementary figure 1. Gating strategy for Treg staining. Live mononuclear cells were gated on FSC/SSC. Tregs were subsequently defined as $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ $FoxP3^+$ cells as shown.

CONFIDENTIAL

Bibliography

1. Levitsky J. Does the Liver Provide Immunosuppressive Advantage? *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2019;13(6):180-183.
2. Levitsky J, Feng S. Tolerance in clinical liver transplantation. *Human Immunology.* 2018;79(5):283-287.
3. Liu X-Q, Hu Z-Q, Pei Y-F, Tao R. Clinical operational tolerance in liver transplantation: state-of-the-art perspective and future prospects. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.* 2013;12(1):12-33.
4. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews.* 2001;182(1):18-32.
5. Levitsky J, Mathew JM, Abecassis M, et al. Systemic immunoregulatory and proteogenomic effects of tacrolimus to sirolimus conversion in liver transplant recipients. *Hepatology.* 2013;57(1):239-248.
6. Lim DG, Koo SK, Park YH, et al. Impact of immunosuppressants on the therapeutic efficacy of in vitro-expanded CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in allotransplantation. *Transplantation.* 2010;89(8):928-936.
7. Wu T, Zhang L, Xu K, et al. Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells during immune response in vivo. *Transplant immunology.* 2012;27(1):30-38.
8. Saliba F, Duvoux C, Gugenheim J, et al. Efficacy and Safety of Everolimus and Mycophenolic Acid With Early Tacrolimus Withdrawal After Liver Transplantation: A Multicenter Randomized Trial. *American Journal of Transplantation.* 2017;17(7):1843-1852.
9. Saliba F, Duvoux C, Dharancy S, et al. Early Switch From Tacrolimus to Everolimus After Liver Transplantation: Outcomes at 2 Years. *Liver Transplantation.* 2019;25(12):1822-1832.
10. Ferri S, Lalanne C, Lanzoni G, et al. Redistribution of regulatory T-cells across the evolving stages of chronic hepatitis C. *Digestive and Liver Disease.* 2011;43(10):807-813.
11. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin 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. *Journal of virology.* 2005;79(12):7860-7867.
12. Traitanon O, Mathew JM, Shetty A, et al. Mechanistic analyses in kidney transplant recipients prospectively randomized to two steroid free regimen-Low dose Tacrolimus with Everolimus versus standard dose Tacrolimus with Mycophenolate Mofetil. *PloS one.* 2019;14(5):e0216300-e0216300.
13. Levitsky J, Burrell BE, Kanaparthi S, et al. Immunosuppression withdrawal in liver transplant recipients on sirolimus. *Hepatology.* 2019;n/a(n/a).
14. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clinical and experimental immunology.* 2006;144(2):188-196.
15. Carpentier A, Conti F, Stenard F, et al. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *American journal of*

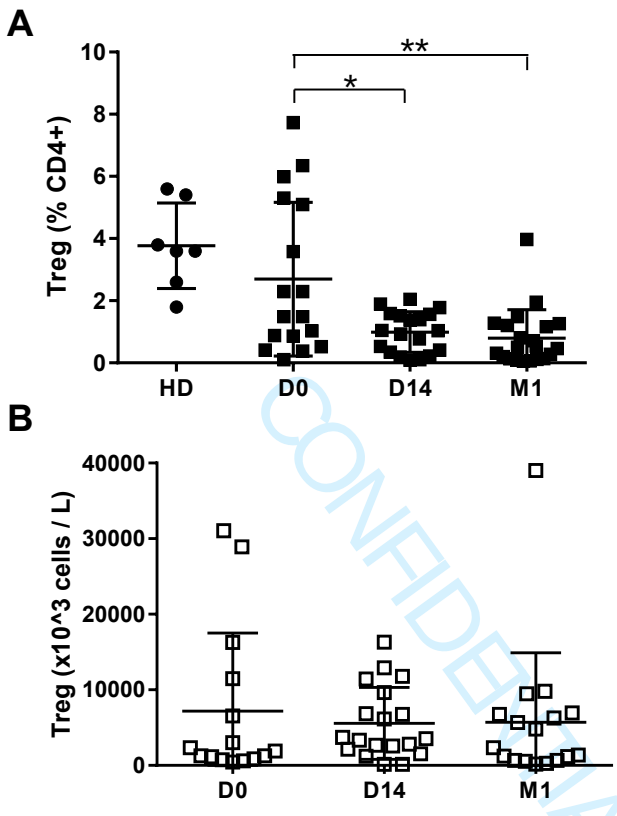
CONFIDENTIAL

transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2009;9(9):2102-2112.

16. Ghazal K, Stenard F, Dahlqvist G, et al. Treatment with mTOR inhibitors after liver transplantation enables a sustained increase in regulatory T-cells while preserving their suppressive capacity. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology.* 2018;42(3):237-244.
17. Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, et al. Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transplantation.* 2006;12(2):277-284.
18. He Q, Fan H, Li JQ, Qi HZ. Decreased Circulating CD4+CD25highFoxp3+ T Cells During Acute Rejection in Liver Transplant Patients. *Transplantation Proceedings.* 2011;43(5):1696-1700.

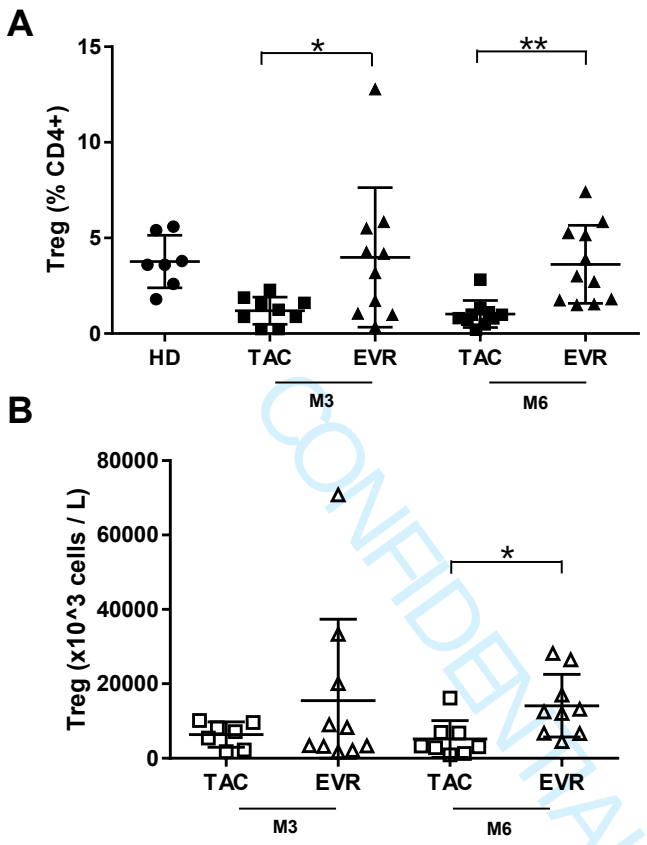
CONFIDENTIAL

Figure 1.



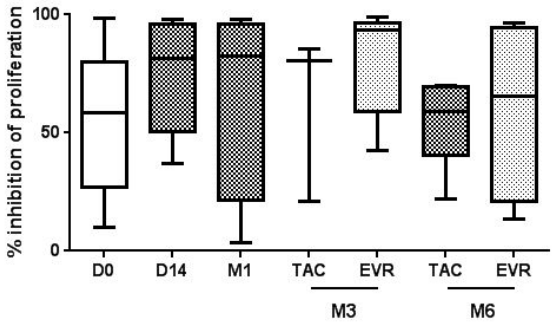
CONFIDENTIAL

Figure 2.



CONFIDENTIAL

Figure 3.



CONFIDENTIAL

Table 1.

	Tacrolimus (n=15)	Everolimus (n=15)	p value
Age (Years, Mean +/- SD)	52.07 +/- 9.63	55 +/- 6.72	0.34
Gender (Male (%)	14 (93)	11 (73,3)	0.3295
HCV + (%)	2 (13.33)	4 (26.67)	0.6513
Mean MELD score	19.93 +/- 9.7	20.27 +/- 10.18	0.77
Alcoholic cirrhosis (%)	11 (73.3)	10 (66.67)	1
HCC (%)	5 (33,33)	2 (13.33)	0,3898

Baseline characteristics

CONFIDENTIAL

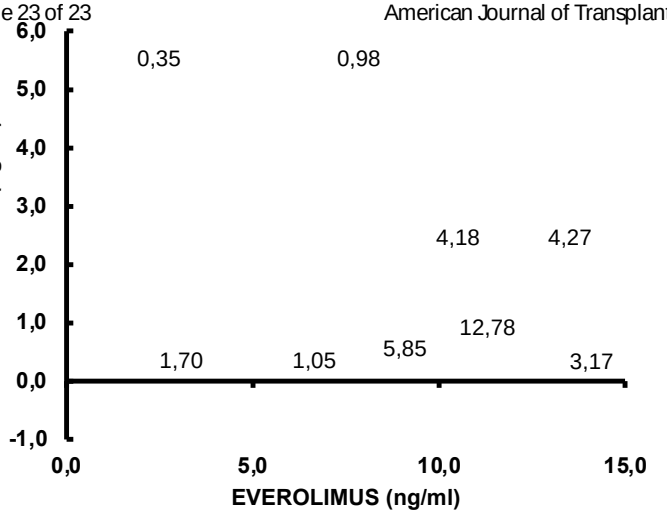

6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
-1,0
TACROLIMUS (ng/ml)
0,35
0,98
4,18
4,27
12,78
5,85
1,70
1,05
3,17
0,0
5,0
10,0
15,0
EVEROLIMUS (ng/ml)

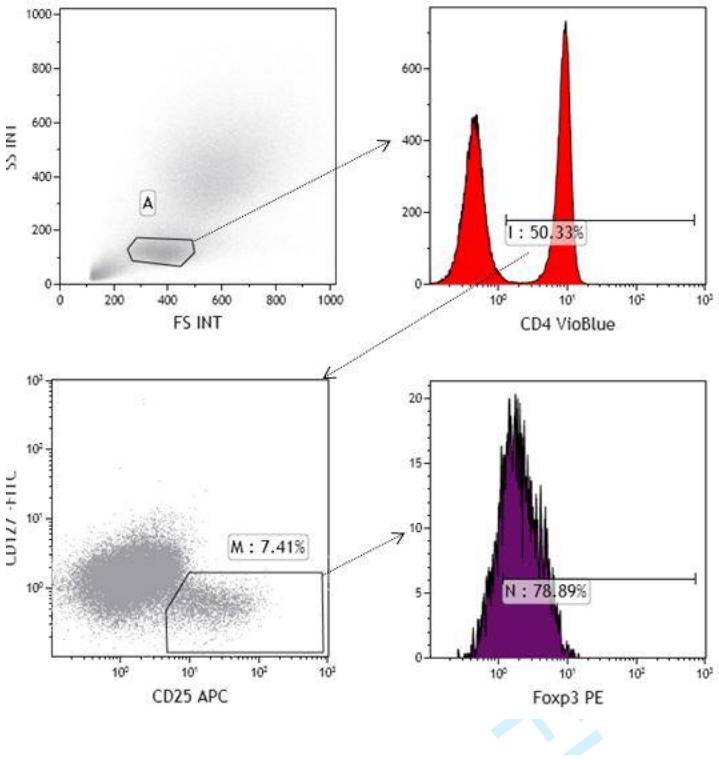
Figure 4.

Supplementary Table 1.

Patient	*Gender(M/F)*	*Age*	*HCV (+/-)*	*Alcohol*	*MELD score at transplantation*	*Specific liver disease*	*IS arm*	*Follow-up*
1	M	34	-	-	26	Congenital hepatic fibrosis	Tac	
2	M	60	-	+	38		Eve	
3	M	40	-	-	10	Caroli's disease	Eve	
4	F	56	-	+	27		Eve	
5	M	57	-	+	13	HCC	Tac	
6	M	48	-	+	32		Tac	
7	M	55	+	+	10	HCC	Tac	
8	M	44	-	+	31	Acute alcoholic hepatitis	Tac	Bacterial infection
9	M	48	-	+	14		Tac	
10	M	44	+	+	21		Eve	Bacterial infection
11	M	62	-	+	19		Eve	
32	M	60	-	+	17		Eve	Graft loss
13	M	55	-	+	12	HCC	Eve	
14	M	57	+	-	11	HCC	Tac	
15	M	54	+	-	11	HCC	Eve	CMV infection
16	F	61	-	+	17		Tac	
17	F	61	-	+	37		Tac	Viral infection
33	M	56	+	-	11	HCC	Eve	
19	F	56	-	+	19		Eve	Anemia
20	M	61	-	+	12		Eve	Bacterial infection
21	M	59	-	+	34	Hemochromatosis	Eve	Bacterial infection
22	F	56	-	-	10	Ischemic cholangitis	Eve	Renal failure/Anemia/CMV/Acute rejection
23	M	56	-	+	20		Tac	
24	M	63	-	+	31		Tac	Hyperkaliemia/Leukopenia
25	M	69	-	-	11	HCC	Tac	Severe anxiety/ renal failure/ bacterial infection
26	M	56	+	-	13		Eve	Bacterial infection
27	M	55	-	+	14		Eve	Bacterial infection
28	M	49	-	+	21		Tac	Pancytopenia
29	F	35	-	-	9	Rendu-Osler disease	Tac	
30	M	48	-	+	21		Tac	Bacterial infection

CONFIDENTIAL

Supplementary figure 1.



Article n°2

Modulatory effect of rapamycin and tacrolimus on monocyte-derived dendritic cells phenotype and function.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article, soumis à Immunobiology. Contributions de l'auteur : J'ai contribué au design de l'étude avec le Docteur Filomena Conti, le Docteur Nadira Delhem et Sarah Renaud. J'ai développé le modèle de cellules dendritiques dérivées des monocytes au sein du laboratoire afin de permettre ensuite l'étude de l'effet des immunosuppresseurs sur leur différenciation et leur maturation. Sarah Renaud et moi-même avons généré les données. J'ai analysé, interprété les données et écrit le présent manuscrit.

Nous avons utilisé un modèle de cellules dendritiques dérivées des monocytes, modèle qui n'était pas encore utilisé au laboratoire et qui a dû être mis au point au début de ma thèse. Nous avons ensuite traité ces cellules par du tacrolimus ou de la rapamycine en comparaison à un modèle tolérogène bien défini afin d'analyser leurs propriétés tolérogènes tant sur le plan phénotypique que fonctionnel.

Nous avons mis en évidence un profil tolérogène partiel des cellules traitées par la rapamycine et peu de modification du phénotype des cellules traitées par le tacrolimus.

Une réduction de l'enzyme IDO, enzyme pro-tolérogène, dans les cellules traitées par la rapamycine est à notre connaissance un élément observé pour la première fois dans la littérature.

Modulatory effect of rapamycin and tacrolimus on monocyte-derived dendritic cells phenotype and function.

Geraldine Dahlqvist[1,2], Sarah Renaud[3], Clement Barjon[4], Anthony Lefebvre[3], Lynda Aoudjehane[1], Yves Horsmans[2], Nadira Delhem*[3], Filomena Conti*[1,5]

1. Sorbonne Université, INSERM, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France

2. Hepatogastroenterology unit, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium

3. CNRS, UMR8161, Institut de Biologie de Lille, Université de Lille, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, Lille, France.

4. de Duve Institute, UCLouvain, 1200 Brussels, Belgium

5. AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Liver transplantation unit, F-75012, Paris, France

** both authors equally contributed to this work*

Corresponding author : Geraldine Dahlqvist ; Hepatogastroenterology unit, Cliniques Universitaires Saint-Luc, 10 avenue Hippocrate, 1200 Brussels; geraldine.dahlqvist@uclouvain.be

Abstract:

Background: Immunosuppressive-drugs are needed after solid organ transplantation to prevent allograft rejection but induce severe side effects. Understanding the alloimmune response is critical to modulate it and to achieve graft operational tolerance. The role of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells (Tol-DCs) is undoubtedly primordial in tolerance induction. The aim of this study was to better understand the effect of immunosuppressive drugs on the differentiation, maturation and function of human monocyte derived dendritic cells (DCs).

Material and methods: DCs were differentiated from monocytes of healthy donors with rapamycin (Rapa-DCs) or with tacrolimus (Tac-DCs). The phenotype was evaluated by FACS analysis. The production of pro- and anti-inflammatory cytokines was assessed by ELISA. The mRNA expression level of IDO and PD-L1 was assessed by RTqPCR. Mixed leukocytes reactions were performed to analyse suppressive activity of DCs.

Results: Rapa-DC were characterised by a lower expression of the co-stimulatory molecules and CD83 than control-DCs (CTR-DC) ($p < 0.05$). In contrast, tacrolimus had no effect on the expression of surface markers compared to CTR-DCs. Rapamycin reduced both IL-12 and IL-10 secretions ($p<0.05$). Rapa-DCs had a suppressive effect on $CD4^+$ allogenic T cells compared to CTR-DCs ($p<0.05$). However, neither Rapa-DCs nor Tac-DCs favoured the emergence of a $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ population compared to CTR-DCs. Surprisingly, Rapa-DCs had a reduced expression of IDO and PD-L1 compared to Tac-DCs and CTR-DCs.

Conclusion: Rapa-DCs exhibited only an incomplete tolerogenic profile. To our knowledge it is the first paper showing a reduction of expression of pro-tolerogenic enzyme IDO in DCs.

Keywords: Tolerance, IDO, immunosuppressive drugs

Introduction:

Dendritic cells (DCs) are bone marrow-derived professional antigen presenting cells (APCs) that play a critical role in regulating both adaptive and innate immune responses. They promote self-tolerance in healthy steady-state and are important in many disease states including rejection after solid organ transplantation 1-3. DCs as well as other mononuclear phagocytes are major actors of the innate immunity. Beside this role, they are efficient stimulators of B and T lymphocytes. Their migration capacities to secondary lymphoid organs, their cytokine secretion profile, the presentation of antigen on the Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules and the surface expression of costimulatory molecules are part of this process. Therefore, they undergo a specific differentiation and maturation process that can be modulated by different drugs 1.

In the context of solid organ transplantation, alloantigens from donor cells can be presented to recipient T cells in at least three different pathways: direct, indirect and semi-direct. As professional APCs, DCs are central in these processes. In the direct pathway, donor DCs process and present alloantigens from the donor to recipient T cells and favour rejection and through the secretion of pro-inflammatory cytokines. The indirect pathway involves recipient DCs presenting donor antigens to recipient T cells. Eventually, donor MHC complexes can be transferred from donor DCs to recipient DCs through exosomes and can present donor antigens through a semi-direct pathway.

A good knowledge of the effect of immunosuppressive drugs on DCs during their differentiation and maturation process raises the opportunity to better understand how these drugs act in the particular immune context of organ transplantation 4·5. Human dendritic cells development has been modelled *in vitro* using monocyte differentiation protocols with GM-CSF and IL-4 to obtain monocyte-derived dendritic cells (moDCs). Tolerogenic DCs (Tol-DCs)

can be obtained by cultivating monocytes with tolerance-inducing agents during the differentiation step 6.

Usually, Tol-DCs are defined as DCs with reduced surface expression of MHC molecules and costimulatory molecules, decreased production of IL-12 and increased production of IL-10, limited induction of T cell proliferation and increased regulatory T cells (Treg) induction compared to mature DCs7·8. Immature DCs (iDCs) exhibit these tolerogenic characteristics. As the immature state is relatively unstable, especially under pro-inflammatory conditions, several pharmaceutical agents have been proposed to enhance and stabilise their tolerogenic properties. There is to date no consensus on the optimal drug to use to induce Tol-DCs. Dexamethasone, vitamin D, retinoic acid, minocycline and rapamycin have all been studied - and may stabilise a tolerogenic state 6·9. As tacrolimus is the cornerstone of the immunosuppressive treatment administered after solid organ transplantation, the purpose of this work was to evaluate the *in vitro* effect of tacrolimus on DC differentiation and maturation, compared to rapamycin, an mTOR inhibitor which is considered a tolerogenic drug 10. We also evaluated the impact of treated DCs on T cell alloactivation to assess their functional capacities.

Results

Rapamycin but not Tacrolimus influences monocyte derived dendritic cells phenotype *in vitro*.

To better characterize the effect of rapamycin and tacrolimus on DC differentiation, we treated human CD14+ cells with rapamycin (Rapa-DCs) at a physiological concentration of 5 ng/mL or tacrolimus (Tac-DCs) at a supraphysiological concentration of 20ng/. It is known that physiological concentration of tacrolimus does not induce phenotypical modifications of DCs [11]. A tolerogenic control group (Tol-DCs) was differentiated in the presence of IL4 alone [12,13]. iDCs, Rapa-iDCs, Tac-iDCs and Tol-iDCs are immature dendritic cells after 5 days of culture. CTR-DCs, Rapa-DCs, Tac-DCs and Tol-DCs undergo maturation after LPS stimulation. [14]

Rapamycin is known to induce apoptosis [15,16]. This was confirmed in our study (Figure 1A, 1B) as we observed a reduced viability of 71.5 ± 8.7% (mean ± SD) of the CTR-DCs ($p < 0.01$) before LPS stimulation. The viability was 52 ± 19.8% (mean +/- SD) in the Rapa-DCs after LPS stimulation compared to CTR-DCs ($p=0.0015$; $n=7$). There was no significant difference in terms of viability between Tac-DCs compared to control cells.

Tol-DCs showed reduced expression of CD83, CD86 and CD209 before and after LPS stimulation. Rapa-DCs showed reduced CD80, CD86 and CD83 expression after differentiation well as after LPS stimulation. Tacrolimus had no significant effect on the expression of surface markers CD80, CD83, CD86 and CD209 compared to CTR-DCs (Figure 1 C-E).

Rapa-DCs were characterised by an immature phenotype compared to untreated DCs (Figure 2A). They showed significantly lower expression of costimulatory molecules such as CD80 and CD86 than CTR-DCs. Indeed, it was significantly different for the costimulatory molecule CD80 after LPS stimulation ($p=0.0292$; $n=7$). The expression of CD86 was also reduced in Rapa-DC compared to CTR-DCs ($p < 0.001$, $n=7$).

Rapa-DCs were resistant to LPS maturation compared to CTR-DCs and TAC-DCs. (Figure 2B.)

The expression of CD80, CD86 and CD83 was significantly increased in CTR-DCs after LPS stimulation (one-way ANOVA, p = 0.0021, Bonferroni's multiple comparison tests) unlike R Rapa-DCs after LPS-stimulation.

Figure 1. Phenotypic aspect of moDCs depending on their treat

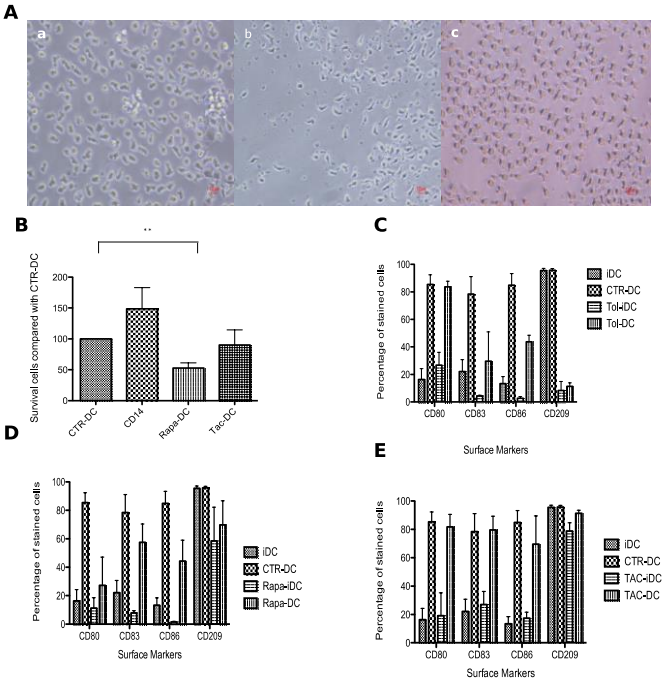


Figure 1. A. Microscopic image (20x) at day 7 of culture of (a) tolerogenic DCs, (b) Rapamycin-DCs and (c) Tacrolimus-DCs. **B.** Cell viability measured by Annexin V and propidium iodide staining, expressed in proportion of viability compared to the control group (CTR-DCs)(mean ± SEM, n=7; p=0.0015 between CTR-DCs and Rapa-DCs). **C-E.** Percentage of stained cells for CD80, CD86, CD83 and CD209 surface markers (mean ± SEM of eight experiments; one-way ANOVA p <0.05) for Tol-DC (C), Rapa-DC (D) and Tac-DC (E).

Rapamycin treated DCs do not have a tolerogenic cytokine secretion profile.

To better characterize their ability to modulate their environment we performed ELISA experiments on the supernatants of the DC cultures to determine IL-10 and IL-12p40 secretion capacity of Rapa-DCs, Tac-DCs, Tol-DCs and CTR-DCs. Rapamycin reduced significantly the release of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the supernatant compared to CTR-DCs. IL-10 concentrations were 666.3 ± 819.6 pg/mL (mean ± SD) in CTR-DC, 7.6 ± 4.871 pg/mL in Rapa-DCs and 791.9 ± 890.5 pg/mL in Tac-DCs. Rapamycin inhibited the capacity of dendritic cells to respond to LPS stimulation. CTR-DCs increased IL-12 secretion after LPS stimulation by 77.37 ± 67.19-fold (mean ± SD) compared to 1.35 ± 1 fold in Rapa-DCs ($p<0.05$) and 11.86 ± 16.77 in Tac-DCs (ns). Thus, Rapa-DC and Tol-DC showed a significantly reduced capacity to secrete IL-12. LPS stimulation strongly enhanced IL-10 secretion by Tol-DC (35.07 ± 41.18 fold) compared to Rapa-DCs (1.03 ±1.068 (mean ± SD), $p<0.001$). IL-10/IL-12 ratio was largely in favour of IL-10 secretion for Tol-DCs compared to CTR-DCs and Rapa-DCs ($p=0.01$) but it was not significantly different for Tac-DCs (Figure 2 C). A reduced TNF alpha secretion in Rapa-DCs after LPS stimulation was also observed (data not shown).

Figure 2. LPS maturation of moDCs and cytokine secretion profile

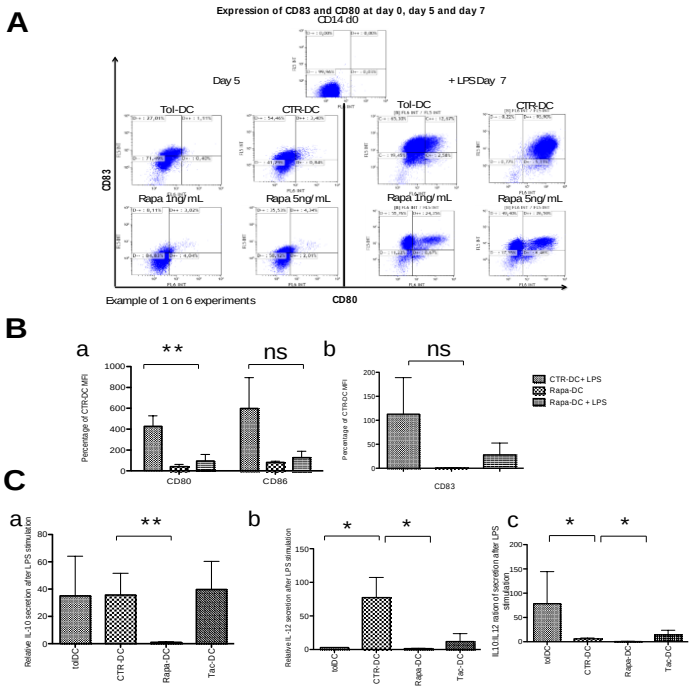


Figure 2. A. Expression of CD80 and CD83 at day 5 and day 7 of Rapa-DC (two concentrations : 1 ng/ml, 5 ng/ml) vs Tol-DC and CTR-DC. Representative of 8 experiments. **B.** Relative MFI (percentage) of CD80, CD83 and CD86 staining of CTR-DC after LPS stimulation, Rapa-DC before and after LPS-stimulation. Results are standardized to the MFI of the control-isotype staining of CTR-DC (mean ± SEM; one-way ANOVA and Bonferroni post-test). **C.** Fold induction of IL-10 (a) and IL-12 (b) after LPS stimulation in supernatant. (c) Ratio of IL-10/IL-12 induction after LPS stimulation (mean ± SEM; n=5; one-way Anova and Dunnet post-test compared to the CTR-DC group).

Rapa-DCs inhibit suppressive markers compared to CTR-DCs and Tac-DCs. [17]

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a potent immunosuppressive enzyme of 45-kDa expressed in DCs. This monomeric heme-containing protein is the rate-limiting enzyme of the kynurenine pathway which degrades the essential amino acid tryptophan (Trp)[18,19]. Through degradation of the neighbouring Trp, IDO inhibits T-cell proliferation and accelerates T-cell apoptosis. Moreover, PD-L1 is an immune-suppressive protein associated to a tolerogenic

state. To assess the effect of immunosuppressive drugs on the expression of IDO and PD-L1 in DCs, RTqPCR analysis and western-blot were performed after LPS stimulation. Relative expression profiles of IDO and PD-L1 follow the same tendency, Rapa-DCs and iDCs showed a significantly reduced expression of IDO compared to CTR-DCs and Tac-DCs (Figure 3 Aa-Ab). Moreover, Western blot confirms the highest production of IDO by CTR-DCs and Tac-DCs (Figure 3B.)

Figure 3. Suppressive markers expression in moDCs

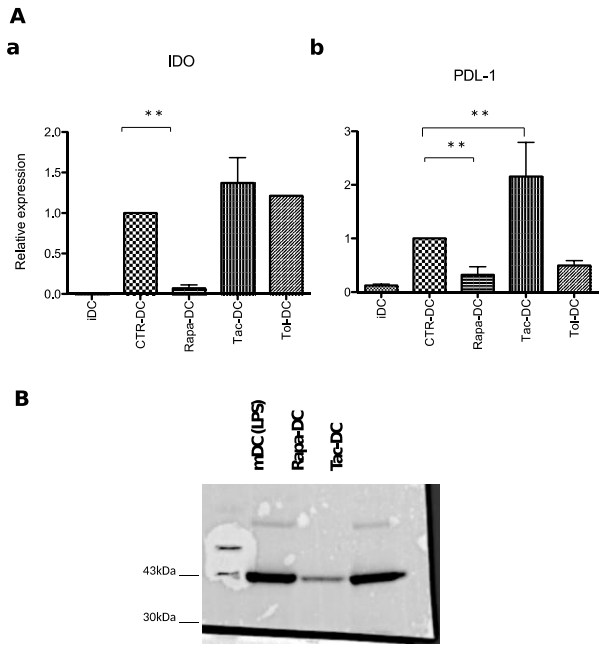


Figure 3. A. qPCR results expressed as relative expression for IDO and PDL1 (one-way ANOVA + Bonferroni's test). (a) IDO expression was significantly lower in Rapa-DC vs CTR-DC ($p<0.002$, N=3). (b) PDL1 expression was significantly higher in Tac-DC vs CTR-DC ($p<0.002$) and significantly lower in Rapa-DC vs CTR-DC. **B.** Western-blot analysis for IDO concentration (mDC=CTR-DC) (one representative experiment out of three is shown).

Rapa-DCs, Tac-DCs, Tol-DCs and immature-DCs have the same capacity to stimulate CD4+ T cell proliferation.

To assess the inhibitory capacity of the treated moDCs on CD4 T-cell proliferation, we labelled CD4+ cells with CFSE and cultured the cells for 7 days with moDCs treated by tacrolimus, rapamycin. We compared those co-cultures with activated CD4+ T cells using anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Rapa-DCs showed lower stimulation capacity of CD4+ T cells than immature CTR-DC ($p=0.05$, Figure 4 A.) To assess the suppressive capacity of Rapa-DCs on PBMCs we performed a mixed leukocyte reaction with irradiated DCs and PBMCs (ratio 1:10). Proliferation was assessed after 72 hours of coculture using radioactivity reading of [^{3}H] thymidine incorporation. Immature DCs as well as Rapa-DCs showed a more important suppressive capacity on PBMCs than CTR-DCs (one-way ANOVA and Bonferroni post-test: $p<0.0001$ and 0.001 respectively, Figure 4B) and Tac-DCs.

Rapa-DCs do not favour regulatory T cells during CD4+ T cells/DC co-culture.

We performed a mixed leukocyte reaction with DCs and $CD4^{+}$ T cells (ratio 1:10) for seven days. We measured by FACS analysis the percentage of natural regulatory T cells (nTregs) $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3^{+}CD127^{-}$ among the total $CD4^{+}$ population. We did not observe an increase in nTregs in CD4+ T cells cocultured with Rapa-DCs compared to Tac-DCs and CTR-DCs (Figure 4 C).

Figure 4. Functional characteristics of moDCs

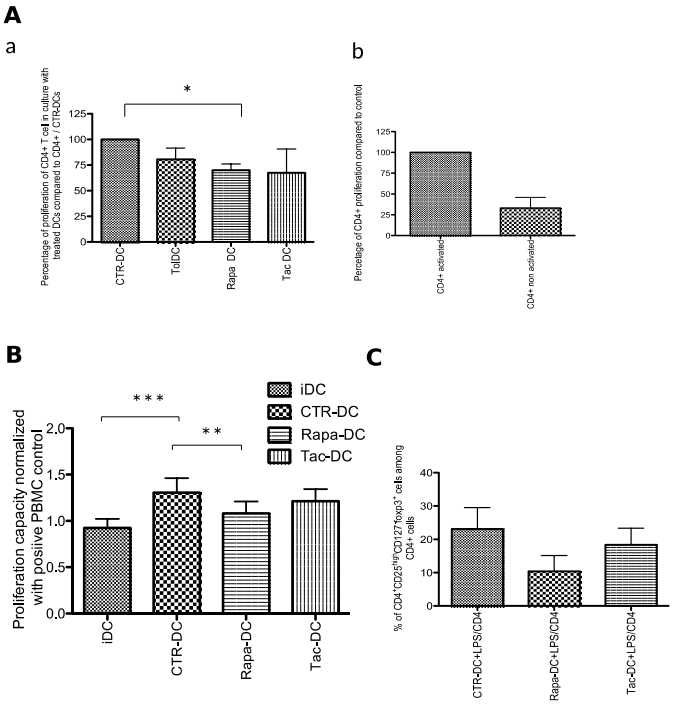


Figure 4. A. Proliferation assay using CFSE-labeled CD4+ T cells in coculture with Tol-DCs, (ratio 1:10). Results are expressed in percentage of CFSE positive cells relative to CTR-DC. **B.** Percentage of proliferation of CD4+ T cells expressed in relative CFSE positivity compared to control. (Mean ± SEM; p=0.037*) Mixed leukocyte reaction with DCs and PBMCs 1:10. Proliferation was measured after [^{3}H] thymidine incubation. iDC and Rapa-DCs showed PBMC suppression compared to CTR-DCs (*** p<0.0001 **p<0.001). **C.** Percentage of CD4+ cells with $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ staining after 6 days of coculture with CTR-DC or treated DCs. (mean ± SEM; n=4, one-way ANOVA NS).

Discussion

Dendritic cells are professional antigen presenting cells that play a critical role in the initiation and regulation of the adaptive immune responses. The quest to immune tolerance leads to the development of different immunosuppressive strategies. The use of tolerogenic DCs is a promising therapeutic strategy 6 that could be coupled to other treatments such as a

progressive reduction in calcineurin inhibitors (CNI) long after transplantation 20 or the switch from CNI to mTOR inhibitors21.

mTOR inhibitors, such as rapamycin or everolimus inhibit the mammalian target of rapamycin (mTOR), is a serine/threonine kinase that regulates protein synthesis and cell growth in response to different factors. It plays a crucial role in T cell activation and differentiation 22. There are several reports showing the capacity of mTOR to control differentiation, cytokine production in dendritic cells. The reports are somehow controversial depending on the dendritic cell subset and culture conditions 23·24.

Rapamycin, as well as other m-TOR inhibitors, is often mentioned as a pro-tolerogenic drug through its capacity to induce Tregs in contrast with tacrolimus 25-30. In murine models, Taner et al. have shown prolonged graft survival when recipient derived rapamycin-treated DCs were infused prior to transplantation followed with a low dose of tacrolimus 31·32. In vivo, Levitsky et al. recently suggested that a switch from a CNI to a m-TOR inhibitor seems to help maintaining tolerance in very selected patients with immunological tolerogenic signature 33. In contrast, in a randomised trial in liver transplant recipients, De Simone et al. have observed that the incidence of acute rejection was higher in patients receiving mTOR inhibitors alone compared to the groups receiving CNIs or mTOR inhibitors plus CNIs34

The effects of CNIs and m-TOR inhibitors on $CD4^{+}$Tcells, the main targets of immunosuppressive (IS) drugs, have been largely investigated *in vitro* and *in vivo* 35·36. However, reports investigating DC function in the presence of rapamycin display controversial results and unanswered questions remain regarding the possibility of using Rapa-DCs as a tolerance inducting strategy.

As previously described, rapamycin has shown capacity to modify the differentiation process of moDCs 23·32. This is related to the major role of m-TOR on moDCs survival and

differentiation as this last process is dependent on GM-CSF activation of the m-TOR pathway. This explains how rapamycin induce apoptosis in moDCs but not in macrophages nor monocytes. Hence, this explains the immunosuppressive properties of this drug compared to calcineurin inhibitors 15.

In our study we also confirm that rapamycin but not tacrolimus induces tolerogenic phenotype in dendritic cells when added during the differentiation process of monocytes. Compared to CTR-DCs and Tac-DCs, Rapa-DCs exhibit a more immature phenotype with a lower expression of co-stimulatory molecules, notably CD80 and CD86. It is well known that CD80 and CD86 expression on DCs constitutes the most important co-stimulatory pathway in T cell activation 37. This reduction in costimulatory molecules is more important in rodents than in humans 38. By reducing their expression on the cell surface, rapamycin may induce a tolerogenic pattern in moDCs by diminishing their T cell activation capacity. In contrast, tacrolimus does not induce apoptosis in moDCs and does not affect DC phenotype, even at supra-therapeutic concentrations 11,39. In line with those findings we have also shown that Rapa-DCs were resistant to maturation after LPS stimulation. This confirms the stability even under inflammatory conditions.

To better assess the interaction of DCs with their environment, cytokine secretion profile evaluation before and after maturation is important. IL-10 is a key cytokine promoter of tolerance which acts by blocking IL-12 synthesis in DCs, downregulating co-stimulatory molecules thus potentiating their tolerogenicity 23,40-42. Interestingly, rapamycin does not induce a tolerogenic cytokine secretion profile in moDCs in contrast with its effect on T cells. Rapa-DCs showed reduced IL-10 and IL-12p40 secretion compared to CTR-DCs as previously described 23. The capacity of secreting IL-12p40 after LPS stimulation was reduced in Rapa-DCs as well as in Tol-DCs but not in Tac-DCs. This illustrates the essential role played by m-TOR

in cytokine secretion through NF-kB regulation and STAT3. There were no significant differences in cell surface markers of Tac-DCs nor in the cytokine secretion profile (IL-10, IL-12p40, TNF-α, TGF-β) compared to CTR-DCs but the IL-10/IL-12 ratio was in favour of pro-tolerogenic cytokines. Some experiments in mice suggests that tacrolimus-treated DCs could suppress CD4+ T-cell proliferation and enhance IL-10 secretion 43.

Although Rapa-DCs exhibit an immature phenotype as observed in Tol-DCs, they have not the same tolerogenic secretory and functional characteristics. Contrary to Rapa-DCs, Tol-DCs have the ability to generate regulatory T cells. Tol-DCs have a higher IL-10 secretion capacity than Rapa-DCs, as already described in other studies 6·9.

Navarro-Barriuso et al. have described the transcriptomic profile of different types of tolerogenic dendritic cells. They have shown that many pathways related to inflammation and chemotaxis were downregulated in rapamycin-tolerogenic DCs in contrast with vitamin-D3 and dexamethasone tolerogenic DCs 44-46.

For the first time to our knowledge, we have shown reduced Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mRNA and protein expression in Rapa-DCs compared to the other moDCs subsets. Tryptophan metabolism through IDO activity is important in the development of a tolerogenic state47. IDO expression is mainly induced by IFNs and LPS. It acts by depleting the cellular microenvironment of tryptophan leading to a blockage of T cell activation and a promotion of $CD4+CD25^{high}Foxp3^{+}$ T cells with suppressive functions. Surprisingly, we observed here that rapamycin did not enhance IDO secretion in dendritic cells whereas IDO secretion is maintained in Tac-DCs. It has been shown that inhibiting IDO activity in a rodent model of graft tolerance rapidly led to rejection. Using an *in vitro* mesangial cell injury model mimicking chronic allograft nephropathy, Liang et al. demonstrated that tacrolimus,

in cytokine secretion through NF-kB regulation and STAT3. There were no significant differences in cell surface markers of Tac-DCs nor in the cytokine secretion profile (IL-10, IL-12p40, TNF-α, TGF-β) compared to CTR-DCs but the IL-10/IL-12 ratio was in favour of pro-tolerogenic cytokines. Some experiments in mice suggests that tacrolimus-treated DCs could suppress CD4+ T-cell proliferation and enhance IL-10 secretion 43.

Although Rapa-DCs exhibit an immature phenotype as observed in Tol-DCs, they have not the same tolerogenic secretory and functional characteristics. Contrary to Rapa-DCs, Tol-DCs have the ability to generate regulatory T cells. Tol-DCs have a higher IL-10 secretion capacity than Rapa-DCs, as already described in other studies 6·9.

Navarro-Barriuso et al. have described the transcriptomic profile of different types of tolerogenic dendritic cells. They have shown that many pathways related to inflammation and chemotaxis were downregulated in rapamycin-tolerogenic DCs in contrast with vitamin-D3 and dexamethasone tolerogenic DCs 44-46.

For the first time to our knowledge, we have shown reduced Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mRNA and protein expression in Rapa-DCs compared to the other moDCs subsets. Tryptophan metabolism through IDO activity is important in the development of a tolerogenic state47. IDO expression is mainly induced by IFNs and LPS. It acts by depleting the cellular microenvironment of tryptophan leading to a blockage of T cell activation and a promotion of $CD4+CD25^{high}Foxp3^{+}$ T cells with suppressive functions. Surprisingly, we observed here that rapamycin did not enhance IDO secretion in dendritic cells whereas IDO secretion is maintained in Tac-DCs. It has been shown that inhibiting IDO activity in a rodent model of graft tolerance rapidly led to rejection. Using an *in vitro* mesangial cell injury model mimicking chronic allograft nephropathy, Liang et al. demonstrated that tacrolimus,

cyclosporine A and mycophenolate mofetil (MMF) upregulated the expression of IDO mRNA and protein in mesangial cell compared to untreated cell whereas rapamycin had no effect 18. Bracho-Sanchez et al. recently reported that exogeneous supply of IDO maintains immunoregulatory functions in a murine model of DCs suggesting a potential important role of IDO in immune tolerance.48

We also observed a significantly lower expression of PD-L1 mRNA in Rapa-DCs compared to CTR-DCs or Tac-DCs. In the presence of rapamycin, Haidinger et al. had already shown a reduced surface expression of B7-H1 (also known as PD-L1), a PD-1 ligand that contributes to the negative regulation of T lymphocyte activation23. Tacrolimus treatment enhances the PD-L1 mRNA expression in moDCs.

The inhibition of m-TOR by rapamycin during the differentiation and maturation process of moDC enhanced some pro-inflammatory molecules with a low IL10:IL-12p-40 ratio and inhibits anti-inflammatory molecules such as IDO, PD-L1 and IL10. Tacrolimus did exert its immunosuppressive capacity through the expression of anti-inflammatory molecules, with IDO expression being similar to CTR-DCs and showing increased PD-L1 expression. Immature and mature DCs are known to induce the emergence of regulatory T cells in a CD4+ population in vitro 49 38. T regs exert a suppressive activity on DCs and help to maintain their tolerogenic steady state in a non-inflammatory environment.

Rapa-DCs and Tac-DCs in co-culture with CD4+ T-cells did not show an increased capacity of inducing Tregs compared to CTR-DCs. Tacrolimus did not reduce the capacity of CTR-DCs to induce Tregs. Mixed leucocyte reaction with DCs and PBMCs showed a significantly reduced proliferation of PBMCs in the presence of Rapa-DCs or iDCs compared to CTR-DCs or Tac-DCs. Rapamycin exerted its immunosuppressive effect on moDCs through phenotypical modifications and global reduction in cytokine secretion rather than through

tryptophan metabolism or pro-tolerogenic cytokine secretion. The reduction of surface costimulatory molecules reduced interaction with T cells and T cell activation. Although tacrolimus treatment of moDCs did not reduce PBMC or T cell proliferation in our experiments, it has been shown under other experimental conditions that tacrolimus-treated DCs retained tacrolimus in the cell cytoplasm and continuously released the drug in the supernatant having an indirect immunosuppressive effect on T cells 10.

In conclusion, we show here an overview of the phenotypical and functional changes in moDCs in presence of rapamycin or tacrolimus during the whole differentiation process compared to iDCs or Tol-DCs. We conclude that rapamycin treated moDCs exhibit some phenotypical characteristics of tolerogenic DCs that are not sufficient to confer a full tolerogenic profile to these cells. Indeed, rapamycin reduces the expression of pro-tolerogenic proteins such as PD-L1, IDO and IL-10. This probably explains a part of the anti-tumoral effect of rapamycin and inflammatory effect triggering Th1 response in some patients (interstitial pneumonitis, glomerulonephritis)50. Tacrolimus does not change the phenotypical or functional characteristics of moDCs at supratherapeutic concentration but interestingly enhances anti-inflammatory proteins such as PD-L1 and IL10 that could lead to allograft acceptance.

This study helps to better understand the immunosuppressive effect of rapamycin and tacrolimus. Although it does not contradict the *in vivo* tolerogenic role of rapamycin, our Rapa-DC model is probably not the best model for developing stable tolerogenic DCs for infusion in transplanted patients. Other models of moDCs, such as vitamin-D3-moDCs or moDCs cultured in the presence of cocktails of tolerogenic cytokines (IL10, prostaglandin E2…) have shown more stable and comprehensive profiles 5.

Materials and methods:

CD14+ monocytes magnetic sorting Buffy coats were obtained from healthy donors, according to the approval by the Ethics Committee (CPP) for Ile de France III. PBMCs were isolated from buffy coats from healthy donors using Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. $CD14^+$ monocytes were isolated by positive selection using micro-magnetic beads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol.

moDC generation and maturation

$CD14^+$ monocytes were cultured for 7 days in 6-wells plate in 3ml RPMI supplemented with 10%FCS, sodium pyruvate (1mM), HEPES Buffer Solution 1%, minimum essential medium 1% and penicillin and streptomycin 0,1%. DCs were differentiated using GM-CSF (25ng/mL) and IL-4 (10ng/mL). Rapamycin treated moDC (Rapa-DC) were generated by adding rapamycin to the culture from day 0 at two different doses (1ng/mL and 5ng/mL) and tacrolimus-treated moDC (Tac-DC) were generated by adding tacrolimus from day 0 at the dose of 20ng/mL. Tol-DC were obtained by adding GM-CSF alone without IL-4.

Maturation of DC was induced at day 5 by adding LPS (100ng/mL) for 48 hours. The cells were harvested on day 5 and 7.

Flow cytometry analysis

The following antibodies were used for cell-surface molecule expression analysis: CD14-FITC, CD80-PE-Vio770, CD86-VIoblue, CD83-APC and CD209-PE or the corresponding isotype (Miltenyi Biotech).

Cell viability was analysed using Annexin V FITC staining in combination with propidium iodide. Cells were harvested, washed and labelled with Annexin V FITC for 15 minutes at 4°C then washed again and stained with propidium iodide. FACS analysis was performed on Beckmann-Coulter Gallios 8 and the data was analysed using Kaluza and Flowjo software.

ELISA

At day 5 and 7, supernatants of moDC cultures were analysed for IL-10, TGF-β, TNF- α and IL-12-p70 concentration.

$CD4^+$ magnetic sorting

PBMC were isolated from blood from healthy donors using Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Total $CD4^+$ cells were isolated by negative selection using micro-magnetic beads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol.

moDCs and CD4+ co-culture

moDCs were cultured for 6 days with CD 4+ T cells (ratio 1 :10) in a 12 or 24-wells plate in RPMI complete medium.

At the end of the treatment the cells were harvested and analysed by flow cytometry.

T cell proliferation assay

Purified CD4+ T cells (Miltenyi CD4+ T cell isolation kit) were CFSE-Labeled (Invitrogen CellTrace cell proliferation kit) according to the manufacturer's instructions. $2x10^5$ CD4+ T cells were cocultured with $2x10^4$ allogeneic DCs for 7 days. DCs were Tol-DCs, Rapa-DCs, Tac-DCs or immature DCs (iDC).

Mixed Leukocyte Reaction (MLR) - suppression assay

Suppressive activity of DCs was measured by their ability to inhibit the proliferative response of allogenic PBMCs in a MLR. Assays were set up with a mixture of irradiated DCs and PBMCs (1:10) in a round bottom 96-well plate (Corning Costar) and cultured for 48 and 72hours. Cells were activated with plate-bound anti-CD3 (1 µg/mL), incubated at 37°C for 2 hours before the culture and soluble anti-CD28 (10 ng/mL) (Clinisciences, Montrouge, France) was added at the time of the culture. There are three types of DCs are: iDC, CTR-DC, Rapa-DC and Tac-DC. Proliferation was measured after [^{3}H] thymidine (1µCi/well) (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) incubation for the last 18 hours before harvesting. Radioactivity was

determined using a β-counter (1450 Trilux, Wallac, Finland). Each proliferation assay was carried out in triplicate and estimated in count per minute (cpm) and results were normalized compared with the positive control.

Western Blot analysis

Cells were lysed (10 minutes on ice) in PY buffer consisting of 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.02% sodium azide, and a cocktail of proteases inhibitors (Roche, Basel, Switzerland) during 10 min on ice. After centrifugation (14 000rpm, 30 minutes, +4°C), cell debris were removed, and supernatants were collected. Protein concentrations were measured using Bio-Rad Protein Assay according to manufacturer's instructions (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Total cell extracts were then analyzed by western blotting.

Briefly, proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis using gradient pre-casts gels (4-12% gradient, Bis-Tris, Invitrogen) in standard conditions. Then proteins were transferred on PVDF membranes (Hybon d™-C Extra, Amersham Biosciences, UK). The latter was blocked for 2 hours at room temperature in blocking buffer containing 2% casein, 0.1% Tween20 (Sigma-Aldrich) and PBS (1X), and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies anti-IDO (Cell Signaling Technology, USA) and anti-cyclophilin B 1:400 (Cell Signaling Technology, USA).

Membranes were washed with blocking buffer, then incubated for 1 hour at room temperature with peroxydase-conjugated secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit, 1:10000) (GE Healthcare, Wauwatosa, USA) and washed again with blocking buffer. Specific protein signals were visualized using Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate kit (PerkinElmer, Boston, MA, USA) and signal was detected using BioRAd ChemiDoc XRS+ machine with the ImageLab software.

RTqPCR analysis

Total RNA was extracted using RNeasy minikit according to the manufacturer's instructions (Qiagen SA, Courtaboeuf, France.) Single strand cDNA was synthesized, and real-time quantitative PCR was done using LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). We used the following primers:

- IDO sens 5'-CGCTGTTGGAAATAGCTTCTTGC-3', anti-sens 5'-CTTCCCAGAACCCTTCATACACC-3'
- PD-L1 51 , sens 5'-GGTGGTGCCGACTACAAG-3' , anti-sens 5'-ATTGGTGGTGGTGGTCTTAC-3'

Flow cytometry analysis of CD4+ T Cells

PBMCs from patients (EDTA tubes) were isolated from whole blood using Ficoll gradient centrifugation. Cells were stained with anti-CD4, anti-CD25 and anti-CD127 (Miltenyi Biotech) for 30 min at 4°C. After washing, cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) then stained with anti-FoxP3 (eBiosciences) for 1h at 4°C. Flow cytometry data was acquired with Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter) and results were analysed using Kaluza software (Beckman Coulter). nTreg population was defined as CD4+ CD25+ CD127-/low FoxP3+ lymphocytes and expressed as percentages of CD4+ lymphocytes.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5 software for Mac OS X. One way ANOVA, Bonferroni post-tests and unpaired t-tests were performed with p value <0.05 considered as significant. The RTqPCR results were analysed using the "Relative Gene Expression Method" as described by Livak et al 52. Briefly, individual CT values were normalised using the average

CT values for housekeeping genes ($\Delta CT = CT - CT_{HKG}$). Average ΔCT values for each group were then compared with the ΔCT values of the control group (mild recurrence group) ($\Delta\Delta CD = \Delta CT - \Delta CT_{MRgroup}$). An evaluation of $2^{-\Delta\Delta CT}$ then indicated the fold change in gene expression relative to the control group. P-value are noted (*) for $p<0.05$ and (**) $p<0.01$.

Acknowledgements

Flow cytometry platform: Annie Munier (Sorbonne University, Inserm, Mixed Unit of Production and Data Analysis Service in Life Sciences and Health-UMS37, F-75005, Paris, France) core facility for flow cytometry (CISA), of the Saint-Antoine Research Center (INSERM UMR_S938).

References

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-252.
2. Ohnmacht C, Pullner A, King SBS, et al. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med*. 2009;206(3):549-559.
3. Thomson AW, Humar A, Lakkis FG, Metes DM. Regulatory dendritic cells for promotion of liver transplant operational tolerance: Rationale for a clinical trial and accompanying mechanistic studies. *Hum Immunol*. 2018;79(5):314-321.
4. Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(1):24-35.
5. Marín E, Cuturi MC, Moreau A. Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand? *Front Immunol*. 2018;9(274).
6. Naranjo-Gómez M, Raïch-Regué D, Oñate C, et al. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J Transl Med*. 2011;9:89-89.
7. Kim SH, Jung HH, Lee CK. Generation, Characteristics and Clinical Trials of Ex Vivo Generated Tolerogenic Dendritic Cells. *Yonsei Med J*. 2018;59(7):807-815.
8. Raker VK, Domogalla MP, Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front Immunol*. 2015;6:569-569.
9. Navarro-Barriuso J, Mansilla MJ, Naranjo-Gómez M, et al. Comparative transcriptomic profile of tolerogenic dendritic cells differentiated with vitamin D3, dexamethasone and rapamycin. *Sci Rep*. 2018;8(1):14985-14985.
10. Orange DE, Blachere NE, Fak J, et al. Dendritic cells loaded with FK506 kill T cells in an antigen-specific manner and prevent autoimmunity in vivo. *Elife*. 2013;2:e00105-e00105.
11. Duperrier K, Velten FW, Bohlender J, Demory A, Metharom P, Goerdt S. Immunosuppressive agents mediate reduced allostimulatory properties of myeloid-derived dendritic cells despite induction of divergent molecular phenotypes. *Molecular Immunology*. 2005;42(12):1531-1540.
12. Moreau A, Varey E, Bouchet-Delbos L, Cuturi M-C. Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. *Transplant Res*. 2012;1(1):13-13.
13. Chitta S, Santambrogio L, Stern LJ. GMCSF in the absence of other cytokines sustains human dendritic cell precursors with T cell regulatory activity and capacity to differentiate into functional dendritic cells. *Immunology Letters*. 2008;116(1):41-54.
14. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*. 2000;18(1):767-811.
15. Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SWA, et al. Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. *Blood*. 2001;98(1):174.
16. Monti P, Mercalli A, Leone BE, Valerio DC, Allavena P, Piemonti L. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation*. 2003;75(1):137-145.
17. Mellor AL, Munn DH. Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(10):762-774.

18. Liang G-B, Luo G-H, Bao D-S, et al. Impact of immunosuppressive agents on the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, heme oxygenase-1 and interleukin-7 in mesangial cells. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2577-2583.
19. Mellor AL, Lemos H, Huang L. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? *Front Immunol.* 2017;8:1360-1360.
20. Levitsky J, Feng S. Tolerance in clinical liver transplantation. *Hum Immunol.* 2018;79(5):283-287.
21. Sanchez-Fueyo A. Strategies for minimizing immunosuppression: State of the Art. *Liver Transplantation.* 2016;22(S1):68-70.
22. Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity.* 2010;33(3):301-311.
23. Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, et al. A Versatile Role of Mammalian Target of Rapamycin in Human Dendritic Cell Function and Differentiation. *The Journal of Immunology.* 2010;185(7):3919.
24. He Z, Zhu X, Shi Z, Wu T, Wu L. Metabolic Regulation of Dendritic Cell Differentiation. *Front Immunol.* 2019;10:410-410.
25. Miroux C, Morales O, Carpentier A, et al. Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells in vitro. *Transplant Proc.* 2009;41(8):3371-3374.
26. Miroux C, Morales O, Ghazal K, et al. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation.* 2012;94(2):123-131.
27. Miroux C, Morales O, Ouaguia L, et al. Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil. *Transplant Proc.* 2012;44(9):2834-2839.
28. Bocian K, Borysowski J, Wierzbicki P, et al. Rapamycin, unlike cyclosporine A, enhances suppressive functions of in vitro-induced CD4+CD25+ Tregs. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009;25(3):710-717.
29. Levitsky J, Gallon L, Miller J, et al. Allospecific regulatory effects of sirolimus and tacrolimus in the human mixed lymphocyte reaction. *Transplantation.* 2011;91(2):199-206.
30. Zeiser R, Leveson-Gower DB, Zambricki EA, et al. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood.* 2008;111(1):453-462.
31. Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW. Rapamycin-Treated, Alloantigen-Pulsed Host Dendritic Cells Induce Ag-Specific T Cell Regulation and Prolong Graft Survival. *American Journal of Transplantation.* 2005;5(2):228-236.
32. Macedo C, Turquist H, Metes D, Thomson AW. Immunoregulatory properties of rapamycin-conditioned monocyte-derived dendritic cells and their role in transplantation. *Transplant Res.* 2012;1(1):16-16.
33. Levitsky J, Burrell BE, Kanaparthi S, et al. Immunosuppression withdrawal in liver transplant recipients on sirolimus. *Hepatology.* 2019;n/a(n/a).
34. De Simone P, Nevens F, De Carlis L, et al. Everolimus with reduced tacrolimus improves renal function in de novo liver transplant recipients: a randomized controlled trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2012;12(11):3008-3020.
35. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo M-G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood.* 2005;105(12):4743-4748.

36. Zeevi A, Eiras G, Bach FH, et al. Functional differentiation of human cytotoxic T lymphocytes in the presence of FK 506 and CyA. *Transplantation proceedings*. 1990;22(1):106-109.
37. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol*. 2013;4:82-82.
38. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-Conditioned Dendritic Cells Are Poor Stimulators of Allogeneic CD4⁺ T Cells, but Enrich for Antigen-Specific Foxp3⁺ T Regulatory Cells and Promote Organ Transplant Tolerance. *The Journal of Immunology*. 2007;178(11):7018.
39. Tiefenthaler M, Hofer S, Ebner S, et al. In vitro treatment of dendritic cells with tacrolimus: impaired T-cell activation and IP-10 expression. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(3):553-560.
40. Wan J, Huang F, Hu W, Hao S. IL-10 gene-modified dendritic cells-induced type 1 T regulatory cells inhibit graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;507(1):122-127.
41. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10–dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. 2010;116(6):935.
42. Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, González-Pérez G, et al. Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*. 2010;184(4):1765.
43. Ren Y, Yang Y, Yang J, Xie R, Fan H. Tolerogenic dendritic cells modified by tacrolimus suppress CD4+ T-cell proliferation and inhibit collagen-induced arthritis in mice. *International Immunopharmacology*. 2014;21(1):247-254.
44. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature Immunology*. 2011;12:870.
45. Belladonna ML, Grohmann U, Guidetti P, et al. Kynurenine Pathway Enzymes in Dendritic Cells Initiate Tolerogenesis in the Absence of Functional IDO. *The Journal of Immunology*. 2006;177(1):130.
46. Brenk M, Scheler M, Koch S, et al. Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*. 2009;183(1):145.
47. Vavrincova-Yaghi D, Deelman LE, van Goor H, et al. Local gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase protects against development of transplant vasculopathy in chronic kidney transplant dysfunction. *Gene Therapy*. 2016;23(11):797-806.
48. Bracho-Sanchez E, Hassanzadeh A, Brusko MA, Wallet MA, Keselowsky BG. Dendritic Cells Treated with Exogenous Indoleamine 2,3-Dioxygenase Maintain an Immature Phenotype and Suppress Antigen-specific T cell Proliferation. *J Immunol Regen Med*. 2019;5:100015.

36. Zeevi A, Eiras G, Bach FH, et al. Functional differentiation of human cytotoxic T lymphocytes in the presence of FK 506 and CyA. *Transplantation proceedings*. 1990;22(1):106-109.
37. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol*. 2013;4:82-82.
38. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-Conditioned Dendritic Cells Are Poor Stimulators of Allogeneic CD4⁺ T Cells, but Enrich for Antigen-Specific Foxp3⁺ T Regulatory Cells and Promote Organ Transplant Tolerance. *The Journal of Immunology*. 2007;178(11):7018.
39. Tiefenthaler M, Hofer S, Ebner S, et al. In vitro treatment of dendritic cells with tacrolimus: impaired T-cell activation and IP-10 expression. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(3):553-560.
40. Wan J, Huang F, Hu W, Hao S. IL-10 gene-modified dendritic cells-induced type 1 T regulatory cells inhibit graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;507(1):122-127.
41. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10–dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. 2010;116(6):935.
42. Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, González-Pérez G, et al. Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*. 2010;184(4):1765.
43. Ren Y, Yang Y, Yang J, Xie R, Fan H. Tolerogenic dendritic cells modified by tacrolimus suppress CD4+ T-cell proliferation and inhibit collagen-induced arthritis in mice. *International Immunopharmacology*. 2014;21(1):247-254.
44. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature Immunology*. 2011;12:870.
45. Belladonna ML, Grohmann U, Guidetti P, et al. Kynurenine Pathway Enzymes in Dendritic Cells Initiate Tolerogenesis in the Absence of Functional IDO. *The Journal of Immunology*. 2006;177(1):130.
46. Brenk M, Scheler M, Koch S, et al. Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*. 2009;183(1):145.
47. Vavrincova-Yaghi D, Deelman LE, van Goor H, et al. Local gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase protects against development of transplant vasculopathy in chronic kidney transplant dysfunction. *Gene Therapy*. 2016;23(11):797-806.
48. Bracho-Sanchez E, Hassanzadeh A, Brusko MA, Wallet MA, Keselowsky BG. Dendritic Cells Treated with Exogenous Indoleamine 2,3-Dioxygenase Maintain an Immature Phenotype and Suppress Antigen-specific T cell Proliferation. *J Immunol Regen Med*. 2019;5:100015.

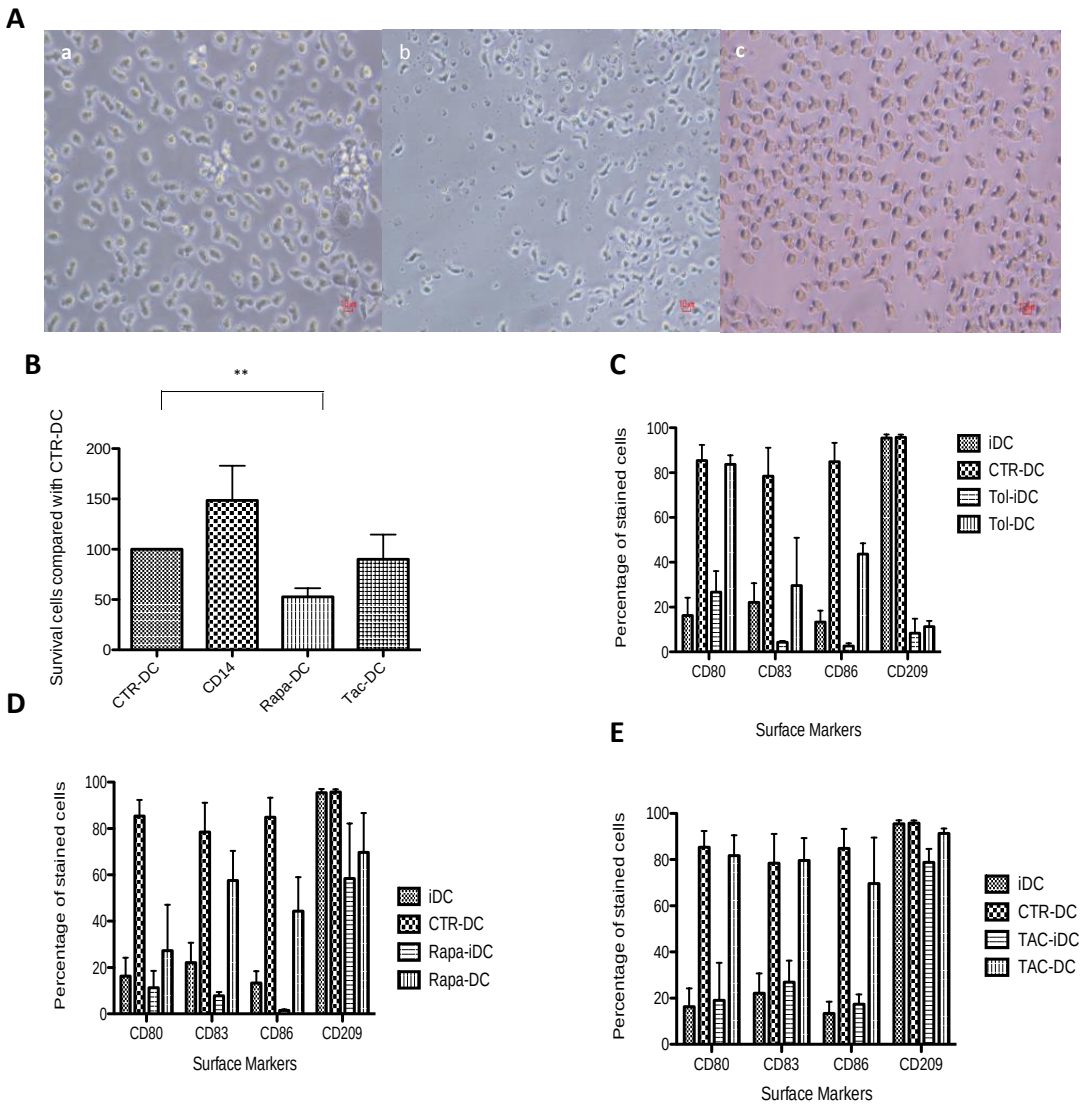


Figure 1. ***Phenotypic aspect of moDCs depending on their treatment***

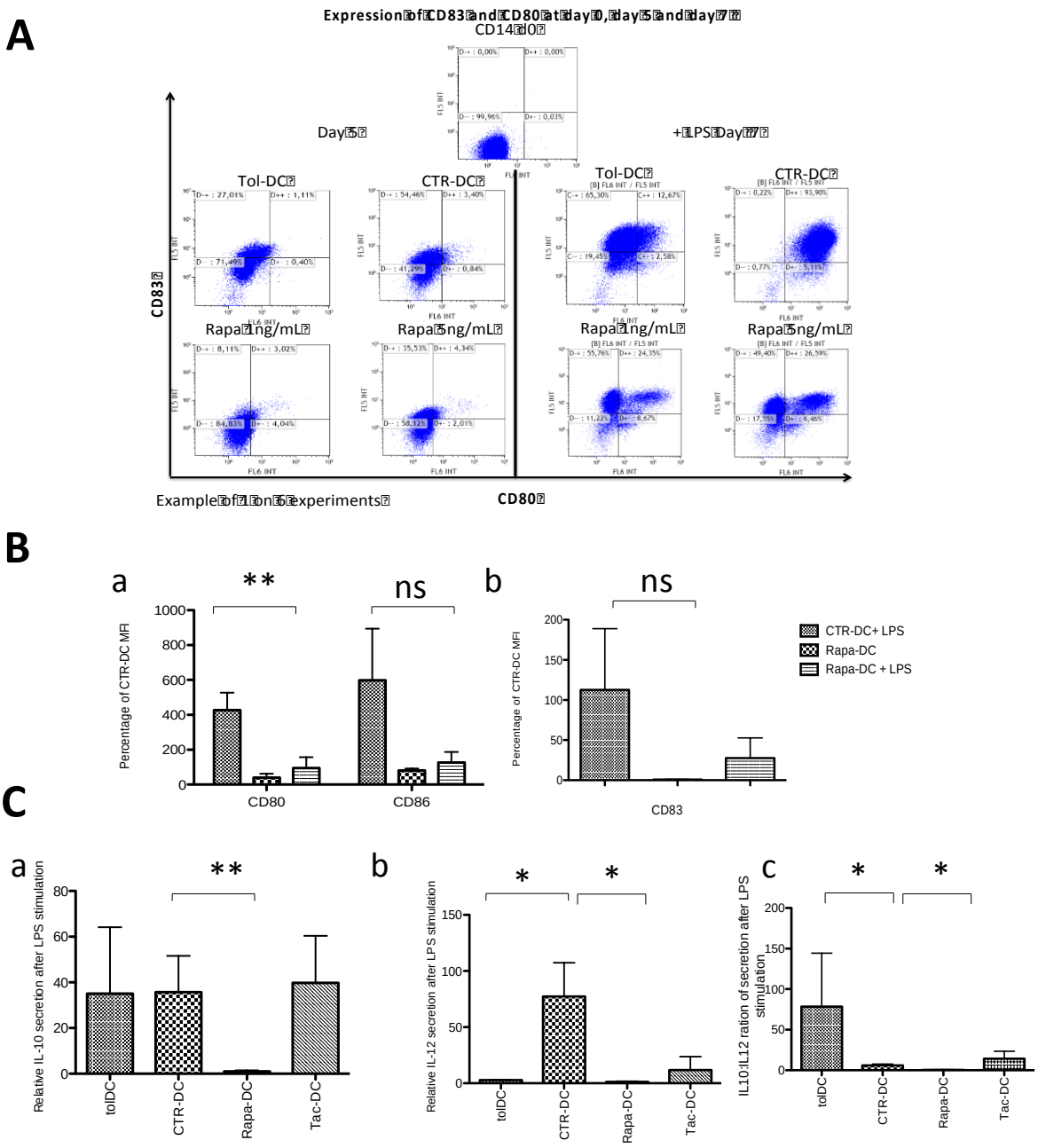


Figure 2. LPS maturation of moDCs and cytokine secretion profile

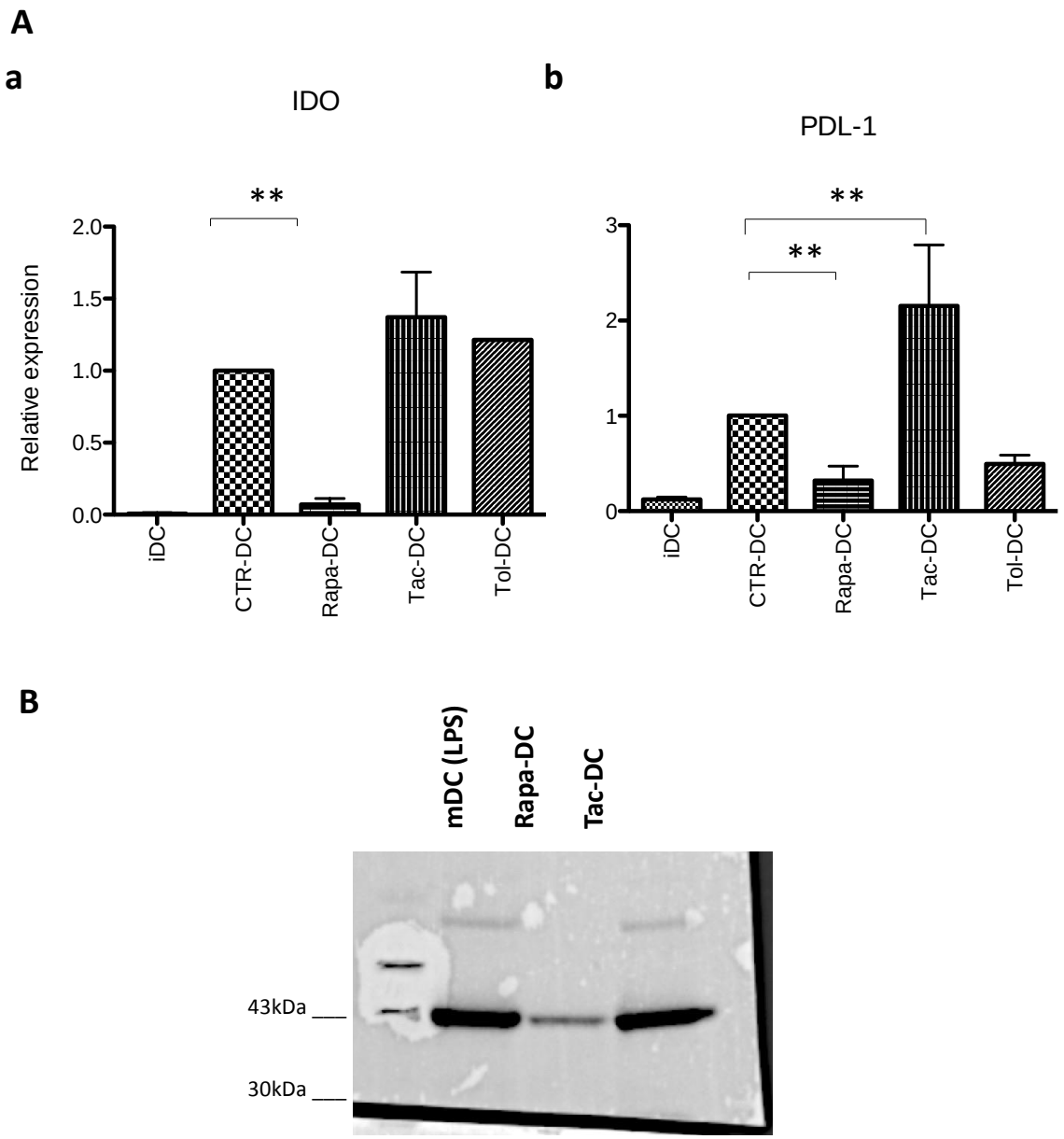


Figure 3. Suppressive markers expression in moDCs

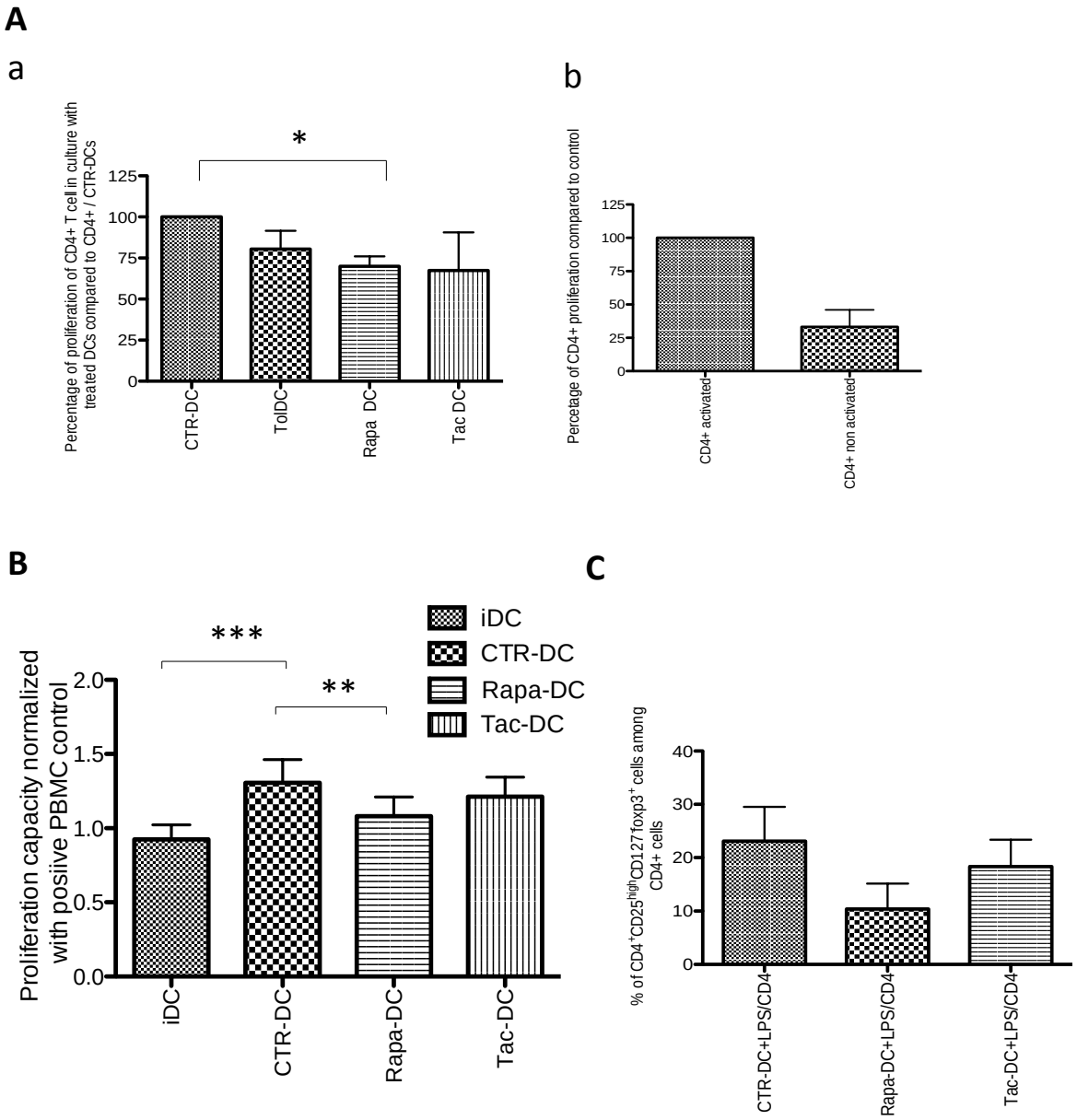


Figure 4. Functional characteristics of moDCs

Discussion et perspectives

Les lymphocytes T régulateurs en transplantation d'organe solide et l'impact de l'immunosuppression sur leur expansion in vivo.

Depuis les débuts de la transplantation d'organes solides dans les années 60, de nombreux progrès ont été réalisés permettant d'améliorer la survie des patients. La découverte des propriétés immunosuppressives des anti-calcineurines en 1972 et leur utilisation clinique depuis 1978 a révolutionné le devenir des greffons et des patients (Calne et al. 1978)[50]. Bien que très efficaces pour contrecarrer la réaction allo-immune post-transplantation, ces molécules ne sont pas dénuées d'effets secondaires. C'est la raison pour laquelle des stratégies permettant d'induire une tolérance immunitaire sont nécessaires.

Les connaissances des acteurs immunitaires pro-tolérogènes ont bien évolué au cours des dernières années. Les Tregs, les lymphocytes B régulateurs et les TolDCs sont des cellules cibles potentiellement intéressantes dans l'induction de la tolérance opérationnelle.

Une modulation du nombre de ces cellules par des traitements immunosuppresseurs comme les inhibiteurs m-TOR et l'infusion de cellules tolérogènes après génération, expansion et activation ex-vivo sont des options thérapeutiques potentiellement intéressantes.

Nous décrivons ici la première étude prospective multicentrique randomisée comparant les taux de Tregs de deux groupes de patients recevant simultanément soit un schéma d'IS basé sur le tacrolimus soit un schéma d'IS basé sur l'évérolimus chez des patients transplantés hépatiques. Cette étude démontre que les patients traités par le tacrolimus conservent de faibles niveaux de Tregs même six mois après la transplantation. À l'inverse, les patients qui ont été convertis vers un traitement par l'évérolimus récupèrent un niveau de Tregs similaire au niveau de donneurs sains.

L'évérolimus ayant clairement un effet bénéfique sur le taux de Tregs circulants, nous nous sommes demandé si la dose de médicament pourrait influencer directement les taux de Tregs circulants. Dans notre étude, la conversion plus lente de l'immunosuppression vers l'évérolimus avec la persistance de taux détectables de tacrolimus a semblé avoir un effet négatif sur les taux circulants des Tregs pour un sous-groupe de patients traités par évérolimus. Cependant, nous n'avons pas pu démontrer une corrélation quantitative globale entre les doses de médicament et

les niveaux de Tregs dans cette étude. Cela pourrait être dû au fait que les doses de médicament sont constamment ajustées chez les patients récemment transplantés et donc un échantillon à un moment donné peut ne pas refléter la quantité globale du médicament reçu. Dans d'autres études, il a été clairement démontré que le tacrolimus, le MMF et les corticoïdes avaient un effet délétère sur la viabilité des Tregs *ex vivo* (Scotta et al. 2016)[150].

La récidive virale C post-transplantation est universelle chez les patients non traités en pré-transplantation. Il est connu que la récidive virale C est associée à une augmentation du taux de Tregs circulants chez ces patients, favorisant la réinfection du greffon et probablement la fibrose plus précoce (voir Annexe 3)[151]. Suite à l'utilisation généralisée durant l'étude des nouvelles thérapies anti-virales C, il ne restait que peu de patients infectés par l'hépatite C en post-transplantation. Néanmoins, on a observé un taux de Tregs circulant plus élevés chez les patients infectés par l'HCV en post-transplantation et ce de manière plus importante dans le groupe évérolimus.

Une des limites de notre étude est l'absence d'information concernant le taux de Tregs du compartiment intrahépatique. Après transplantation hépatique, il est néanmoins connu que le niveau de Tregs circulants chez des patients stables est représentatif du niveau intrahépatique, mais qu'en situation de rejet aigu, le niveau de Tregs circulants est plus bas parce que les Tregs sont hébergés dans le foie transplanté. Un seul patient du groupe évérolimus a présenté un épisode de rejet aigu au sixième mois post-transplantation et avait un pourcentage plus faible de Tregs en circulation par rapport au troisième mois (1,8% vs 3,7%).

L'étude SIMCER n'était pas construite au départ pour montrer un effet bénéfique de l'évérolimus en termes de tolérance immunitaire mais un effet de non-infériorité en termes de puissance immunosuppressive et une meilleure tolérance rénale.

Cependant, au vu des résultats cliniques encourageants de l'étude SIMCER et de l'étude observationnelle CERTITUDE lui faisant suite, les données observées dans notre étude font de l'évérolimus une alternative intéressante aux inhibiteurs de la calcineurine pour améliorer la qualité de vie à long terme des patients transplantés et induire une tolérance immunitaire sur le long cours. Comme récemment discuté par Levitsky et al., le sirolimus, un autre inhibiteur m-TOR, est une option thérapeutique valable avant l'arrêt définitif de l'immunosuppression chez des patients très sélectionnés avec l'obtention d'un profil tolérogène des cellules sanguines potentiellement bénéfique (Levitsky et al. 2019)[26].

Perspectives

Alors que l'effet positif des inhibiteurs de mTOR sur le taux de Tregs circulants est maintenant clairement démontré, les études futures devraient impliquer une analyse à plus long terme pour déterminer si cette expansion des Tregs circulants et intrahépatiques peut conduire à une tolérance pérenne du greffon.

Au vu des effets tolérogènes des Tregs et afin de se passer des thérapies immunosuppressives non dénuées d'effet secondaire, l'infusion de cellules tolérogènes et notamment les Tregs est actuellement à l'étude dans de nombreux projets.

L'infusion de Tregs pourrait prévenir les maladies du greffon contre l'hôte, apporter un bénéfice sur des maladies auto-immunes comme le diabète et prévenir les rejets d'organes solides. La première étude chez l'homme a été réalisée chez deux patients souffrant de GvHd (Trzonkowski et al. 2009)[152]. Plusieurs études pré-cliniques clôturées ou en cours ont depuis lors montré la possibilité et la sécurité de traiter des patients avec des Tregs CD4+CD25+CD127-. Todo et al. ont publié une étude sur l'infusion de produit sanguin enrichi en Tregs sur dix patients transplantés du foie par donation vivante en 2012 et 2013. Les résultats montrent la possibilité de réduire progressivement l'immunosuppression entre le 6e et le 18e mois post-greffe et d'obtenir un arrêt de l'IS chez sept des dix patients inclus[153].

Plusieurs études cliniques de phase II sont actuellement ouvertes (NCT03867617 ; NCT02711826 ; NCT03577431) afin d'évaluer la possibilité de traiter les patients en phase pré-opératoire d'une transplantation rénale ou hépatique par une infusion de lymphocytes T régulateurs, spécifiques ou non du donneur (Figure 17, Adapté de Romano et al. 2019).

L'isolation des Tregs peut être réalisée soit à partir du sang périphérique, du sang de cordon ou du thymus. Pour rappel, le pourcentage de Tregs dans le sang périphérique est de 5 à 10% de l'ensemble des cellules $CD4^{+}$ circulantes. Bien que dans le sang de cordon ou le thymus le pourcentage de cellules soit plus élevé, il est difficile d'obtenir un nombre suffisant en pratique clinique. L'expansion de Tregs stables *ex vivo* et préservant une activité suppressive après infusion représente le premier challenge. Différents protocoles ont été proposés à cette fin (Romano et al. 2019 ; Conti et al. 2016)[36, 154]. L'expansion des Tregs est actuellement réalisée durant 36 jours, avec des billes coatées par l'anti-CD3/CD28 en présence de doses importantes d'IL2. La rapamycine est ajoutée durant la culture pour inhiber spécifiquement la

prolifération des lymphocytes T effecteurs et favoriser la stabilité et l'activité suppressive par la régulation positive du Foxp3 (Figure 18. Adapté de Conti et al. 2016).

Plusieurs questions restent néanmoins ouvertes quant au développement de cette thérapie cellulaire en transplantation d'organe solide. D'une part, il n'y a à l'heure actuelle pas de moyen de suivre la dispersion des cellules infusées dans les tissus en raison d'une difficulté de marquage cellulaire. Ces difficultés limitent donc également la possibilité de développer des études de phase III vu l'impossibilité de connaitre la dispersion des cellules dans l'organisme et de comprendre les effets potentiels sur les autres organes. D'autre part, il faut définir la population qui pourrait bénéficier de cette thérapie cellulaire, à savoir des patients ne présentant pas de maladies cancéreuses (greffe hépatique pour hépatocarcinome) ou de maladies infectieuses notamment virales (hépatite B, hépatite C…). En effet, ces pathologies pourraient être aggravées par l'infusion de Tregs. L'infusion de Tregs, bien que potentiellement bénéfique pour les maladies auto-immunes, a pour but de réduire voire d'arrêter l'immunosuppression post-greffe d'organe solide. Les patients souffrants de maladies auto-immunes devraient donc être exclus des études dans un premier temps en raison du risque de voir réapparaitre les pathologies initiales et des épisodes de rejet chez le receveur en l'absence d'immunosuppression.

Le choix de l'immunosuppression donnée en parallèle de l'infusion de Tregs est également important. Le choix des inhibiteurs mTOR semble naturel au vu des effets bénéfiques de ces derniers sur l'expansion des Tregs in vitro dans de nombreuses études. Le traitement devrait également être adapté en fonction de l'organe transplanté, la réaction immunitaire n'étant pas identique d'un organe à l'autre.

Study ID	Phase	Indication	Enrollment/ Age	Product	Dose	Status
NCT02145325	I	Living donor kidney transplant	10/ range 18–65	Polyclonally expanded tTregs (A)	0,5, 1, 5 × 10^9	Active but not recruiting
NCT02129881	I/II	Living donor kidney transplant	12/>18	Polyclonally expanded tTregs (A)	1, 3, 6 × 10^6/kg	Completed
NCT02371434	I/II	Living donor kidney transplant	9/ range 18–65	Polyclonally expanded tTregs (A)	0,5, 1, 3 × 10^6/kg	Unknown
NCT02244801	I/II	Living donor kidney transplant	16/ range 18–70	Donor-alloantigen-reactive tTregs (A)	300 and 900 × 10^6	Completed
NCT02091232	I/II	Living donor kidney transplant	8/>18	Belatacept-conditioned tTregs (A)	300 and 900 × 10^6	Active, not recruiting
NCT02166177	I	Liver transplant	9/ range 18–70	Polyclonally expanded tTregs (A)	0.5–1 and 3–4.5 × 10^6/kg	Completed
NCT02188719	I	Liver transplant	24/ range 21–70	Donor-alloantigen-Reactive Tregs (A)	50, 200, 800 × 10^6	Recruiting
NCT02088931	I	Living donor kidney transplant	3/ range 18–50	Polyclonally expanded tTregs (A)	320 × 10^6	Unknown
NCT02474199	I	CNI reduction in liver transplant	18/ range 18–70	Donor-alloantigen-Reactive Tregs (A)	400 × 10^6	Recruiting
NCT02711826	I	Subclinical Inflammation in Kidney Transplantation	40/>18	Donor-alloantigen-Reactive Tregs (A)	1 × 10^6/kg	Recruiting
NCT01624077	I	Liver transplant	1/ range 10–65	Induced Tregs (A)	1 × 10^6/kg	Unknown
ISRCTN11038572	IIb	Living donor kidney transplant	136/>18	Polyclonally expanded tTregs (A)	5–10 × 10^6/kg	Not yet recruiting
NCT01446484	I	Kidney transplant (children)	30/ range 1–18	Polyclonally expanded tTregs (A)	200 × 10^6	Unknown
NCT03577431	I/II	Liver transplant	9/ range 17–70	Belatacept-conditioned tTregs (A)	from 2.5 to 500 × 10^6	Not yet recruiting
NCT03284242	NA	Kidney transplant	12/ range 18–65	Polyclonally expanded tTregs (A)	NA	Not yet recruiting

(A), autologous; NA, not available.

Figure 17. Adapté de Romano et al. 2019. Etudes cliniques de phase I et II évaluant la sécurité et la faisabilité de l'infusion de Treg en transplantation rénale et hépatique.

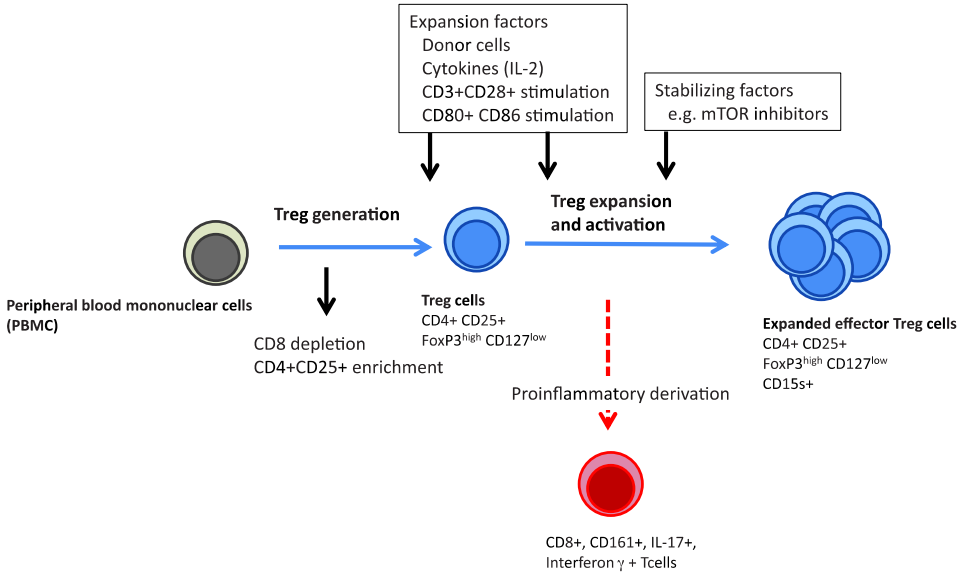


Figure 18. Conti et al. 2016 (cfr Annexe 2.) Expansion in vitro des Tregs

Les cellules dendritiques en transplantation d'organe solide et l'impact de l'immunosuppression sur leur différenciation et leur fonction in vitro.

Le rôle central joué par les cellules dendritiques dans la réaction allo-immune n'est plus à démontrer. La quête de la tolérance immunitaire conduit au développement de différentes stratégies immunosuppressives, notamment l'utilisation de DC tolérogènes. L'infusion de DC tolérogènes est une stratégie thérapeutique prometteuse (Naranjo-Gomes, 2011) [142] qui pourrait être couplée à d'autres stratégies thérapeutiques tels qu'une réduction progressive des inhibiteurs de la calcineurine longtemps après la transplantation ou le passage du CNI aux inhibiteurs de mTOR comme décrit plus haut (revue dans Sanchez Fueyo et al. 2016) [155].
Les études *in vitro* analysant l'effet des inhibiteurs mTOR sur les DCs sont controversées, notamment en raison de la diversité des modèles de cellules dendritiques (Haidinger et al. 2010, He et al. 2019)[136, 156].
Par ce travail de recherche, j'ai pu confirmer certaines données de la littérature et ajouter de nouvelles perspectives.

Premièrement, nous avons confirmé que la rapamycine avait la capacité de moduler la différenciation des moDCs (Macedo et al.2010 ; Haidinger et al. 2010)[128, 157]. Cet effet est lié au rôle majeur joué par la voie mTOR dans la survie et la différenciation des moDCs. En effet, ce dernier processus dépend de l'activation de la voie m-TOR par le GM-CSF. L'importance de la voie mTOR explique le peu d'impact des anti-calcineurines sur la survie et la différenciation moDCs.

Deuxièmement, afin de mieux évaluer l'interaction des DCs avec leur environnement, l'évaluation du profil de sécrétion des cytokines avant et après leur maturation est importante. L'IL-10 est une cytokine clé de la tolérance immunitaire qui agit en bloquant la synthèse de l'IL-12 dans les DCs et en réduisant l'expression des molécules de co-stimulation (Wan et al. 2018 ; Gregori et al. 2010 ; Torres-Aguilar et al.2010) [158-160].
Fait intéressant, la rapamycine n'induit pas un profil de sécrétion cytokinique tolérogène dans les moDCs contrairement à ce qui est observé avec les lymphocytes T. On observe plutôt une réduction globale des cytokines pro- et anti-inflammatoires comme décrit précédemment (Haidinger et al. 2010)[136]. Cela illustre le rôle essentiel joué par m-TOR dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires via la régulation NF-kB et STAT3 (Figure 15).

Dans notre étude, nous n'avons pas démontré de différences significatives entre les Tac-DCs et les CTR-DCS au niveau des marqueurs de surface ni au niveau du profil de sécrétion cytokiniques (IL-10, IL-12p40, TNF-α, TGF-β). Néanmoins, le ratio IL-10 / IL-12 est plutôt en faveur des cytokines pro-tolérogènes. Certaines expériences menées chez la souris suggèrent que les DCs traitées par le tacrolimus pourraient favoriser la suppression des lymphocytes T $CD4^+$ et augmenter la sécrétion d'IL-10 [161].

Bien que les Rapa-DCs présentent un phénotype immature comme observé dans les Tol-DCs, ils n'ont pas les mêmes caractéristiques sécrétoires et fonctionnelles tolérogènes. Contrairement aux Rapa-DCs, les Tol-DCs ont la capacité de générer des lymphocytes T régulateurs. Les Tol-DCs ont une capacité de sécrétion d'IL-10 plus élevée que les Rapa-DC, comme déjà décrit dans d'autres études (Narranjo-Gomes et al. 2011 ; Navarro-Barriuso et al. 2018) [142, 162].

Troisièmement, bien que les modifications phénotypiques et le profil de sécrétion cytokinique des Rapa-DCs et Tac-DCs sont bien définies chez l'homme, il persiste des questions concernant d'autres enzymes et molécules considérées comme pro-tolérogènes, le PD-L1 et l'IDO notamment.

Pour la première fois à notre connaissance, nous avons montré une réduction de l'expression de l'ARNm et de la protéine indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans les Rapa-DCs par rapport aux autres types de moDC. Le métabolisme du tryptophane par l'activité IDO est important dans le développement d'un état tolérogène (Pallotta et al. 2011 ; Belladonna et al. 2003, Brenk et al. 2009) [163-165]. L'expression IDO est principalement induite par les IFN et le LPS. Il agit en appauvrissant en tryptophane le microenvironnement cellulaire, entraînant un blocage de l'activation des lymphocytes T et une promotion des lymphocytes T $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ avec des fonctions suppressives [30]. Étonnamment, nous avons observé ici que la rapamycine n'augmente pas la sécrétion d'IDO dans les cellules dendritiques alors que la sécrétion d'IDO est maintenue dans les Tac-DC.

Différents modèles murins de transplantation d'organe montrent l'importance de IDO dans la tolérance au greffon (Li et al. 2016)[166]. À l'aide d'un modèle *in vitro* de lésions de cellules mésangiales mimant la néphropathie chronique par allogreffe rénale, Liang et al. ont démontré que le tacrolimus, la cyclosporine A et le mycophénolate mofétil (MMF) régulaient positivement l'expression de l'ARNm et de la protéine IDO dans les cellules mésangiales par rapport aux cellules non traitées alors que la rapamycine n'avait aucun effet (Liang et al. 2015) [167].

Dans un modèle murin, Bracho-Sanchez et al. ont récemment rapporté que l'apport exogène d'IDO préservait les fonctions immuno-régulatrices des cellules dendritiques suggérant un rôle potentiellement important d'IDO dans la tolérance immunitaire (Bracho-Sanchez et al. 2015) [168]. L'ajout d'IDO exogène influençait négativement la maturation et positivement la capacité des cellules dendritiques à supprimer la prolifération lymphocytaire T. Dans cette étude, on a également observé un shift de la sécrétion cytokinique vers un état anti-inflammatoire (IL-10 notamment). L'inhibition de mTOR régule à la baisse la voie NFkB et STAT3, permettant d'expliquer cette diminution d'IDO dépendant de ces voies (Barton et al. 2006 ; do Prado et al. 2014)[169, 170].

Dans notre étude, nous avons également observé une expression significativement plus faible de l'ARNm de PD-L1 dans les cellules dendritiques traitées par rapamycine par rapport aux CTR-DCs ou aux cellules dendritiques traitées par tacrolimus. En présence de rapamycine, Haidinger et al. avait précédemment montré une expression en surface réduite de B7-H1 (également connu sous le nom de PD-L1), un ligand PD-1 qui contribue à la régulation négative de l'activation des lymphocytes T [178]. Le traitement par tacrolimus augmente l'expression de l'ARNm de PD-L1 dans les moDCs.

Navarro-Barriuso et al. ont étudié le profil transcriptomique de différents types de cellules dendritiques tolérogènes. Ils ont montré que de nombreuses voies liées à l'inflammation et à la chemotaxie étaient régulées à la baisse dans les cellules dendritiques traitées par la rapamycine contrairement aux cellules dendritiques traitées par la vitamine D3 et par la dexaméthasone (Navarro-Barriuso et al. 2018)[162]. Nos résultats sur l'IDO et le PD-L1 associés aux profils transcriptomiques décrit dans cette étude récente confirme le pouvoir immunosuppresseur important de la rapamycine.

Quatrièmement, nous avons analysé les propriétés fonctionnelles des Tac-DCs et des Rapa-DCs. Les cellules dendritiques immatures et matures sont connues pour induire l'émergence de cellules T régulatrices dans une population de CD4 + in vitro (Probst et al. 2014 ; Turnquist et al. 2013)[138, 171]. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence dans l'induction des Tregs, quelle que soit la condition analysée. Par contre, dans les réactions mixtes leucocytaires, nous avons pu observer une réduction significative de la prolifération des PBMC en présence des Rapa-DCs ou des cellules dendritiques immatures par rapport aux cellules contrôles ou au Tac-DCs.

On peut donc conclure que la rapamycine exerce son effet tolérogène par des changements phénotypiques des moDCs et une réduction globale de leur sécrétion de cytokines plutôt que par une modification du métabolisme du tryptophane ou la sécrétion de cytokines tolérogènes. Bien que le traitement des moDCs par le tacrolimus n'ait pas d'impact sur la prolifération des PBMCs ou des lymphocytes T dans nos expériences, il a été démontré dans d'autres conditions expérimentales que le tacrolimus agissait via une rétention de la drogue dans le cytoplasme. Le tacrolimus est ensuite libéré en continu dans le surnageant de culture et agit via un effet immunosuppresseur indirect sur les lymphocytes T (Orange et al. 2013)[123].
Le tacrolimus est donc un traitement immunosuppresseur qui n'a pas d'influence positive sur les lymphocytes T régulateurs. Son influence sur les cellules dendritiques n'est pas tolérogène sur le plan fonctionnel. Sur le plan de la sécrétion cytokinique, le tacrolimus montre néanmoins un profil plutôt tolérogène alors que le phénotype cellulaire n'est pas modifié par rapport aux cellules dendritiques matures non traitées.

Perspectives

Notre étude permet donc de mieux appréhender les effets des immunosuppresseurs utilisés classiquement en transplantation. Elle ouvre des questionnements quant à l'utilisation de la rapamycine qui semblent plus intéressante à administrer directement au patient plutôt que via un pré-conditionnement des cellules dendritiques. Les perspectives amenées par ce travail sont le développement de stratégies immunosuppressives permettant d'atteindre la tolérance opérationnelle ou du moins la réduction de l'immunosuppression.

Les nombreuses études décrites dans l'introduction de ce travail pour essayer de trouver le profil tolérogène le plus efficace et le plus stable mènent à des modèles de thérapie cellulaire. Suite à leur dualité de fonction, les cellules dendritiques ont été utilisées comme thérapie cellulaires dans diverses pathologies comme les infections, la thérapie anti-cancéreuse, les allergies, les pathologies auto-immune et plus récemment la transplantation d'organes solides.

En transplantation d'organe, l'idée est d'induire une tolérance immunitaire via des thérapies cellulaires. Cela permettrait de réduire au maximum la prise d'immunosuppresseurs et de diminuer les effets secondaires ce ces derniers. Les modèles sont actuellement encore expérimentaux, en voie d'être utilisés en étude de phase II clinique.

Dans des modèles murins, Lutz et al. ont montré que les cellules dendritiques tolérogènes développées à partir de faibles doses de GM-CSF seul et infusées ensuite 7 jours avant la

transplantation, permettait d'obtenir une survie prolongée du greffon cardiaque (Lutz et al. 2000)[172]. Selon le même modèle d'étude, Taner et al. ont montré que l'infusion de cellules dendritiques traitées par la rapamycine et pré-conditionnées par des allo-antigènes prolongeait également la survie des greffons cardiaques (Taner et al. 2005)[173].

Dans des modèles de greffe de rein chez des primates, rhesus macaques, il a été démontré que les cellules dendritiques du donneur pré-conditionnées avec la vitamine D et IL-10 et infusées avec des Ac CTLA-4 (Abatacept) associé à un traitement par rapamycine prolongeait significativement la survie des greffons rénaux chez les singes (Ezzelarab et al. 2013)[174].

Dans un modèle de greffe hépatique chez le rat, l'infusion de cellules dendritiques immatures suivie par un traitement par la rapamycine permettait une augmentation des Tregs circulants et prolongeait la survie des rats (Wang et al. 2012)[175].

Avec les avancées des connaissances dans ce domaine de thérapie cellulaire en transplantation, des études cliniques sont réalisées pour vérifier la sécurité et standardiser les techniques. « The ONE study » est un exemple de projet coopératif entre plusieurs centres de transplantations étudiant plusieurs produits cellulaires potentiellement immunorégulateurs, permettant une comparaison directe de la faisabilité clinique entre plusieurs types de cellules régulatrices. Le but est de développer, selon les bonnes pratiques, des populations de cellules dérivées de cellules hématopoïétiques tolérogènes et de les utiliser dans des études cliniques de transplantation rénale par donation vivante (Geissler et al. 2012)[176]. Ce large projet implique des scientifiques de France, d'Italie, d'Allemagne, du Royaume Uni et des États-Unis. Les cellules utilisées sont des lymphocytes T régulateurs, de cellules dendritiques tolérogènes et des cellules suppressives d'origine myéloïde.

La sécurité et la faisabilité clinique ayant été prouvée, « the TWO study » (ISRCTN11038572) évalue l'efficacité clinique de la thérapie cellulaire par les Tregs, permettant une diminution du nombre d'immunosuppresseurs chez les patients transplantés du rein.
En transplantation hépatique par donation vivante, l'infusion de cellules dendritiques régulatrices est un traitement d'induction prometteur. Comme décrit précédemment, le foie est un organe privilégié. L'équipe de Pittsburgh (USA) a lancé un essai clinique de phase I/II afin d'analyser la sécurité et l'efficacité d'une infusion de cellules dendritiques régulatrices dérivées du donneur chez des patients transplantés pour la première fois du foie, sans traitement inducteur. Les cellules dendritiques régulatrices seront générées en présence de vitamine D3 et

d'IL-10 à partir de monocytes via des cytaphérèses. L'infusion se fera 7 jours avant la transplantation. Les receveurs auront un programme de réduction progressive de l'immunosuppression entre 6 et 18 mois post-greffe (Thomson et al. 2018) [177].

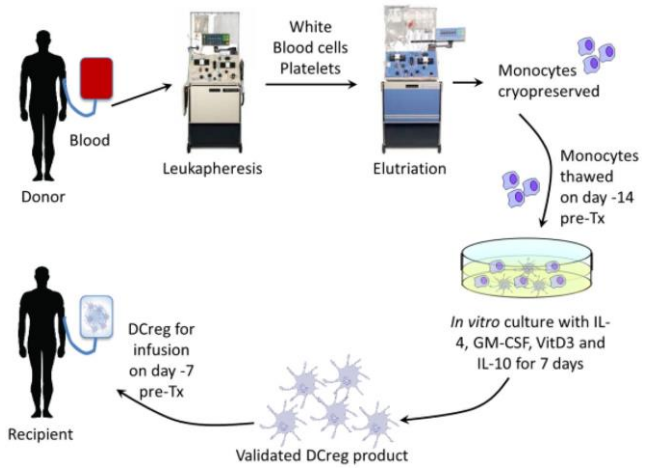


Figure 19. Adapté de Thomson et al. Génération de cellules dendritiques régulatrices dérivées du donneur pour infusion chez un receveur hépatique.

Enfin, d'autres techniques existent afin de minimiser les effets secondaires des immunosuppresseurs. Citons notamment les nanoparticules chargées de molécules immunosuppressives, développées dans le but d'améliorer la biodisponibilité de ces médications, d'obtenir une biodistribution spécifique et réduire la toxicité systémique. Cette technique permet également de protéger les molécules des dégradations enzymatiques et de délivrer plusieurs molécules au même endroit avec des doses plus faibles et espacées (Ochando et al. 2017 et 2019 ; Kishimoto et al. 2018)[47, 178].

Une dernière technique à aborder en lien avec les cellules dendritiques pour induire une tolérance immunitaire sont les exosomes dérivées des cellules dendritiques. Les exosomes sont des nanovésicules membranaires, avec une forme et une taille uniforme, produites par une variété de cellules, notamment les cellules dendritiques, les lymphocytes T, B et les macrophages. Des études récentes ont montré que les exosomes agissaient comme transporteurs de molécules entre cellules. Ces exosomes exposent à leur surface des molécules reflétant leur cellule d'origine et l'état d'activation de ces cellules. Des exosomes de différentes origines ont été étudiées, essentiellement dans des modèles murins (Review dans Ochando et al. 2019).

Conclusions

Les deux études menées durant mon travail de recherche mettent en lumière des données intéressantes *in vivo* et *in vitro* sur le rôle de la rapamycine et du tacrolimus dans la réaction allo-immune après transplantation d'organe solide.

Nous pouvons conclure premièrement que la rapamycine a un effet tolérogène principalement secondaire à l'induction de Tregs, ce qui est potentiellement bénéfique pour induire de façon prolongée une tolérance envers un greffon.

Deuxièmement, l'inhibition de mTOR dans les cellules dendritiques dérivées des monocytes mène à des modifications phénotypiques donnant à la cellule un profil tolérogène. Malgré ce phénotype immature, les autres caractéristiques tolérogènes ne sont pas retrouvées. Le profil cytokinique pro-inflammatoire et l'inhibition d'IDO mettent en lumière l'effet anti-tumoral potentiel des inhibiteurs mTOR. Cette dualité permet de mieux comprendre les bénéfices de ces molécules particulières par rapport aux autres immunosuppresseurs.

Une connaissance approfondie des acteurs de la réaction allo-immune et de l'effet des immunosuppresseurs sur ces derniers permet de mieux appréhender les futures directions à prendre pour peut-être atteindre un jour la tolérance opérationnelle en transplantation d'organe solide.

Table des illustrations

Figure 1. Le système immunitaire dresse la scène du phénomène de rejet. Le prélèvement d'organe et la transplantation entraine des lésions sur le greffons. Les molécules produites par ces dommages cellulaires dans l'allogreffe, connues comme les DAMPS pour damage-associated molecular patterns sont reconnu par des récepteurs spécifiques exprimés sur les cellules immunitaires innées du receveur activant la réaction immunitaire. Les lymphocytes activés ouvre la voie à la cascade inflammatoire via des médiateurs inflammatoires, des cytokines, des chemokines attirant d'autres leucocytes. La cascade du complément est également activée avec le relargage de molécules vasoactives pouvant causer des lésions supplémentaires sur le greffon (Wood et al. 2012)…… 10

Figure 2 : Reconnaissance directe, semi-directe et indirecte dans la réaction allo-immune (adapté de Wood et al. 2012)……....12

Figure 3. A. Présentation d'antigène viral internalisé par une cellule dendritique aux lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ via une molécule MHC de classe 2 et de classe 1 respectivement, permettant une activation de la réponse $CD8^+$ cytotoxique plus efficace. B. En cas de transplantation on observe la formation similaire d'un cluster de trois cellules avec présentation par la cellule dendritique du donneur d'une molécule MHC de classe 2 et 1 intacte aux lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ respectivement. C. Activation d'un $CD4^+$ par la voie indirecte et activation par la voie directe d'un lymphocyte $CD8^+$ simultanément. D. Activation par la voie semi-directe d'un lymphocyte $CD8^+$ en présence d'une activation indirecte d'un lymphocyte $CD4^+$(Adapté de Siu et al. 2018)……..……..14

Figure 4. Représentation schématique de la physiopathologie du rejet cellulaire humoral. AMR, antibody-mediated rejection; Conv, convertase; IV, intravenous; MAC, membrane attack complex; MHC, major histocompatibility complex; mTOR, mammalian target of rapamycin; NK, natural killer. Les thérapies à notre disposition sont en rouge. (Adapté de Pouliquen et al. 2015)……..……...16

Figure 5. L'activation des TLRs par les DAMPs entraine le relargage d'IL12 et l'activation des lymphocyte T naïfs ainsi que des cellules NK. (Adapté de Wood et al. 2012.)……18

Figure 6. Mécanismes de tolérance cellulaire T périphériques. A. Réponse cellulaire T normale. B. Les mécanismes impliqués sont l'anergie, la suppression et la délétion. L'anergie est l'absence de stimulation du lymphocyte T après contact avec l'APC. La suppression peut survenir en l'absence de co-stimulation ou en présence d'un récepteur inhibiteur comme CTLA-4 ou PD-1. Les lymphocytes T régulateurs sont générés par reconnaissance d'auto-antigènes dans le thymus et d'antigène dans les organes lymphoïdes périphériques……19

Figure 7. Adapté de Safinia et al. 2015. Mécanismes de suppression par les Tregs A. Perturbation des voies enzymatiques. L'ectoenzyme CD39 utilise l'ATP qu'il transforme en AMP et adénosine. On observe des taux intracellulaires d'AMP cyclique importants. L'AMPcyclique est transféré vers les lymphocytes T effecteurs avec comme effet un régulation de ICER, une inhibition de NFAT et un défaut de transcription d'IL-2 entrainant une mort par apoptose des lymphocytes T par déprivation d'IL-2. B. Modulation des fonctions des APC. Le CTLA-4 des Tregs se lie au CD80/86 des APC avec un signal de contrôle négatif vers le lymphocyte T. C. Production de cytokines anti-inflammatoires. Induction d'apoptose par le

granzyme A/B et la perforine, TRAIL, la voie Fas/Fas-Ligand et la voie Galectin-9/TIM3. *Abréviations : APC, antigen presenting cell; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CD, cluster differentiation; CTLA-4-cytotoxic T lymphocyte antigen-4; DC, dendritic cells; ICER, inducible cAMP early repressor, IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase IL, interleukin; NFAT, nuclear factor of activated T cells; TGF-β, transforming growth factor-β; TIM-3, T cell immunoglobulin and mucin domain-3; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand; Treg, regulatory T cells*…….……... 22

Figure 8. Les Bregs empêchent la différenciation et la fonction de cellules proinflammatoires comme les lymphocytes T CD 4^+ auxiliaires, Th17 et les lymphocytes T $CD8^+$. Ils promeuvent la différenciation des cellules anti-inflammatoires, Treg et Tr1 via la production de cytokines IL-10, IL-35 et TGF-β……...…24

Figure 9. Adapté de Ochando et al. 2019. Facteurs promouvant la génération de cellules dendritiques tolérogènes, leur phénotype, les produits qui régulent la réponse allo-immune et promeuvent la tolérance du greffon. ……26

Figure 10 : Cibles thérapeutiques des immunosuppresseurs utilisés en transplantation d'organes solides.(adapté de Wood and Goto 2012[1])……..……..28

Figure 11. Le 6-mercaptopurine et l'acide mycophénolique bloquent l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) de la voie de synthèse de novo des bases puriques. Les lymphocytes n'ayant pas la voie de sauvetage tout comme les cellules intestinales voient donc leur synthèse des purines tout à fait bloquée, limitant la prolifération cellulaire (Transplantation of the liver, Ronald Busuttil 2015)……31

Figure 12 : La voie mTOR est un senseur essentiel de l'homéostasie cellulaire intégrant des informations intra- et extra-cellulaires. La compréhension des événements en amont et en aval de mTOR permettent d'appréhender les effets secondaires et les effets potentiellement bénéfiques des inhibiteurs mTOR. *Akt : protéine kinase B ; ATP : adénosine trophosphate ; EIF-4^E-BP1, eukaryotic translation initiation factor E4 binding protein ; GβL, G-protein beta-subunit-like ; IGF, insulin growth factor ; mRNA, ARN messager ; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1 ; mTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2 ; p13-K, posphoinositide kinsae 3 ; p70 S6K1, ribosomal protein S6 kinase ; PTEN, homologues phosphatase et tensine*……...32

Figure 13. Structure chimique du sirolimus et de l'everolimus……33

Figure 14. Rôle de mTOR dans la différenciation des lymphocytes T auxiliaires et régulateur ; Un activité importante de mTOR favorise les lymphocytes T CD4 auxiliaires effecteurs. Un blocage du signal prévient la génération de ces lymphocytes T effecteurs pour favoriser l'apparition de lymphocytes T régulateurs……40

Figure 15 : Adapté de Weichhart et al. 2015. a. Le récepteur TLR 4 régule la sécrétion d'IL-10 et d'IL-12 d'une manière complexe à partir de mTORC1 et mTORC2. La voie Akt-mTORC1 régule positivement l'expression d'IL-10,via SAT3, MAF et CREB. mTORC1 diminue l'activité de NF-κB et l'expression d'IL-12. mTORC2 régule également négativement la production d'IL-12 via une voie Akt-dépendante par l'inactivation de forkheadbox O1 (FOXO1). c. Le LPS active mTORC1 et inhibe la transcription du MHC classe II ; promeut

l'expression du PD-L1 qui limite l'activation des lymphocytes T. Il régule positivement le CCL2 et inhibe le CCR7……..……..47

Figure 16. Haidinger et al. ont démontré un effet différent de la rapamycine en fonction du type de cellule dendritique, mettant en évidence un effet stimulant du NF-kB et inhibiteur du STAT3 dans les cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) mais une effet inhibiteur tant sur NFkB que STAT3 sur les moDCs. Ceci explique un profil plutôt pro-inflammatoire des mDCs traités par Rapamycin et anti-inflammatoire tolérogène des moDCs.……48

Figure 17. Adapté de Romano et al. 2019. Etudes cliniques de phase I et II évaluant la sécurité et la faisabilité de l'infusion de Treg en transplantation rénale et hépatique……110

Figure 18. Conti et al. 2016 (cfr Annexe 2.) Expansion in vitro des Tregs……..110

Figure 19. Adapté de Thomson et al. Génération de cellules dendritiques régulatrices dérivées du donneur pour infusion chez un receveur hépatique…….……116

Table des tableaux

Tableau 1. Types de cellules dendritiques rencontrées chez l'homme, phénotypes, localisation et fonction……17

Tableau 2. Cellules immunorégulatrices, marqueurs cellulaires et fonctions immunomodulatrices (adapté de Zeng et al. 2020)[25]……20

Tableau 3. Effet de la rapamycine sur les cellules dendritiques (adapté Macedo et al. 2012)[128]……45

Résumé :

La transplantation est le traitement de choix pour les dysfonctions terminales d'organes solides. Elle permet d'améliorer la qualité de vie et l'espérance de vie des patients. L'espérance de vie des patients à 10 ans n'a plus été modifiée depuis plusieurs décennies en raison des techniques chirurgicales déjà à la pointe et de soins péri-opératoires bien standardisés. La perte des greffons à dix ans est essentiellement d'origine immunologique et les décès des patients sont secondaires aux complications liées aux immunosuppresseurs essentiellement oncologiques et cardio-vasculaires.

Dans ce contexte, il est important de définir des protocoles favorisant la tolérance opérationnelle ou permettant du moins de réduire au maximum l'immunosuppression classique par les inhibiteurs de calcineurines.

Le présent travail a étudié d'une part le taux de lymphocytes T régulateurs chez des patients greffés hépatiques, randomisés à un mois de la transplantation vers un traitement immunosuppresseur basé soit sur les anti-calcineurines soit sur les inhibiteurs mTOR. Notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois dans une étude randomisée chez des patients transplantés du foie, une majoration significative des taux de lymphocytes T régulateurs circulants dans le groupe traité par les inhibiteurs mTOR. Cela conforte les données déjà connues de la littérature.

La deuxième partie du présent travail a permis d'étudier l'influence de la rapamycine et du tacrolimus sur la différenciation et la maturation d'un modèle de cellules dendritiques dérivées de monocytes *in vitro*. Les résultats confirment les données connues de la littérature sur le plan phénotypique. On observe une diminution significative des molécules de co-stimulation CD80/CD86 à la surface des cellules traitées par la rapamycine alors qu'il n'y a pas de modification significative chez les cellules traitées par le tacrolimus. Sur le plan de la sécrétion cytokinique, on observe une diminution globale de la sécrétion des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans les cellules traitées par la rapamycine, la balance étant vers les cytokines anti-inflammatoires chez les cellules traitées par le tacrolimus. Nous avons mis évidence pour la première fois un effet négatif de la rapamycine sur l'expression et la synthèse d'indoleamine-2,3dioxygénase en comparaison au cellules traitées par le tacrolimus et aux cellules contrôles.

L'ensemble de ces résultats fait de la rapamycine une molécule intéressante avec des effets pro-tolérogènes d'une part et anti-cancéreux d'autre part. Cette dualité permet de mieux comprendre les bénéfices de ces molécules particulières par rapport aux autres immunosuppresseurs.

Mots clés : [transplantation; tolérance; cellules dendritiques; lymphocytes T régulateurs ; IDO ; thérapie cellulaire]

[Impact of immunosuppressants on regulatory T cells et dendritic cells in solid organ transplantation]

Abstract :

Transplantation is the treatment of choice for terminal organ dysfunction. It improves the quality of life and the life expectancy of patients. The life expectancy of patients at 10 years has not changed for several decades due to already advanced surgical techniques and well standardized perioperative care. The loss of grafts at ten years is mainly of immunological origin and the patients'losses are secondary to the complications related to the immunosuppression, essentially oncological and cardiovascular.

In this context, it is important to define protocols promoting operational tolerance or at least to be able to minimize classical immunosuppression by calcineurin inhibitors.

The present work firstly studied the level of regulatory T cells in liver transplant patients, randomized in two arms, one month post-transplantation, an immunosuppressive treatment based either on anti-calcineurins or on mTOR inhibitors. For the first time in a randomized study in liver transplant patients our study made it possible to demonstrate a significant increase in the levels of circulating regulatory T cells in the group treated with mTOR inhibitors. This confirms the data already known from the literature.

The second part of this work investigated the influence of rapamycin and tacrolimus on the differentiation and maturation of a dendritic cell model derived from monocytes in vitro. The results confirm the data known from the literature on the phenotypic level. There is a significant decrease in the CD80 / CD86 co-stimulation molecules on the surface of cells treated with rapamycin while there is no significant modification in cells treated with tacrolimus. In terms of cytokine secretion, there is an overall decrease in the secretion of pro and anti-inflammatory cytokines in cells treated with rapamycin, the balance being towards anti-inflammatory cytokines in cells treated with tacrolimus. We have shown for the first time a negative effect of

rapamycin on the expression and synthesis of indoleamine-2,3dioxygenase compared to cells treated with tacrolimus and control cells.
All of these results make rapamycin an interesting molecule with pro-tolerogenic effects on the one hand and anti-cancer effects on the other. This duality allows us to better understand the benefits of the mTOR inhibitors compared to other immunosuppressants.

Keywords : [liver transplantation; immune tolerance; dendritic cells; regulatory T cells ; IDO; cellular therapy]

Bibliographie

1. Wood, K.J. and R. Goto, *Mechanisms of Rejection: Current Perspectives.* Transplantation, 2012. **93**(1): p. 1-10.
2. Zubler, R.H. and A.L. Glasebrook, *Requirement for three signals in "T-independent" (lipopolysaccharide-induced) as well as in T-dependent B cell responses.* The Journal of Experimental Medicine, 1982. **155**(3): p. 666-680.
3. Kupiec-Weglinski, J.W., et al., *Restoration of allograft responsiveness in B rats: IV. The divergent migratory behavior of lymphocyte populations mediating cardiac allograft rejection.* Cellular Immunology, 1984. **85**(2): p. 459-476.
4. Adorini, L. and Z. Nagy, *Inhibition of T Cell Activation by MHC Blockade.* International Reviews of Immunology, 1990. **6**(1): p. 23-35.
5. Snell, G.D., *T Cells, T Cell Recognition Structures, and the Major Histocompatibility Complex.* Immunological Reviews, 1978. **38**(1): p. 3-69.
6. Siu, J.H.Y., et al., *T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation.* Frontiers in Immunology, 2018. **9**(2548).
7. Ali, Jason M., et al., *Diversity of the CD4 T Cell Alloresponse: The Short and the Long of It.* Cell Reports, 2016. **14**(5): p. 1232-1245.
8. Lee, R.S., et al., *Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(6): p. 3276-3281.
9. Hornick Philip, I., et al., *Significant Frequencies of T Cells With Indirect Anti-Donor Specificity in Heart Graft Recipients With Chronic Rejection.* Circulation, 2000. **101**(20): p. 2405-2410.
10. Baker, R.J., et al., *Loss of Direct and Maintenance of Indirect Alloresponses in Renal Allograft Recipients: Implications for the Pathogenesis of Chronic Allograft Nephropathy.* The Journal of Immunology, 2001. **167**(12): p. 7199-7206.
11. Reznik, S.I., et al., *Indirect Allorecognition of Mismatched Donor HLA Class II Peptides in Lung Transplant Recipients with Bronchiolitis Obliterans Syndrome.* American Journal of Transplantation, 2001. **1**(3): p. 228-235.
12. Chong, A.S., *New insights into the development of B cell responses: Implications for solid organ transplantation.* Human Immunology, 2019. **80**(6): p. 378-384.
13. Torija, A., et al., *Novel insights into the pathobiology of humoral alloimmune memory in kidney transplantation.* Current Opinion in Organ Transplantation, 2020. **25**(1): p. 15-21.
14. Del Bello, A., et al., *Outcome of Liver Transplant Patients With Preformed Donor-Specific Anti–Human Leukocyte Antigen Antibodies.* Liver Transplantation. **n/a**(n/a).
15. Simpson, M.A., *Liver Transplant Graft Histology, Cellular Infiltrates, and Peripheral Donor Specific Antibodies (DSA): Independent Observations or Interrelated Effectors?* Transplantation, 9000. **Online First**.
16. Heesters, B.A., et al., *Antigen Presentation to B Cells.* Trends in Immunology, 2016. **37**(12): p. 844-854.
17. Hirohashi, T., et al., *A Novel Pathway of Chronic Allograft Rejection Mediated by NK Cells and Alloantibody.* American Journal of Transplantation, 2012. **12**(2): p. 313-321.
18. Chesneau, M., et al., *Regulatory B cells and tolerance in transplantation: from animal models to human.* Front Immunol, 2013. **4**: p. 497.
19. Dai, H., A.W. Thomson, and N.M. Rogers, *Dendritic Cells as Sensors, Mediators, and Regulators of Ischemic Injury.* Frontiers in Immunology, 2019. **10**(2418).
20. Ochando, J., et al., *The innate immune response to allotransplants: mechanisms and therapeutic potentials.* Cellular & Molecular Immunology, 2019. **16**(4): p. 350-356.
21. Grafals, M. and J.M. Thurman, *The Role of Complement in Organ Transplantation.* Frontiers in Immunology, 2019. **10**(2380).
22. Calne, R.Y., et al., *Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts.* Nature, 1969. **223**(5205): p. 472-476.

23. Feng, S., et al., *Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants.* JAMA, 2012. **307**(3): p. 283-93.
24. Abrol, N., C.C. Jadlowiec, and T. Taner, *Revisiting the liver's role in transplant alloimmunity.* World J Gastroenterol, 2019. **25**(25): p. 3123-3135.
25. Zeng, S., et al., *Strategies to achieve immune tolerance in allogeneic solid organ transplantation.* Transplant Immunology, 2020. **58**: p. 101250.
26. Levitsky, J., et al., *Immunosuppression withdrawal in liver transplant recipients on sirolimus.* Hepatology, 2019. **n/a**(n/a).
27. Mastoridis, S., M. Martínez-Llordella, and A. Sanchez-Fueyo, *Biomarkers and immunopathology of tolerance.* Current opinion in organ transplantation, 2016. **21**(1): p. 81-87.
28. Taubert, R., et al., *Hepatic Infiltrates in Operational Tolerant Patients After Liver Transplantation Show Enrichment of Regulatory T Cells Before Proinflammatory Genes Are Downregulated.* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2016. **16**(4): p. 1285-1293.
29. Lozano, J.J., et al., *Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients.* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2011. **11**(9): p. 1916-1926.
30. Vignali, D.A.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work.* Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(7): p. 523-532.
31. Sharma, A. and D. Rudra, *Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis.* Frontiers in Immunology, 2018. **9**(883).
32. Wang, J., et al., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells.* European Journal of Immunology, 2007. **37**(1): p. 129-138.
33. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells.* The Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(7): p. 1701-1711.
34. Safinia, N., et al., *Regulatory T Cells: Serious Contenders in the Promise for Immunological Tolerance in Transplantation.* Frontiers in Immunology, 2015. **6**(438).
35. Caramalho, Í., et al., *Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus.* Frontiers in Immunology, 2015. **6**(395).
36. Romano, M., et al., *Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity.* Frontiers in Immunology, 2019. **10**(43).
37. Huang, W., et al., *Beyond Type 1 Regulatory T Cells: Co-expression of LAG3 and CD49b in IL-10-Producing T Cell Lineages.* Frontiers in Immunology, 2018. **9**(2625).
38. Gregori, S. and M.G. Roncarolo, *Engineered T Regulatory Type 1 Cells for Clinical Application.* Frontiers in Immunology, 2018. **9**(233).
39. Wortel, C.M. and S. Heidt, *Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation.* Transplant Immunology, 2017. **41**: p. 1-9.
40. Kimura, S., et al., *Regulatory B cells require antigen recognition for effective allograft tolerance induction.* American Journal of Transplantation, 2019. **n/a**(n/a).
41. Lee, K.M., et al., *Anti-CD45RB/Anti-TIM-1-Induced Tolerance Requires Regulatory B Cells.* American Journal of Transplantation, 2012. **12**(8): p. 2072-2078.
42. Clatworthy, M.R., et al., *B-Cell–Depleting Induction Therapy and Acute Cellular Rejection.* New England Journal of Medicine, 2009. **360**(25): p. 2683-2685.
43. Cherukuri, A., et al., *Immunologic Human Renal Allograft Injury Associates with an Altered IL-10/TNF-α Expression Ratio in Regulatory B Cells.* Journal of the American Society of Nephrology, 2014. **25**(7): p. 1575.
44. Rosen, S.J., P.E. Harris, and M.A. Hardy, *State of the Art: Role of the Dendritic Cell in Induction of Allograft Tolerance.* Transplantation, 2018. **102**(10): p. 1603-1613.
45. Obregon, C., et al., *Update on Dendritic Cell-Induced Immunological and Clinical Tolerance.* Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 1514-1514.

46. Moreau, A., et al., *Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation.* Transplantation research, 2012. **1**(1): p. 13-13.
47. Ochando, J., et al., *Tolerogenic dendritic cells in organ transplantation.* Transplant International, 2019. **n/a**(n/a).
48. Liu, Q., et al., *Donor dendritic cell–derived exosomes promote allograft-targeting immune response.* The Journal of Clinical Investigation, 2016. **126**(8): p. 2805-2820.
49. Pêche, H., et al., *Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection1.* Transplantation, 2003. **76**(10): p. 1503-1510.
50. Calne, R.Y., et al., *CYCLOSPORIN A IN PATIENTS RECEIVING RENAL ALLOGRAFTS FROM CADAVER DONORS.* The Lancet, 1978. **312**(8104): p. 1323-1327.
51. Starzl, T.E., et al., *Liver Transplantation with Use of Cyclosporin a and Prednisone.* New England Journal of Medicine, 1981. **305**(5): p. 266-269.
52. Fahr, A., *Cyclosporin Clinical Pharmacokinetics.* Clinical Pharmacokinetics, 1993. **24**(6): p. 472-495.
53. Faulds, D., K.L. Goa, and P. Benfield, *Cyclosporin.* Drugs, 1993. **45**(6): p. 953-1040.
54. Kino, T., et al., *FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro.* J Antibiot (Tokyo), 1987. **40**(9): p. 1256-65.
55. Starzl, T., et al., *FK 506 FOR LIVER, KIDNEY, AND PANCREAS TRANSPLANTATION.* The Lancet, 1989. **334**(8670): p. 1000-1004.
56. Danguilan, R.A., A. Lamban, and G.E.P. Pamugas, *Pilot Study Comparing the Efficacy, Safety, Convertibility, and Tacrolimus Trough Levels of Twice-Daily Tacrolimus (Prograf) to Once-Daily Tacrolimus (Advagraf) Among Standard-Risk Kidney Transplant Patients at the National Kidney and Transplant Institute.* Transplantation Proceedings, 2019. **51**(8): p. 2615-2619.
57. Cassuto, E., et al., *Adherence to and Acceptance of Once-Daily Tacrolimus After Kidney and Liver Transplant: Results From OSIRIS, a French Observational Study.* Transplantation, 2016. **100**(10): p. 2099-2106.
58. Bardsley-Elliot, A., S. Noble, and R.H. Foster, *Mycophenolate Mofetil.* BioDrugs, 1999. **12**(5): p. 363-410.
59. Coelho, T., M. Tredger, and A. Dhawan, *Current status of immunosuppressive agents for solid organ transplantation in children.* Pediatric Transplantation, 2012. **16**(2): p. 106-122.
60. Dancey, J.E., *Clinical development of mammalian target of rapamycin inhibitors.* Hematology/Oncology Clinics of North America, 2002. **16**(5): p. 1101-1114.
61. Powell, J.D., C.G. Lerner, and R.H. Schwartz, *Inhibition of Cell Cycle Progression by Rapamycin Induces T Cell Clonal Anergy Even in the Presence of Costimulation.* The Journal of Immunology, 1999. **162**(5): p. 2775.
62. Klawitter, J., B. Nashan, and U. Christians, *Everolimus and sirolimus in transplantation-related but different.* Expert Opinion on Drug Safety, 2015. **14**(7): p. 1055-1070.
63. Manito, N., et al., *Clinical recommendations for the use of everolimus in heart transplantation.* Transplantation Reviews, 2010. **24**(3): p. 129-142.
64. Yost, S.E., R. Byrne, and B. Kaplan, *mTOR inhibition in kidney transplant recipients.* Nature Reviews Nephrology, 2011. **7**(10): p. 553-555.
65. Saliba, F., et al., *Efficacy and Safety of Everolimus and Mycophenolic Acid With Early Tacrolimus Withdrawal After Liver Transplantation: A Multicenter Randomized Trial.* American Journal of Transplantation, 2017. **17**(7): p. 1843-1852.
66. Levitsky, J., et al., *Immunosuppression withdrawal in liver transplant recipients on sirolimus.* Hepatology. **n/a**(n/a).
67. Vilar, E., J. Perez-Garcia, and J. Tabernero, *Pushing the Envelope in the mTOR Pathway: The Second Generation of Inhibitors.* Molecular Cancer Therapeutics, 2011. **10**(3): p. 395.
68. Moro, J.A., et al., *Tolerance Profile of the Proliferation Signal Inhibitors Everolimus and Sirolimus in Heart Transplantation.* Transplantation Proceedings, 2008. **40**(9): p. 3034-3036.
69. Starzl, T.E., et al., *A trial with heterologous antilymphocyte globulin in man.* Transplantation proceedings, 1969. **1**(1): p. 448-454.

70. Kashiwagi, N., et al., *Clinical reactions and serologic changes after the administration of heterologous antilymphocyte globulin to human recipients of renal homografts.* Annals of internal medicine, 1968. **68**(2): p. 275-286.
71. Préville, X., et al., *Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model.* Transplantation, 2001. **71**(3): p. 460-468.
72. Gaber, A.O., et al., *Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin): 25 years and new frontiers in solid organ transplantation and haematology.* Drugs, 2010. **70**(6): p. 691-732.
73. Guirado, L., *Does Rabbit Antithymocyte Globulin (Thymoglobuline®) Have a Role in Avoiding Delayed Graft Function in the Modern Era of Kidney Transplantation?* Journal of transplantation, 2018. **2018**: p. 4524837-4524837.
74. Iesari, S., et al., *Tacrolimus and Single Intraoperative High-dose of Anti-T-lymphocyte Globulins Versus Tacrolimus Monotherapy in Adult Liver Transplantation: One-year Results of an Investigator-driven Randomized Controlled Trial.* Annals of surgery, 2018. **268**(5): p. 776-783.
75. Reichart, D., H. Reichenspurner, and M.J. Barten, *Renal protection strategies after heart transplantation.* Clinical Transplantation, 2018. **32**(1): p. e13157.
76. Mohty, M., et al., *New directions for rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin(®)) in solid organ transplants, stem cell transplants and autoimmunity.* Drugs, 2014. **74**(14): p. 1605-1634.
77. Vondran, F.W.R., et al., *Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation.* Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation, 2010. **23**(5): p. 514-523.
78. de Ataide, E.C., et al., *Immunomodulation, Acute Renal Failure, and Complications of Basiliximab Use After Liver Transplantation: Analysis of 114 Patients and Literature Review.* Transplantation proceedings, 2017. **49**(4): p. 852-857.
79. Rostaing, L., et al., *Review article: use of induction therapy in liver transplantation.* Transplantation reviews (Orlando, Fla.), 2012. **26**(4): p. 246-260.
80. Klintmalm, G.B., et al., *Belatacept-based immunosuppression in de novo liver transplant recipients: 1-year experience from a phase II randomized study.* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2014. **14**(8): p. 1817-1827.
81. Vincenti, F., et al., *A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study).* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2010. **10**(3): p. 535-546.
82. Perez, C.P., et al., *Belatacept in Solid Organ Transplant: Review of Current Literature Across Transplant Types.* Transplantation, 2018. **102**(9): p. 1440-1452.
83. Demirkiran, A., et al., *Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation.* Liver Transplantation, 2006. **12**(2): p. 277-284.
84. He, Q., et al., *Decreased Circulating CD4+CD25highFoxp3+ T Cells During Acute Rejection in Liver Transplant Patients.* Transplantation Proceedings, 2011. **43**(5): p. 1696-1700.
85. Martinez-Llordella, M., et al., *Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation.* Am J Transplant, 2007. **7**(2): p. 309-19.
86. Akl, A., et al., *An investigation to assess the potential of CD25highCD4+ T cells to regulate responses to donor alloantigens in clinically stable renal transplant recipients.* Transpl Int, 2008. **21**(1): p. 65-73.
87. Herrera-Gómez, F., et al., *The number of FoxP3 regulatory T cells in the circulation may be a predictive biomarker for kidney transplant recipients: A multistage systematic review.* International Immunopharmacology, 2018. **65**: p. 483-492.
88. Ius, F., et al., *Increased frequency of CD4+CD25highCD127low T cells early after lung transplant is associated with improved graft survival.* Transplant International, 2020. **n/a**(n/a).
89. Meloni, F., et al., *Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome.* Transplantation, 2004. **77**(5): p. 762-766.

90. Choi, D.-H., et al., *The ratio of circulating regulatory cluster of differentiation 4 T cells to endothelial progenitor cells predicts clinically significant acute rejection after heart transplantation.* The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2018. **37**(4): p. 496-502.
91. Roldán, C., et al., *CD4+CD45RO+CD25-/lowCD127+: CD4+CD45RO+CD25hiCD127-/low Ratio in Peripheral Blood: A Useful Biomarker to Detect Cardiac Allograft Vasculopathy in Heart Transplanted Patients.* Transplantation, 2015. **99**(7): p. 1521-1528.
92. Zeiser, R., et al., *Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production.* Blood, 2006. **108**(1): p. 390-399.
93. Kawai, M., et al., *Inhibitory and Stimulatory Effects of Cyclosporine A on the Development of Regulatory T Cells In Vivo.* Transplantation, 2005. **79**(9): p. 1073-1077.
94. Miroux, C., et al., *Corticosteroids Do Not Reverse the Inhibitory Effect of Cyclosporine on Regulatory T-Cell Activity in Contrast to Mycophenolate Mofetil.* Transplantation Proceedings, 2012. **44**(9): p. 2834-2839.
95. Zhao, T., et al., *Comparison of Regulatory T Cells and FoxP3-Positive T-Cell Subsets in the Peripheral Blood of Renal Transplant Recipients With Sirolimus Versus Cyclosporine: A Preliminary Study.* Transplantation Proceedings, 2013. **45**(1): p. 148-152.
96. van de Wetering, J., et al., *Discontinuation of calcineurin inhibitors treatment allows the development of FOXP3+ regulatory T-cells in patients after kidney transplantation.* Clinical Transplantation, 2011. **25**(1): p. 40-46.
97. San Segundo, D., et al., *Reduced Numbers of Blood Natural Regulatory T Cells in Stable Liver Transplant Recipients With High Levels of Calcineurin Inhibitors.* Transplantation Proceedings, 2007. **39**(7): p. 2290-2292.
98. Baan, C.C., et al., *Differential Effect of Calcineurin Inhibitors, Anti-CD25 Antibodies and Rapamycin on the Induction of FOXP3 in Human T Cells.* Transplantation, 2005. **80**(1): p. 110-117.
99. Segundo, D.S., et al., *Calcineurin Inhibitors, but not Rapamycin, Reduce Percentages of CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells in Renal Transplant Recipients.* Transplantation, 2006. **82**(4): p. 550-557.
100. Wang, Z., et al., *Low-dose of tacrolimus favors the induction of functional CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in solid-organ transplantation.* International Immunopharmacology, 2009. **9**(5): p. 564-569.
101. Akimova, T., et al., *Differing Effects of Rapamycin or Calcineurin Inhibitor on T-Regulatory Cells in Pediatric Liver and Kidney Transplant Recipients.* American Journal of Transplantation, 2012. **12**(12): p. 3449-3461.
102. Chi, H., *Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions.* Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(5): p. 325-338.
103. Araki, K., A.H. Ellebedy, and R. Ahmed, *TOR in the immune system.* Current opinion in cell biology, 2011. **23**(6): p. 707-715.
104. Battaglia, M., A. Stabilini, and M.-G. Roncarolo, *Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells.* Blood, 2005. **105**(12): p. 4743-4748.
105. Battaglia, M., et al., *Rapamycin Promotes Expansion of Functional CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells of Both Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients.* The Journal of Immunology, 2006. **177**(12): p. 8338.
106. Levitsky, J., et al., *Immunoregulatory Effects of Everolimus on In Vitro Alloimmune Responses.* PloS one, 2016. **11**(6): p. e0156535-e0156535.
107. Wells, A.D., et al., *Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance.* Nature Medicine, 1999. **5**(11): p. 1303-1307.
108. Turnquist, H.R., et al., *Rapamycin-Conditioned Dendritic Cells Are Poor Stimulators of Allogeneic CD4⁺ T Cells, but Enrich for Antigen-Specific Foxp3⁺ T Regulatory Cells and Promote Organ Transplant Tolerance.* The Journal of Immunology, 2007. **178**(11): p. 7018.
109. Gregori, S., et al., *Regulatory T Cells Induced by 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Mycophenolate Mofetil Treatment Mediate Transplantation Tolerance.* The Journal of Immunology, 2001. **167**(4): p. 1945.

110. Demirkiran, A., et al., *Conversion From Calcineurin Inhibitor to Mycophenolate Mofetil-Based Immunosuppression Changes the Frequency and Phenotype of CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells.* Transplantation, 2009. **87**(7): p. 1062-1068.
111. Zeng, Q., et al., *Effects of tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil (MMF) on regulatory T cells and co-inhibitory receptors in the peripheral blood of human liver allograft patients.* Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2019. **41**(3): p. 380-385.
112. Woltman, A.M., et al., *The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells.* European Journal of Immunology, 2000. **30**(7): p. 1807-1812.
113. Mazariegos, G.V., et al., *Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients.* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2003. **3**(6): p. 689-696.
114. Levitsky, J., et al., *Immunoregulatory profiles in liver transplant recipients on different immunosuppressive agents.* Human immunology, 2009. **70**(3): p. 146-150.
115. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4.* Nature immunology, 2002. **3**(3): p. 237-243.
116. Brouard, S., et al., *Comparative Transcriptional and Phenotypic Peripheral Blood Analysis of Kidney Recipients Under Cyclosporin A or Sirolimus Monotherapy.* American Journal of Transplantation, 2010. **10**(12): p. 2604-2614.
117. Stallone, G., et al., *Rapamycin induces ILT3(high)ILT4(high) dendritic cells promoting a new immunoregulatory pathway.* Kidney international, 2014. **85**(4): p. 888-897.
118. Rosborough, B.R., H. Hackstein, and H.R. Turnquist, *A window into immunosuppressant immunoregulation: recipient conversion to rapamycin increases potentially tolerogenic immune cells.* Kidney international, 2014. **85**(4): p. 743-745.
119. Karimi, M., et al., *Frequency of dendritic cell subsets and ILT3, ILT4 gene expression in two different immunosuppressive protocols in kidney transplant recipients. A cohort report.* Molecular biology reports, 2020. **47**(1): p. 123-128.
120. Barten, M.J., et al., *Affects of immunosuppression on circulating dendritic cells: an adjunct to therapeutic drug monitoring after heart transplantation.* International immunopharmacology, 2006. **6**(13-14): p. 2011-2017.
121. Szabo, G., C. Gavala, and P. Mandrekar, *Tacrolimus and Cyclosporine A Inhibit Allostimulatory Capacity and Cytokine Production of Human Myeloid Dendritic Cells.* Journal of Investigative Medicine, 2001. **49**(5): p. 442.
122. Cos, J., et al., *FK506 in the maturation of dendritic cells.* Haematologica, 2002. **87**(7): p. 679.
123. Orange, D.E., et al., *Dendritic cells loaded with FK506 kill T cells in an antigen-specific manner and prevent autoimmunity in vivo.* eLife, 2013. **2**: p. e00105-e00105.
124. Mehling, A., et al., *Mycophenolate Mofetil Impairs the Maturation and Function of Murine Dendritic Cells.* The Journal of Immunology, 2000. **165**(5): p. 2374.
125. Colic, M., et al., *Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells.* Clinical and experimental immunology, 2003. **134**(1): p. 63-69.
126. Lagaraine, C., et al., *Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways.* International immunology, 2005. **17**(4): p. 351-363.
127. Pilon, C., et al., *Induction of porcine regulatory cells by mycophenolic Acid-treated dendritic cells.* Transplantation proceedings, 2009. **41**(2): p. 700-702.
128. Macedo, C., et al., *Immunoregulatory properties of rapamycin-conditioned monocyte-derived dendritic cells and their role in transplantation.* Transplantation research, 2012. **1**(1): p. 16-16.
129. Woltman, A.M., et al., *Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages.* Blood, 2001. **98**(1): p. 174-180.
130. Woltman, A.M., et al., *Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression.* Blood, 2003. **101**(4): p. 1439-1445.

131. Hackstein, H., et al., *Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo.* Blood, 2003. **101**(11): p. 4457-4463.
132. Monti, P., et al., *Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells1.* Transplantation, 2003. **75**(1): p. 137-145.
133. Sordi, V., et al., *Differential Effects of Immunosuppressive Drugs on Chemokine Receptor CCR7 in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells: Selective Upregulation by Rapamycin.* Transplantation, 2006. **82**(6): p. 826-834.
134. Fedoric, B. and R. Krishnan, *Rapamycin downregulates the inhibitory receptors ILT2, ILT3, ILT4 on human dendritic cells and yet induces T cell hyporesponsiveness independent of FoxP3 induction.* Immunology Letters, 2008. **120**(1): p. 49-56.
135. Ko, H., et al., *Dentritic cell derived IL-18 production is inhibited by rapamycin and sanglifehrin A, but not cyclosporine A.* Transplant immunology, 2008. **20**(1-2): p. 99-105.
136. Haidinger, M., et al., *A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation.* Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2010. **185**(7): p. 3919-3931.
137. Weichhart, T., M. Hengstschläger, and M. Linke, *Regulation of innate immune cell function by mTOR.* Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(10): p. 599-614.
138. Macedo, C., et al., *Rapamycin augments human DC IL-12p70 and IL-27 secretion to promote allogeneic Type 1 polarization modulated by NK cells.* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2013. **13**(9): p. 2322-2333.
139. Levitsky, J., et al., *Systemic immunoregulatory and proteogenomic effects of tacrolimus to sirolimus conversion in liver transplant recipients.* Hepatology, 2013. **57**(1): p. 239-48.
140. Roider, T., et al., *Antithymocyte Globulin Induces a Tolerogenic Phenotype in Human Dendritic Cells.* International journal of molecular sciences, 2016. **17**(12): p. 2081.
141. Gillet-Hladky, S., et al., *Rabbit antithymocyte globulin inhibits monocyte-derived dendritic cells maturation in vitro and polarizes monocyte-derived dendritic cells towards tolerogenic dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase.* Transplantation, 2006. **82**(7): p. 965-974.
142. Naranjo-Gómez, M., et al., *Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells.* Journal of translational medicine, 2011. **9**: p. 89-89.
143. Boks, M.A., et al., *IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC.* Clinical immunology (Orlando, Fla.), 2012. **142**(3): p. 332-342.
144. Lee, J.-H., et al., *Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone.* Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 15087-15087.
145. Trabanelli, S., et al., *PGE2-induced IDO1 inhibits the capacity of fully mature DCs to elicit an in vitro antileukemic immune response.* Journal of immunology research, 2015. **2015**: p. 253191-253191.
146. Chitta, S., L. Santambrogio, and L.J. Stern, *GMCSF in the absence of other cytokines sustains human dendritic cell precursors with T cell regulatory activity and capacity to differentiate into functional dendritic cells.* Immunology letters, 2008. **116**(1): p. 41-54.
147. Marín, E., M.C. Cuturi, and A. Moreau, *Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand?* Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 274-274.
148. Ghazal, K., et al., *Treatment with mTOR inhibitors after liver transplantation enables a sustained increase in regulatory T-cells while preserving their suppressive capacity.* Clinics and research in hepatology and gastroenterology, 2018. **42**(3): p. 237-244.
149. Saliba, F., et al., *Early Switch From Tacrolimus to Everolimus After Liver Transplantation: Outcomes at 2 Years.* Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 2019. **25**(12): p. 1822-1832.
150. Scottà, C., et al., *Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells.* Haematologica, 2016. **101**(1): p. 91-100.
151. Barjon, C., et al., *Role of regulatory T-cells during hepatitis C infection: From the acute phase to post-transplantation recurrence.* Digestive and liver disease : official journal of the Italian

Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 2015. **47**(11): p. 913-917.
152. Trzonkowski, P., et al., *First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells.* Clinical immunology (Orlando, Fla.), 2009. **133**(1): p. 22-26.
153. Todo, S., et al., *A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation.* Hepatology, 2016. **64**(2): p. 632-43.
154. Conti, F., et al., *Regulatory T cell therapy: An option to induce operational tolerance in liver transplantation.* Clinics and research in hepatology and gastroenterology, 2016. **40**(6): p. 660-665.
155. Sanchez-Fueyo, A., *Strategies for minimizing immunosuppression: State of the Art.* Liver Transplantation, 2016. **22**(S1): p. 68-70.
156. He, Z., et al., *Metabolic Regulation of Dendritic Cell Differentiation.* Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 410-410.
157. Haidinger, M., et al., *A Versatile Role of Mammalian Target of Rapamycin in Human Dendritic Cell Function and Differentiation.* The Journal of Immunology, 2010. **185**(7): p. 3919.
158. Wan, J., et al., *IL-10 gene-modified dendritic cells-induced type 1 T regulatory cells inhibit graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018. **507**(1): p. 122-127.
159. Gregori, S., et al., *Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10–dependent ILT4/HLA-G pathway.* Blood, 2010. **116**(6): p. 935.
160. Torres-Aguilar, H., et al., *Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4⁺ T Cells.* The Journal of Immunology, 2010. **184**(4): p. 1765.
161. Ren, Y., et al., *Tolerogenic dendritic cells modified by tacrolimus suppress CD4+ T-cell proliferation and inhibit collagen-induced arthritis in mice.* International Immunopharmacology, 2014. **21**(1): p. 247-254.
162. Navarro-Barriuso, J., et al., *Comparative transcriptomic profile of tolerogenic dendritic cells differentiated with vitamin D3, dexamethasone and rapamycin.* Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 14985-14985.
163. Pallotta, M.T., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells.* Nature Immunology, 2011. **12**: p. 870.
164. Belladonna, M.L., et al., *Kynurenine Pathway Enzymes in Dendritic Cells Initiate Tolerogenesis in the Absence of Functional IDO.* The Journal of Immunology, 2006. **177**(1): p. 130.
165. Brenk, M., et al., *Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T Regulatory Cells.* The Journal of Immunology, 2009. **183**(1): p. 145.
166. Li, C., et al., *Dendritic cells transfected with indoleamine 2,3-dioxygenase gene suppressed acute rejection of cardiac allograft.* International immunopharmacology, 2016. **36**: p. 31-38.
167. Liang, G.-B., et al., *Impact of immunosuppressive agents on the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, heme oxygenase-1 and interleukin-7 in mesangial cells.* Molecular medicine reports, 2015. **12**(2): p. 2577-2583.
168. Bracho-Sanchez, E., et al., *Dendritic Cells Treated with Exogenous Indoleamine 2,3-Dioxygenase Maintain an Immature Phenotype and Suppress Antigen-specific T cell Proliferation.* Journal of immunology and regenerative medicine, 2019. **5**: p. 100015.
169. Barton, B.E., *STAT3: a potential therapeutic target in dendritic cells for the induction of transplant tolerance.* Expert opinion on therapeutic targets, 2006. **10**(3): p. 459-470.
170. do Prado, K.M., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity in placental compartments of renal-transplanted pregnant women.* American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), 2014. **72**(1): p. 45-56.

171. Probst, H.C., S. Muth, and H. Schild, *Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs.* European Journal of Immunology, 2014. **44**(4): p. 927-933.
172. Lutz, M.B., et al., *Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo.* European Journal of Immunology, 2000. **30**(7): p. 1813-1822.
173. Taner, T., et al., *Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival.* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2005. **5**(2): p. 228-236.
174. Ezzelarab, M.B., et al., *Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates.* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2013. **13**(8): p. 1989-2005.
175. Wang, G.-Y., et al., *Rapamycin combined with donor immature dendritic cells promotes liver allograft survival in association with CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cell expansion.* Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology, 2012. **42**(2): p. 192-202.
176. Geissler, E.K., *The ONE Study compares cell therapy products in organ transplantation: introduction to a review series on suppressive monocyte-derived cells.* Transplantation research, 2012. **1**(1): p. 11-11.
177. Thomson, A.W., et al., *Regulatory dendritic cells for promotion of liver transplant operational tolerance: Rationale for a clinical trial and accompanying mechanistic studies.* Human immunology, 2018. **79**(5): p. 314-321.
178. Ochando, J. and M.S. Braza, *Nanoparticle-Based Modulation and Monitoring of Antigen-Presenting Cells in Organ Transplantation.* Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 1888-1888.

Annexe 1.

Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology (2018) 42, 237–244

Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en

ORIGINAL ARTICLE

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

Khaldoun Ghazal[a,e,1,*], **Fabien Stenard**[a,1], **Géraldine Dahlqvist**[a,b], **Clément Barjon**[a], **Lynda Aoudjehane**[a], **Olivier Scatton**[c], **Filomena Conti**[a,d]

[a] *Sorbonne universités, UPMC université Paris 06, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, 75005 Paris, France*
[b] *Cliniques universitaires Saint-Luc, 1200 Bruxelles, Belgium*
[c] *Service de chirurgie et de transplantation hépatique, UPMC Paris 6, hôpital Pitié-Salpêtrière, AP–HP, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France*
[d] *Unité médicale de transplantation hépatique, UPMC Paris 6, hôpital Pitié-Salpêtrière, AP–HP, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France*
[e] *Laboratoire de biochimie, hôpital Bicêtre, AP–HP, 94275 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France*

Available online 23 November 2017

KEYWORDS
mTOR inhibitor;
Liver;
Transplantation;
Regulatory T-cells;
Calcineurin inhibitor.

Summary
Background: The mammalian targets of rapamycin (mTOR) inhibitors (sirolimus [SRL] and everolimus [EVR]) are used after transplantation for their immunosuppressive activity. Regulatory T-cells (Tregs) play a crucial role in immune tolerance. mTOR inhibitors appear to preserve Tregs, unlike Tacrolimus (Tac).
Aim: The aim of this study was to evaluate the number and function of Tregs in liver transplant recipients before and after conversion from Tac to mTOR inhibitors.
Methods: Fifteen patients with stable graft function where converted to SRL ($n = 5$) or EVR ($n = 10$). Tregs ($CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ $CD127^{low}$) number and activity were analysed prospectively in blood cells using flow cytometry, and functional assay.
Results: Patients of both groups displayed a sustained rise in Treg levels after introduction of mTOR inhibitors (Treg levels at 3 months: $6.45 \pm 0.38\%$ of CD4 T-cells, vs. baseline level

Abbreviations: CD, Cluster of differentiation; CNI, Calcineurin Inhibitor; EVR, Everolimus; HCC, Hepatocellular carcinoma; MMF, Mycophenolate Mofetil; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell; PTLD, Post-Transplant Lymphoproliferative Disease; PSC, Primary Sclerosing Cholangitis; SRL, Sirolimus; Tac, Tacrolimus; Tregs, Regulatory T-cells.

* Corresponding author at: Laboratoire de biochimie, hôpital Bicêtre, AP–HP, 94275 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France.
E-mail address: khaldoun.ghazal@aphp.fr (K. Ghazal).

[1] G.K. and S.F. contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.clinre.2017.10.001
2210-7401/© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

of 3.61 ± 0.37%, $P < 0.001$; mean fold increase 2.04 ± 0.73). In SRL group, 3-month Treg levels were 6.01 ± 0.53 vs. 3.79 ± 0.39; $P = 0.037$, while in EVR group they were 6.63 ± 0.67 vs. 3.54 ± 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.
Conclusion: These results suggest that mTOR inhibitors induce a significant increase in Tregs while maintaining suppressive activity after LT.
© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Calcineurin inhibitors (CNI) such as Tacrolimus (Tac), 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, like shown in a recent randomized controlled trial indicating that mTOR inhibitors have a beneficial impact on HCC-recurrence, and mTOR inhibitors-based immunosuppression was suggested to be associated with lower HCC recurrence after LT in a systemic review [7,8].

The natural Treg population, which accounts for 5—10% of peripheral CD4$^+$T-cells, constitutively expresses CD25 [9], and can suppress host immune responses in a context of autoimmune diseases and transplantation [10]. The FoxP3 transcription factor that is expressed by Tregs appears to be a master gene controlling Treg development [11], and the majority of FoxP3+ Tregs of are CD127 low [12]. Mouse and human Tregs can be expanded *in vitro* using SRL and high-dose IL-2, while inhibiting the proliferation of effector T-cells [13,14]. 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 [15—18]. Tregs are influenced by immunosuppressive therapy; in particular, CNIs impair the Treg function *in vitro* [19]. Unlike CNIs, it is suggested that mTOR inhibitors favour the expansion and immunomodulatory functions of FoxP3$^+$ CD4$^+$ CD25$^+$ Treg both *in vitro* and *in vivo* [14,20,21]. It has also been shown that Treg levels fall significantly after LT, especially in a context of allograft rejection [22], and that the reduction in circulating Tregs is counterbalanced by an increase within the graft [23]. 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 [24]. These findings point to mTOR inhibitors as being capable of increasing blood Treg levels in patients previously treated with CNIs [25].

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 peripheral blood CD4$^+$CD25$^+$CD127^{low}FoxP3$^+$ 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 before the conversion 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) 1 g bid. The study design is shown in Fig. 1. Conversion protocol to 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

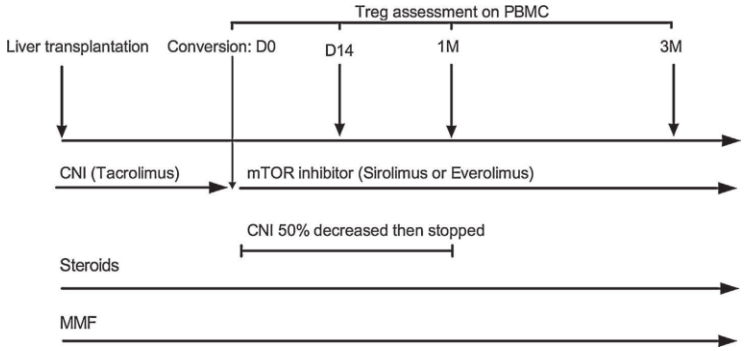


Figure 1 Study design: after liver transplantation, patients received an immunosuppressive regimen based on corticosteroids, MMF and Tac. When introducing SRL or EVR therapy, the CNI dosage was reduced to 50% of the initial levels. MMF and corticosteroids were not discontinued. Tregs were isolated from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

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. In order to confirm the stability of results under Tac therapy, three samples had been collected prior to conversion from five patients included in the study. A non-converted Tac control group of five 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 $CD4^+CD25^+$ $CD127^{low}$ $FoxP3^+$ 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 [26]. 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 according to manufacturer instructions: 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 in every experiment to set proper compensation and define positive signals. 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. Washes with FACS buffer (PBS, 1% FBS, 0.1% sodium azide), cells were incubated in Fix/Perm Buffer (eBioscience, San Diego, CA), for 30 minutes at 4 °C; then the anti-FoxP3 was added and the cells were incubated for 60 minutes at 4 °C in the dark, two additional washes with FACS buffer were done, then cells were suspended in 100 μl of FACS buffer. The percentage of $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$ was expressed as a percentage of total $CD4^+$ 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 (Beckman Coulter). Briefly, Treg cells were defined as $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}Foxp3^+$, the gating process depended on size (FSC) and structure (SSC) to choose lymphocytes, and then the $CD4^-$ cells were excluded, in the next step $CD25^{high}CD127^{low}$ were analysed for the Foxp3 expression, results were expressed as percentage of Treg cells and the absolute count of Treg cells per microliter of whole blood.

Isolation of regulatory T-cells with MACS column Treg sorting

Fresh $CD4^+CD25^+$ Tregs were isolated using the $CD4^+CD25^+$ Regulatory T-cells isolation Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Glabdach, Germany). PBMC were labelled with a cocktail of biotinylated antibodies targeting $CD4^-$ 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. $CD4^+$ cells were then incubated with anti-CD25 microbeads for 15 minutes at 4 °C and $CD4^+CD25^+$ T cells were positively selected using an MS column.

Treg functional assay

The suppressive activity of $CD4^+CD25^+$ Tregs was measured from their ability to inhibit the proliferative response of autologous PBMCs. At each time point autologous PBMC were cultured at a concentration of 5×10^4 cells per well and then the $CD4^+CD25^+$ 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. Error bars are of SEM. Statistical analyses on flow cytometry data were performed with GraphPad Prism version 5.00 for MAC OS X (GraphPad Software, San Diego California USA, 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 hilar cholangiocarcinoma in two cases and hepatocellular carcinoma in 13 cases (seven of whom exceeded the Milan criteria, with three having α-foetoprotein blood levels > 100 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 ± 3.2 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 $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ 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 ± 0.43%, 3.46 ± 0.37% and 3.61 ± 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 five 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 3.02 ± 0.13%, 2.76 ± 0.23% and 3.04 ± 0.2% of CD4 cells at day 0 and months 1 and 3, respectively ($P = 0.2$) (Fig. 2d).

Profile of $CD4^+CD25^+CD127^-FoxP3^+$ Tregs after conversion to an mTOR inhibitor

The levels of $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ 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 Fig. 2. In all patients who were switched to mTOR inhibitor therapy, a gradual and sustained increase

Table 1 Patient characteristics.

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

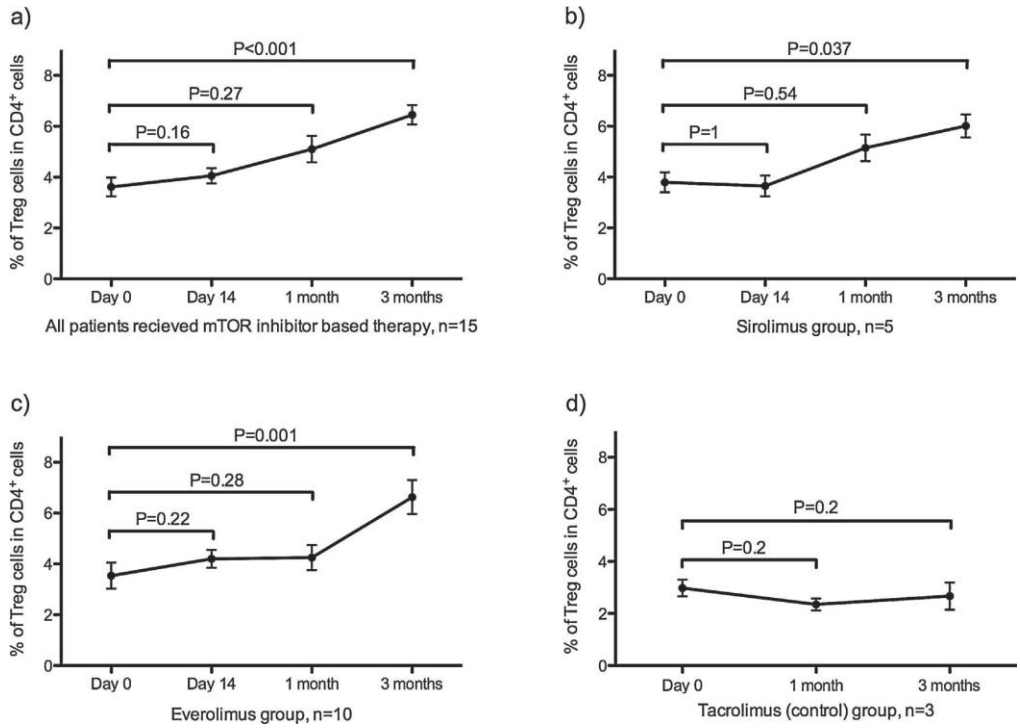


Figure 2 Variations in peripheral blood Treg levels after the introduction of mTOR inhibitor therapy: variations in Treg levels over time (days 0, 14, 30 and at 3 months): a: in all patients receiving SRL or EVR ($n = 15$): day 0 vs. 3 months, $P < 0.001$; day 0 vs. day 14, $P = 0.16$; day 0 vs. 1 month,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

in the $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ Treg population was seen after conversion, which reached significance at 3 months ($P < 0.001$) (Fig. 2a). 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 ($P = 0.037$, Fig. 2b). 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 at 3 months ($P = 0.001$, Fig. 2c). 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 $3.61\% \pm 0.37$; $P < 0.001$ (Count of Treg cells per microliter of whole blood: 20 ± 5 cells/μL at 3 M vs. 12 ± 4 cells/μL at j0), resulting in a mean fold rise in Treg levels of 2.04 ± 0.73 compared to baseline under Tac therapy (Fig. 2a). In the SRL group, the mean peak Treg level at 3 months was $6.01\% \pm 0.53$ vs. a mean baseline level of $3.79\% \pm 0.39$, $P = 0.037$ (Count of Treg cells per microliter of whole blood: 21 ± 5 cells/μl at 3 M vs13 ± 4 cells/μl at j0), or a mean fold increase of 1.82 ± 0.47 (Fig. 2b), while in the EVR group, the mean peak Treg level was 6.63 ± 0.67 vs. a mean baseline level of 3.54 ± 0.51, $P = 0.001$ (Count of Treg cells per microliter of whole blood: 20 ± 5 cells/μl at 3 M vs11 ± 4 cells/μl at j0), or a mean fold increase of 2.08 ± 0.7 (Fig. 2c).

Suppressive function of $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ cells

At baseline, and at each time point after mTOR inhibitor conversion, $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ 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 (Fig. 3). Indeed, during this study, Tregs isolated from patients under Tac or SRL/EVE based therapy always inhibited autologous PBMC proliferation by 30% or more when incubated 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

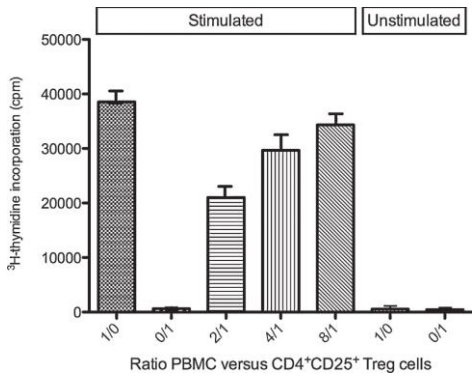


Figure 3 Proliferation assay: co-culture of autologous PBMCs and Tregs. At each time point a proliferation assay was performed, hereby a proliferation assay for one patient at 3 months after introduction of EVR. Tregs (CD4$^+$CD25$^+$ cells) inhibited the proliferation of autologous PBMCs stimulated with anti CD-28 and plate-bound anti-CD3. PBMCs, were cultured alone or together with magnetic column selection purified CD4$^+$CD25$^+$ 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 μM ^{3}H thymidine during the final 18 hours. Bar graphs show the mean $\pm$ SEM of triplicate wells expressed in Counts Per Minute (CPM).

after LT induced a sustained and significant increase in the peripheral CD4$^+$CD25$^+$CD127^{low}FoxP3$^+$ Treg count. Another important finding was that the suppressive capacity of these cells was maintained.

While the Tac based theraby may be renforce the creation of an immunosuppressive environement since Tac inhibits the production of IL-2, which is essential for the developpement of Treg cells and does not inhibit the maturation of dendritic cells (DC) [27,28]. In contrast, the mTOR inhibitors don't affect the IL-2 production; thus increasing Treg percentage, and inhibit the DC maturation [29—31]. Several studies have linked the Treg cells to operational tolerance [32—35]; 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 [36,37]. mTOR inhibitor conversion has also been proposed in patients with HCC, and there had been little demonstration of an anti-tumour effect of mTOR inhibitors on CHC, or its ability to reduce tumour recurrence rates in these patients [7] but a recent randomized controlled trial indicated that mTOR inhibitors have a beneficial impact on HCC-recurrence in the first 3 to 5 years, especially in low-risk patients [8].

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 [38], but effective antiviral therapy is now available.

Nevertheless, mTOR inhibitors appear to be as effective as CNI in offering reliable immunosuppression [39,40]. 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 [41—43], 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 dehiscences 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 [44]. Another study has showed a beneficial effect of treatement switch from cyclosporine A to EVR [45], but 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 [46,47], while the incidence of acute rejection after the *de novo* use of an mTOR inhibitor is similar to that obtained with CNI [48], 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 [7,49—51]. Firstly, the direct anti-tumour effect [52], and an opportunity to reduce the use of CNIs, may contribute to reducing tumour relapse rates after LT [53]. Secondly, the results of our pilot study clearly suggest that such a switch may induce an increase in Treg levels while in peripheral blood 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.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

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).

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. N Engl J Med 2003;349:931—40.
[2] Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. Annu Rev Immunol 2012;30:39—68.
[3] Augustine JJ, Bodziak KA, Hricik DE. Use of sirolimus in solid organ transplantation. Drugs 2007;67:369—91.
[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—56.
[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. Am J Transplant 2010;10:2252—62.
[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? Transplant Proc 2012;44:2966—70.
[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 2010;51:1237—43.
[8] Geissler EK, Schnitzbauer AA, Zulke C, Lamby PE, Proneth A, Duvoux C, et al. Sirolimus use in liver transplant recipients with hepatocellular carcinoma: a randomized, multicenter, open-label phase 3 trial. Transplantation 2016;100:116—25.
[9] O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. Nat Med 2004;10:801—5.
[10] 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. Immunol Rev 2001;182:18—32.
[11] Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. Eur J Immunol 2007;37:21—3.
[12] 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. J Exp Med 2006;203:1701—11.
[13] 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 2010;89:928—36.
[14] 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—47.
[15] 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 Immunol 2008;19:127—35.
[16] 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. Am J Transplant 2014;14:27—38.
[17] 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.
[18] Bradley JA. Transplant tolerance by treg therapy. Am J Transplant 2014;14:5—6.
[19] 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—9.
[20] 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.
[21] Ruggenenti 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—64.
[22] Zeiser R, Negrin RS. Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. Cell Cycle 2008;7:458—62.
[23] Stenard F, Nguyen C, Cox K, Kambham N, Umetsu DT, Krams SM, et al. Decreases in circulating CD4 + CD25hiFOXP3+ cells and increases in intragraft FOXP3+ cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. Pediatr Transplant 2009;13:70—80.
[24] 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—7.
[25] 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—9.
[26] 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—91.
[27] 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. Am J Transplant 2007;7:1722—32.
[28] Szabo G, Gavala C, Mandrekar P, Tacrolimus, cyclosporine. A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells. J Investig Med 2001;49:442—9.
[29] Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4 + CD25 + FoxP3+ regulatory T cells. Blood 2005;105:4743—8.
[30] 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—7.
[31] 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—63.

[32] 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. Am J Transplant 2007;7:309—19.
[33] 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. J Clin Investig 2008;118:2845—57.
[34] 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. Am J Transplant 2004;4:2118—25.
[35] 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—43.
[36] Monaco AP. The role of mTOR inhibitors in the management of posttransplant malignancy. Transplantation 2009;87:157—63.
[37] 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 2010;23:1068—70.
[38] 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—12.
[39] Campsen J, Zimmerman MA, Trotter JF, Wachs M, Bak T, Mandell S, et al. Sirolimus and liver transplantation: clinical implications for hepatocellular carcinoma. Expert Opin Pharmacother 2007;8:1275—82.
[40] 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—8.
[41] 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—8.
[42] 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. Clin Nephrol 2010;73:344—53.
[43] Soll C, Clavien PA. Inhibition of mammalian target of rapamycin: the janus face of immunosuppression? Hepatology 2010;51:1113—5.
[44] 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 2013;57:239—48.
[45] Roat E, De Biasi S, Bertoncelli L, Rompianesi G, Nasi M, Gibellini L, et al. Immunological advantages of everolimus versus cyclosporin A in liver-transplanted recipients, as revealed by polychromatic flow cytometry. Cytometry A 2012;81:303—11.
[46] 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—9.
[47] 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. Transplant Proc 2010;42:641—3.
[48] 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—68.
[49] 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—42.
[50] Chiurchiu 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. Transplant Proc 2010;42:277—9.
[51] 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 2010;10:190.
[52] 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. J Hepatol 2009;51:725—33.
[53] 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].

Annexe 2.

Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology (2016) 40, 660—665

Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en

MINI REVIEW

Regulatory T cell therapy: An option to induce operational tolerance in liver transplantation

F. Conti[a,b], G. Dahlqvist[c], H. Brisson[a], M. Miyara[a,b], Y. Calmus[a,b,*], G. Gorochov[a,b]

[a] *AP—HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France*
[b] *France Sorbonne universités, UPMC université Paris 06, 75006 Paris, France*
[c] *Cliniques universitaires Saint-Luc, 1200 Bruxelles, Belgium*

Available online 7 June 2016

Summary Regulatory T cells (Treg) may play an important role in operational (clinical) tolerance (OT), a stable graft function without immunosuppression in an otherwise immunocompetent host, that is spontaneously observed in some patients many years after transplantation. Several ongoing clinical trials are currently testing the effects of donor-specific or non-specific Treg infusion with the goal to induce this state of OT a few months after liver transplantation (LT). The preliminary results of two of these trials have been recently published, and raise a number of comments and issues: (1) These two papers demonstrate that a 100 to 1000-fold ex-vivo expansion of Treg is possible in humans after 2 weeks of culture. The optimal human Treg dose is however not clearly established, and might be higher than the dose that would be expected from translating murine data. (2) A lot of concerns are remaining regarding the Treg purity before expansion, the Treg stability during in vitro culture and the in vivo fate of infused cells. A strict monitoring of Treg should thus be done at each step. (3) Since Treg may play a detrimental role in some conditions, such as viral diseases and cancer, potential LT recipients with such diseases should probably be excluded from the initial trials of Treg infusion. (4) The follow-up of tolerant liver recipients should include repeated liver biopsies and detection of autoantibodies and humoral response, in addition to conventional liver graft assessment, in order to prevent the development of immune complications related to immunosuppression withdrawal. (5) The final issue raised by Treg therapy in LT is the choice of the immunosuppressive regimen used before tapering or withdrawal, appropriate to preserve OT establishment.
© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author at: AP—HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France.
E-mail addresses: geraldine.dahlqvist@uclouvain.be (G. Dahlqvist), helbrisson@hotmail.com (H. Brisson), makoto.miyara@gmail.com (M. Miyara), guy.gorochov@upmc.fr (Y. Calmus).

http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2016.05.002
2210-7401/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Dahlqvist Géraldine – Thèse de doctorat – 2020

Current immunosuppression provides excellent short-term results, with one-year survival rates greater than 90% after liver transplantation (LT). Acute rejection episodes are easily treated and rarely have long-term effects on the liver allograft as compared with other solid organ transplants. By contrast, immunosuppressive drugs increase the incidence of chronic renal failure, metabolic syndrome, cardiovascular and cancer morbidity. Tolerance represents a transplant physician's holy grail. Operational (clinical) tolerance (OT), i.e. a stable and acceptable graft function without immunosuppression for years, in an otherwise immunocompetent host, is observed in some patients many years after transplantation [1]. It is probably more frequent with LT, where OT is spontaneously obtained in about 20% of recipients, 5 to 10 years after transplantation, than following any other type of organ transplantation, where OT is obtained only in a minority of patients [2]. Several studies in which immunosuppression was intentionally withdrawn were successful in 20 to 30% of patients (and up to 60% of children) at 5 years [3—7]. Patients that did not achieve complete withdrawal, could in some cases nevertheless be maintained on lower doses of immunosuppressors, compared to baseline (''prope tolerance'') [8]. Several ongoing clinical trials (NCT01624077, NCT02166177, NCT02188719, NCT02474199) are now testing the effects of donor-specific or non-specific regulatory T cells (Treg) infusions, in the perioperative period, with the goal to induce a state of OT allowing withdrawal of all immunosuppressive drugs a few months after LT. The preliminary results of two of these trials have been recently published, and raise a number of comments and issues.

The London's King's College group [9] designed a clinical trial, called ThRIL, aiming at producing a large number of non-specific Treg to obtain an OT in LT recipients. It is planned to initiate the trial with alcoholic liver disease patients, in an attempt to avoid the risks of viral recurrence or rejection in patients transplanted for hepatitis or autoimmune diseases, respectively. Such trials, using non-specific Treg, have been previously reported as well tolerated in type 1 diabetes patients, aiming to improve the tolerance toward islet cells [10]. Treg-based cell therapy has been also tested in small scale clinical studies in patients with graft versus host disease (GVHD) [reviewed in 11]. In their recent publication [9], the London group reported their Treg isolation and expansion protocol, designed to reach significant cell yields, with the aim to allow infusion of at least 4.5×10^6 cells/kg of functional and pure Treg cell populations. Cells were obtained from 150 mL of peripheral blood, in cirrhotic patients awaiting LT and in normal controls. Peripheral blood mononuclear cells were first depleted of CD8 cells, and enriched in CD25+ cells, using magnetic beads, then stimulated using CD3+/CD28+ beads, in a medium containing rapamycine and interleukin-2 for 36 days. At the end of the culture, purity appeared to be satisfactory: 90% of the cells were indeed CD4+CD25+FoxP3+, and displayed low CD127 and high CTLA-4 levels. Their homing potential was judged appropriate according to their CD62L (lymph node homing) and CXCR3 (liver homing) expression. Finally, the authors controlled the absence of derivation toward a proinflammatory phenotype, by assessing the lack of CD8 and CD161 expression, and the low or absent secretion of interferon gamma and IL-17 in the expanded cells. In summary, the protocol induced an in vitro Treg expansion potent enough (about $\times$ 1000) to allow infusion of large quantities of autologous cells. It remains to be determined to what extent IL-2 producing cells, that may alter the suppressive capacity of expanded cells by rendering effector cells resistant to Treg cell-mediated suppression, are still present in the bulk of expanded cells.

The group of the Hokkaido University [12] recently reported in *Hepatology* the preliminary results of a clinical trial using donor-specific Treg in living donor LT. Recipient lymphocytes obtained by cytapheresis and splenectomy were incubated with irradiated donor cells and anti-CD80 and —CD86 antibodies for 2 weeks. The expanded cells (enriched in CD4+CD25+FoxP3+ cells, from about 5% to about 30% of CD4+ cells, with a preserved suppressive activity) were then returned to recipients at day 13 after LT. A mean of 23×10^6 cells/kg, including 3.4×10^6/kg CD4+CD25+FoxP3+ have been injected. An immunosuppression weaning program was then implemented, beginning 6 months after LT, for an anticipated complete withdrawal 18 months after LT, under strict monitoring, including repeated liver biopsies, assessments of T cell activity and presence of donor-specific antibodies. Among the programmed 40 patients, 10 only could benefit from this trial, which was discontinued after 3 acute rejections occurred. Seven patients could completely discontinue their immunosuppressive regimen, without rejection, after a follow-up of 16 to 33 months. The 3 patients experiencing rejection had been transplanted for autoimmune liver diseases (primary biliary cirrhosis or primary sclerosing cholangitis) and remained on low doses of immunosuppressive drugs.

Treg may be only part of the OT mechanism. Whether Treg infusions could per se recapitulate a state of OT represents an important, and in fact unresolved, issue. Treg prevent autoimmunity, as clearly confirmed by the conditions observed in X-linked syndrome (IPEX) patients [13]. Tolerance induced in experimental models (mainly rodent) — ''true tolerance'' — is obtained after hours, and the mechanism most probably involves the activation of regulatory cells, the prevention of the activation of effector cells by Treg cells as well as the apoptosis (deletion) of already activated effector cells [14]. This is often a definitive status, obtained spontaneously, without any drug intervention. Immunosuppressive drugs used around transplantation may even prevent true tolerance induction. By contrast, OT takes place only after several years [7]. OT may rely on Treg, but also probably on B cells, NK/NKT cells, myeloid-derived suppressor cells and tolerogenic dendritic cells [15—18]. OT is not a definitive status, and rejection may occur after years [3,7]. Some immunosuppressive regimens might also affect effector cells, and in that way facilitate tolerance induction. Therefore, it remains unknown whether Treg are mandatory in OT following LT. Several groups are working on identifying biomarkers of tolerance that would help the clinician detecting tolerant individuals [7] or clinical complications such as recurrent hepatitis C [19—21]. Most studies have utilized peripheral blood mononuclear cells, but liver samples may be more relevant to identify such markers [19,22]. Intriguingly, comparison of kidney and liver transplant tolerant patients does not reveal any significant overlap in biomarkers. More specifically, tolerant liver patients express a high number of natural killer (NK) cell genes, whereas

tolerant kidney patients exhibit a distinctive B cell profile, suggesting organ specific mechanisms of tolerance, with Treg expansion potentially representing a common feature, as highlighted by the increased FOXP3 expression in tolerant kidney and liver recipients [19,23,24]. Whatever the mechanisms involved in the setting of OT, the use of Treg may prove to be efficacious, being synergistic with the mechanisms developing during spontaneous OT. Adoptive transfer of Tregs has indeed already proven successful in murine [14,25] and nonhuman primate [26] models of transplantation.

Treg may be expanded in vitro. The possibility to actually expand a sufficient number of Treg retaining their regulatory function for therapeutic use represents a second issue. The two reviewed papers [9,12] clearly demonstrate that a 100 to 1000-fold ex-vivo expansion is possible in humans after 2 weeks of culture, provided than some conditions are fulfilled (Fig. 1). Treg doses reaching 3.5 to 4.5×10^6 CD4+CD25+FoxP3+ cells/kg, could then be delivered. This number was estimated to be sufficient to induce OT, from experimental and preliminary studies in autoimmune and GVHD [16,25]. But the optimal human Treg dose is not clearly established, and might be higher than the dose that would be expected from translating murine data. This could be of mandatory importance when non-donor-specific Treg are infused, since these cells are probably less potent that the donor-specific to induce tolerance [27,28]. Sequential Treg infusions and/or simultaneous low dose IL-2 infusions (a major Treg growth factor), might however also be considered to alleviate the lack of potency of the Treg.

Purity of the Treg infused represents an important issue. There have been a lot of concerns regarding Treg purity before expansion, and Treg stability during in vitro culture [25]. As mentioned above, Safinia et al. [9] confirmed the dominance of CD4+CD25+FoxP3^{high}CD127$_{low}$ cells at the end of the in vitro culture. Although considered a classical Treg phenotype, it is now clearly apparent that the latter definition encompasses various cell types, including a proportion of proinflammatory cells that may play a detrimental role on tolerance. Recently, TIGIT, ICOS, CD45RA and CD15s markers [29—31] have been proposed to divide the CD4+CD25+FoxP3+ population in resting, effector/activated Treg and non-Treg FoxP3+ cells, the TIGIT+ and CD15s+FoxP3+ population being highly suppressive [32] (Fig. 2). Other markers, such as LAP and GARP, the expression of which are correlated with demethylation in Treg related genes, especially those involved in Treg cell function such as Treg related demethylated region (TSDR) also known as Conserved Non Coding DNA region 2 (CNS2) in FOXP3 genes, could be used to purify Treg with high suppressive activity [33]. Finally, a last concern is the in vivo fate of infused cells. In the absence of genetic or radioactive labeling it will be difficult to check for their stability, and even more difficult to track them in the allograft or draining lymph nodes [16].

Treg infusion may be potentially deleterious in some populations of LT recipients. The fourth issue is the choice of the population of patients in which the proof of concept for the beneficial effect of Tregs after LT could be better tested. Indeed, Treg may play a detrimental role in some conditions, such as viral diseases and cancer. We and others have previously shown that ''natural'' Treg (CD4+CD25+FoxP3+ cells) and Tr1 cells are overexpressed during severe forms of recurrent hepatitis C and might exert a detrimental role during hepatitis C recurrence after LT [21,34]. The availability of potent direct-acting antiviral drugs, allowing the eradication of the virus in most cases, even after LT, has largely alleviated the problem of hepatitis C recurrence. Hepatitis B recurrence, which may also be worsened by the Treg activity [35], is also easily controlled after LT. Treg are also known to play a detrimental role in hepatocellular carcinoma [36], and immunotherapies aiming at increasing Treg function should probably be avoided in patients transplanted for cancer. Moreover, some etiologies, such as autoimmune

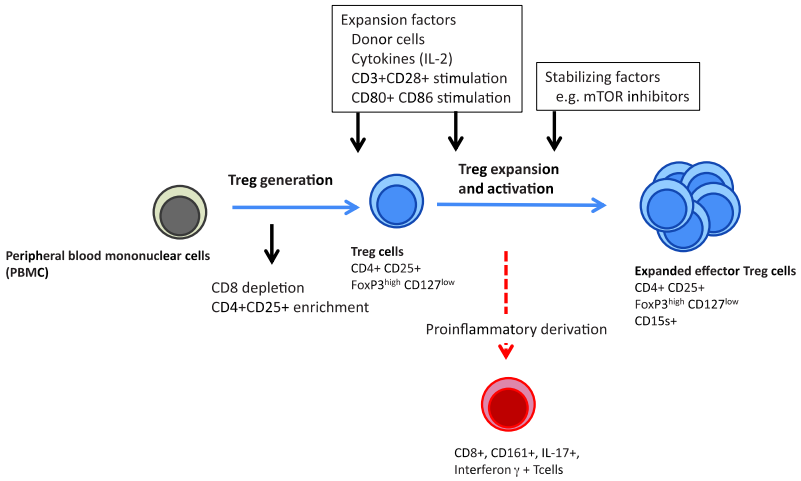


Figure 1 Expansion of Treg cells to induce operational tolerance.

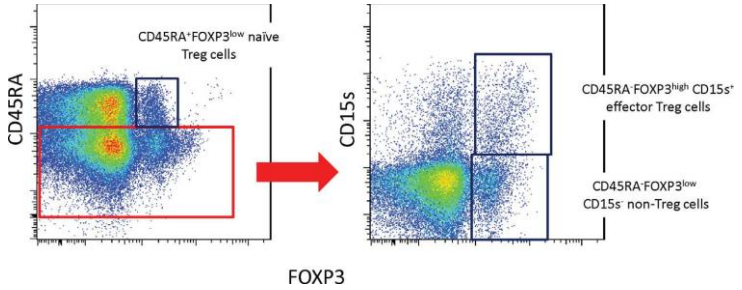


Figure 2 Human FOXP3+CD4+T cells are heterogeneous and can be functionally delineated using CD45RA and CD15s surface markers. Expression of FOXP3 and CD45RA by CD4⁺ T cells in PBMCs of a healthy donor (left) and expression of FOXP3 and CD15s by CD45RA⁻CD4+ T cells (right) are shown. While Naïve Treg cells can be defined by the FOXP3^{low}CD45RA⁺ phenotype (left), effector Treg cells are defined by the CD15s⁺FOXP3^{high} phenotype and non-regulatory FOXP3 expressing cells by the FOXP3^{low}CD15s⁻ phenotype among CD45RA⁻CD4⁺ T cells.

diseases, bear a high risk of acute rejection, and should be avoided, in first instances. In previous planned immunosuppression withdrawal [14], severe selection criteria have been used, derived from the clinical parameters associated with tolerance: absence of autoimmune disease, absence of evolutive viral disease, no episode of acute rejection (in the past 12 to 24 months), normal liver function tests, normal liver histology [5]. Such criteria should be used in designing studies aiming at evaluating immunotherapies using Treg. Such considerations have probably guided the choice of patients with alcoholic cirrhosis for the London trial.

Follow-up of tolerant liver recipients is necessary to prevent the development of immune complications related to immunosuppression withdrawal. It is presently difficult to determine which effect Treg infusion might exert on immune events not directly linked to cell-mediated rejection, i.e. chronic rejection, humoral rejection, and de novo autoimmune hepatitis. Chronic liver rejection became a rare phenomenon and the reason for this remains poorly understood. Its development is partly related to under-immunosuppression, and its prevalence could increase if immunosuppression is reduced or withdrawn in an attempt to obtain OT. The diagnosis of chronic rejection relies mainly on histology, therefore Treg therapy should include repeated liver biopsies [22]. The humoral immune response also plays a role in long-term tolerance, since the appearance of donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) is associated with tolerance failure [36—38]. DSA should therefore be regularly checked lifelong in patients undergoing immunosuppression reduction or withdrawal. Similarly, autoantibodies such as antinuclear, anti-actin, anti-liver-kidney microsoma antibodies should also be regularly checked in those patients.

The immunosuppressive regimen should promote the development of Treg and OT. The final issue raised by Treg therapy in LT is the choice of the immunosuppressive regimen used before tapering or withdrawal, appropriate to preserve OT establishment. mTOR inhibitors, sirolimus or everolimus, are clearly the pivotal drugs to be used to favor the development and phenotype maintenance of Treg [39]. By contrast, corticosteroids, antimetabolite drugs such as azathioprine, and calcineurin inhibitors may impair the development or Treg [8,15,40,41]. Anti-CD25 monoclonal antibodies might be deleterious on the development of CD4+CD25+FoxP3+ cells, but no data are available. Antilymphocyte antibodies might be preferable to induce OT, but the data are non conclusive [42]. Finally, belatacept (antagonist of CD80 and CD86 ligands) could be used [16] to favor tolerance.

Finally, other organ transplantations may benefit from Treg therapy. Several trials are ongoing (NCT02145325, NCT0288931, NCT02129881, NCT02371434, NCT02244801, NCT02091232), such as the OneStudy in renal transplantation (http://www.onestudy.org/).

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

[1] Whitehouse GP, Sanchez-Fueyo A. Immunosuppression withdrawal following liver transplantation. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2014;38(6):676—80.
[2] Calmus Y, Conti F. Is the liver a tolerogenic organ? Clin Res Hepatol Gastroenterol 2014;38(6):655—8.
[3] Orlando G, Soker S, Wood K. Operational tolerance after liver transplantation. J Hepatol 2009;50:1247—57.
[4] Feng S, Ekong UD, Lobritto SJ, Demetris AJ, Roberts JP, Rosenthal P, et al. Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. JAMA 2012;307:283—93.
[5] Benítez C, Londoño MC, Miquel R, Manzia TM, Abraldes JG, Lozano JJ, et al. Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. Hepatology 2013;58:1824—35.
[6] de la Garza RG, Sarobe P, Merino J, Lasarte JJ, D'Avola D, Belsue V, et al. Trial of complete weaning from immunosuppression for liver transplant recipients: factors predictive of tolerance. Liver Transpl 2013;19(9):937—44.
[7] Mastoridis S, Martínez-Llordella M, Sanchez-Fueyo A. Biomarkers and immunopathology of tolerance. Curr Opin Organ Transplant 2016;21(1):81—7.

[8] Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, Gray EA, Shapiro R, Eghtesad B, et al. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. Lancet 2003;361:1502—10.
[9] Safinia N, Vaikunthanathan T, Fraser H, Thirkell S, Lowe K, Blackmore L, et al. Successful expansion of functional and stable regulatory T cells for immunotherapy in liver transplantation. Oncotarget 2016, http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.6927 [Epub ahead of print].
[10] Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. Sci Transl Med 2015;7(315):315ra189.
[11] Trzonkowski P, Bacchetta R, Battaglia M, Berglund D, Bohnenkamp HR, Ten Brinke A, et al. Hurdles in therapy with regulatory T cells. Sci Transl Med 2015;7(304):304ps18.
[12] Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitsu M, Nagatsu A, Oura T, et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. Hepatology 2016, http://dx.doi.org/10.1002/hep.28459 [Epub ahead of print].
[13] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet 2001;27(1):20—1.
[14] Chandrasekharan D, Issa F, Wood KJ. Achieving operational tolerance in transplantation: how can lessons from the clinic inform research directions? Transpl Int 2013;26:576—89.
[15] Barjon C, Dahlqvist G, Calmus Y, Conti F. Role of regulatory T cells during hepatitis C infection: from the acute phase to post-transplantation recurrence. Dig Liver Dis 2015;47(11):913—7.
[16] Gregori S, Passerini L, Roncarolo MG. Clinical outlook for type-1 and FOXP3(+) T regulatory cell-based therapy. Front Immunol 2015;6:593.
[17] Sanchez-Fueyo A, Markmann J. Immune exhaustion and transplantation. Am J Transplant 2016, http://dx.doi.org/10.1111/ajt.13702 [Epub ahead of print].
[18] Bézie S, Picarda E, Ossart J, Martinet B, Anegon I, Guillonneau C. Compensatory regulatory networks between CD8T, B, and myeloid cells in organ transplantation tolerance. J Immunol 2015;195(12):5805—15.
[19] Taubert R, Danger R, Londoño MC, Christakoudi S, Martinez M, Rimola A, et al. Hepatic infiltrates in operational tolerant patients after liver transplantation show enrichment of regulatory T cells before proinflammatory genes are down-regulated. Am J Transplant 2015, http://dx.doi.org/10.1111/ajt.13617 [Epub ahead of print].
[20] Gronert Álvarez A, Fytili P, Suneetha PV, Kraft AR, Brauner C, Schlue J, et al. Comprehensive phenotyping of regulatory T cells after liver transplantation. Liver Transpl 2015;21(3):381—95.
[21] Utsumi M, Takaki A, Umeda Y, Koike K, Napier SC, Watanabe N, et al. Frequency of regulatory T cell and hepatitis C viral antigen-specific immune response in recurrent hepatitis C after liver transplantation. Transpl Immunol 2014;31(1):33—41.
[22] Yoshitomi M, Koshiba T, Haga H, Li Y, Zhao X, Cheng D, et al. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression after liver transplantation. Transplantation 2009;87(4):606—14.
[23] Lozano JJ, Pallier A, Martinez-Llordella M, Danger R, López M, Giral M, et al. Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. Am J Transplant 2011;11:1916—26.
[24] Bohne F, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Miquel R, Benítez C, Londoño MC, et al. Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation. J Clin Invest 2012;122:368—82.
[25] van der Net JB, Bushell A, Wood KJ, Harden PN. Regulatory T cells: first steps of clinical application in solid organ transplantation. Transpl Int 2016;29(1):3—11.
[26] Ezzelarab MB, Zhang H, Guo H, Lu L, Zahorchak AF, Wiseman RW, et al. Regulatory T cell infusion can enhance memory T cell and alloantibody responses in lymphodepleted nonhuman primate heart allograft recipients. Am J Transplant 2015, http://dx.doi.org/10.1111/ajt.13685 [Epub ahead of print].
[27] Landwehr-Kenzel S, Issa F, Luu SH, Schmück M, Lei H, Zobel A, et al. Novel GMP-compatible protocol employing an allogeneic B cell bank for clonal expansion of allospecific natural regulatory T cells. Am J Transplant 2014;14(3):594—606.
[28] Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen-specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. Sci Transl Med 2011;3(83):83ra42.
[29] Joller N, Lozano E, Burkett PR, Patel B, Xiao S, Zhu C, et al. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. Immunity 2014;40(4):569—81.
[30] Miyara M, Chader D, Sage E, Sugiyama D, Nishikawa H, Bouvry D, et al. Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112(23):7225—30.
[31] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity 2009;30(6):899—911.
[32] Kurtulus S, Sakuishi K, Ngiow SF, Joller N, Tan DJ, Teng MW, et al. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. J Clin Invest 2015;125(11):4053—62.
[33] Noyan F, Lee YS, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Taubert R, Warnecke G, et al. Isolation of human antigen-specific regulatory T cells with high suppressive function. Eur J Immunol 2014;44(9):2592—602.
[34] 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(9):2102—12.
[35] Gao Y, Zhang M, Li J, Yang M, Liu Y, Guo X, et al. Circulating FoxP3+ regulatory T and interleukin17-producing Th17 cells actively influence HBV clearance in de novo hepatitis B virus infected patients after orthotopic liver transplantation. PLoS One 2015;10(9):e0137881.
[36] Cany J, Tran L, Gauttier V, Judor JP, Vassaux G, Ferry N, et al. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: is there a place for regulatory T-lymphocyte depletion? Immunotherapy 2011;3(4 Suppl.):32—4.
[37] Waki K, Sugawara Y, Mizuta K, Taniguchi M, Ozawa M, Hirata M, et al. Predicting operational tolerance in pediatric living donor liver transplantation by absence of HLA antibodies. Transplantation 2013;95:177—83.
[38] Lion J, Taflin C, Cross AR, Robledo-Sarmiento M, Mariotto E, Savenay A, et al. HLA class II antibody activation of endothelial cells promotes Th17 and disrupts regulatory T-lymphocyte expansion. Am J Transplant 2015, http://dx.doi.org/10.1111/ajt.13644 [Epub ahead of print].
[39] Lu Y, Wang J, Gu J, Lu H, Li X, Qian X, et al. Rapamycin regulates iTreg function through CD39 and Runx1 pathways. J Immunol Res 2014;2014:989434.
[40] Taubert R, Hardtke-Wolenski M, Noyan F, Wilms A, Baumann AK, Schlue J, et al. Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. J Hepatol 2014;61(5):1106—14.

[41] Latorre I, Esteve-Sole A, Redondo D, Giest S, Argilaguet J, Alvarez S, et al. Calcineurin and mTOR inhibitors have opposing effects on regulatory T cells while reducing regulatory B cell populations in kidney transplant recipients. Transpl Immunol 2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2016.01.004 [pii: S0966-3274(16)30004-1. Epub ahead of print].

[42] Donckier V, Craciun L, Miqueu P, Troisi RI, Lucidi V, Rogiers X, et al. Expansion of memory-type CD8+ T cells correlates with the failure of early immunosuppression withdrawal after cadaver liver transplantation using high-dose ATG induction and rapamycin. Transplantation 2013;96(3): 306—15.

Annexe 3.

Digestive and Liver Disease 47 (2015) 913–917

Contents lists available at ScienceDirect

Digestive and Liver Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dld

Progress Report

Role of regulatory T-cells during hepatitis C infection: From the acute phase to post-transplantation recurrence

Clément Barjon[a,*], Géraldine Dahlqvist[a], Yvon Calmus[a,b], Filomena Conti[a,b]

[a] Sorbonne University, UPMC Univ. Paris 6, Inserm UMRS 938, CDR Saint-Antoine, Paris, France
[b] Department of Hepatology and Gastroenterology, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 March 2015
Accepted 28 June 2015
Available online 6 July 2015

Keywords:
Hepatitis C virus
Regulatory T-cells
Transplantation

ABSTRACT

Hepatitis C viral infection persists and becomes chronic in a majority of affected individuals. Numerous factors have been described to explain how the virus manages to escape the host immune system. One important escape mechanism is the increase in regulatory T cells induced by the virus. In this review, we will focus on the status of regulatory T cells throughout the natural history of hepatitis C infection and after liver transplantation. The molecular mechanisms involved in increasing the number of regulatory T cells are also discussed, as are data regarding the impact of regulatory T-cells on hepatic fibrosis in the context of hepatitis C viral infection.

© 2015 Editrice Gastroenterologica Italiana S.r.l. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Regulatory T cells (Treg) are a crucial component in the immune system, maintaining self-tolerance and immune homeostasis. Treg form a highly heterogeneous population which can be broadly divided into two main subsets: thymus-derived "natural" Treg and peripherally induced Treg. The most widely studied subsets are FoxP3+ Treg and Type 1 regulatory T-cells (Tr1).

FoxP3+ Treg are CD4+ T-cells that are characterized by expression of the interleukin 2 (IL2) receptor alpha chain (CD25), expression of the transcription factor FoxP3 and a weak expression of CD127 which discriminate them from activated CD4+ T cells [1–3]. Flow-cytometry immunophenotyping of FoxP3+ Treg is usually based on labelling these four markers. Approximately 5% to 10% of CD4+ T-cells from the peripheral blood of healthy donors express CD25. CD4+ CD25+ T-cells are frequently used in functional suppressive assays as they mainly possess a regulatory phenotype and they can conveniently be isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Other markers of FoxP3+ Treg include the regulatory molecules GITR, CTLA4, PD1, LAG3 and OX40 [4,5].

The IL2 signalling pathway is essential for FoxP3+ Treg development and homeostasis [6]. Both IL2 signalling and TCR activation are also necessary for FoxP3+ Treg to become suppressive [7]. Once activated, they exert their suppressive functions in a non-specific manner [8]. The mechanisms of action of FoxP3+ Treg are diverse and still not fully understood. They affect effector T-cells through cell-to-cell contact inhibition of IL2 transcription, metabolic disruption through CD39 and CD73 adenosine generation, direct cytotoxicity through granzyme A, and by acting as an IL2 "sink". They also modulate dendritic cell functions through the interaction of CTLA4 with CD80/86 and that of LAG-3 with the major histocompatibility complex (MHC) class II. The CTLA4 interaction triggers IDO activity and subsequently reduces T effector cell proliferation by reducing tryptophan availability, while the LAG-3 interaction inhibits dendritic cell (DC) activation. Finally, they produce the regulatory cytokines TGF-beta, IL10 and IL35 [9].

FoxP3+ Treg are either natural or peripherally induced Treg. While both FoxP3+ subsets display similar phenotypic characteristics, they possess different mRNA and protein expression profiles [10]. Helios expression has been proposed as a natural FoxP3+ Treg marker but may lack specificity. Neuropilin-1 expression is an interesting new lead but further studies are required to confirm its ability to discriminate natural FoxP3+ Treg from peripherally-induced Treg [11]. In this review, no distinction shall be made between FoxP3+ thymic Treg and FoxP3+ induced Treg, and they will be referred to as FoxP3+ Treg.

Tr1 cells were first described as IL10-secreting CD4+ T-cell clones generated ex vivo through repetitive stimulation in the presence of IL10 [12]. These clones were able to suppress CD4+ T-cell proliferation in a mouse model of colitis and they possess a cytokine profile that is distinct from T helper 1 (Th1) and Th2 cells, producing high levels of IL10 and low levels of IL2 and IL4. Since this initial publication, the natural occurrence and functional role of Tr1 cells in humans have been widely demonstrated [13].

* Corresponding author at: Inserm UMRS 938 – Faculté de médecine UPMC, 27, rue de Chaligny, 75012 Paris, France. Tel.: +33 01 40 01 14 01.
E-mail address: clement.barjon@inserm.fr (C. Barjon).

http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2015.06.014
1590-8658/© 2015 Editrice Gastroenterologica Italiana S.r.l. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Dahlqvist Géraldine – Thèse de doctorat – 2020

Specific markers for Tr1 cells have remained elusive. Transcriptome analysis has shown that the CD49b and CD18 integrins are over-expressed in human and mouse Tr1 clones [14], and CD4+ T-cells co-expressing CD49b and CD18 isolated from healthy donors are reminiscent of Tr1 cells. The over-expression of CD49b in Tr1 clones from healthy donors has been confirmed by another group, but not the expression of CD18 [9]. Recently, the co-expression of CD49b and LAG-3 was proposed as a specific surface marker for Tr1 cells in both mouse models and human PBMC from healthy donors [15].

Unlike FoxP3+ Treg, the survival of which is mainly reliant on IL2, the survival and proliferation of Tr1 cells depends mainly on IL15 and to a lesser extent on IL2 [16]. Tr1 cells exert their suppressive activities by secreting high levels of the immunosuppressive cytokines IL10 and TGF beta. They also possess cell contact-dependent suppressive mechanisms through CTLA4 and PD-1, as well as a direct cytolytic activity through Granzyme B and an ability to disrupt T-cell metabolism through the expression of CD39 and CD73, in the same way as FoxP3+ Treg [9].

Although the suppressive functions of Treg are crucial to maintaining homeostasis of the immune system, their ability to inhibit the host immune response may be diverted in pathological contexts such as cancer or infection [17]. In the case of HCV infection, Treg levels are increased and favour persistence of the virus [18].

In this review we will focus on the status and role of Treg in the establishment of chronic HCV infection and in the specific context of a post-transplantation recurrence of HCV infection.

2. Establishment of persistent HCV infection

Chronic HCV infection represents a major global health problem that affects more than 160 million people across the world [19]. The initial infection is often asymptomatic and the virus is eliminated by the host immune system in approximately 25% of cases. In the remaining 75%, the virus persists in the host and the infection becomes chronic [20].

The strength and amplitude of the initial immune response determines the outcome of the infection. A strong CD4+ T-cell response directed against multiple HCV protein epitopes has been described during acute infection in patients who cleared the infection, while patients with a chronic outcome displayed a weak CD4+ response with narrow specificity [21–23]. Moreover, high IL2 levels have been detected in the serum of patients who cleared the virus [24]. Indeed, the presence of activated CD4+ T-cells producing IL2 and able to prime CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTL) is critical to achieve elimination of the virus [25]. Clearance of the infection is also associated with a Th17 response and elevated plasma IL-21 levels [26].

When the initial adaptive immune response is not sufficient to clear the infection, HCV persists in the host through impairment of the immune system. Numerous immune escape mechanisms have been described and extensively reviewed elsewhere [27]. These mechanisms include protein mutations, the induction of immunosuppressive cytokine production (TGF beta, IL10), induction of the T-cell exhaustion phenotype (expression of negative co-stimulatory molecules CTLA-4, PD1 and TIM-3) and an increase in Treg frequency.

The first study of the role of Treg during chronic HCV infection was published a little over 10 years ago [28]. In this publication, higher levels of circulating CD4+ CD25+ T-cells were reported in chronic HCV patients. Furthermore, the CD4+ CD25+ T-cell fraction thus isolated suppressed the secretion of interferon (IFN) gamma from HCV-specific CD8+ T-cells during a co-culture experiment. Since this publication, numerous studies have confirmed the major suppressive role of Treg in the cell-mediated adaptive immune response throughout the natural history of HCV.

3. HCV infection and Treg

As previously mentioned, acute HCV infection is often asymptomatic and most patients are diagnosed during the chronic phase of the infection. It is therefore challenging to recruit patients for clinical studies focused on the onset of the infection. Consequently, only a few studies have been published regarding Treg levels during the early stages of infection. Perrella et al. were the first to report that Treg (CD4+ CD25+) were indeed elevated during the acute phase of HCV infection in the peripheral blood of patients [29]. Moreover, patients who subsequently developed chronic infection had higher blood levels of CD4+ CD25+ T-cells at the onset of the infection than those who cleared the infection. However, this was not the case in two subsequently published independent studies with respect to both the CD4+ CD25+ T-cell population and the HCV-specific CD4+ FoxP3+ population [30,31].

In the context of chronic infection, the rise in Treg levels appears to be universal and has been described by numerous studies. Both the CD4+ CD25+ T-cell subset and the CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell subset have been found at higher levels in the peripheral blood of chronic HCV patients when compared to healthy donors and recovered patients [18,28,32–34]. A large number of infiltrating CD4+ FoxP3+ T-cells were also reported in the livers of chronic HCV patients, while they were almost absent from healthy livers [35]. These Treg were characterized by a fully differentiated and highly activated phenotype, although approximately half of them did not express CD25. Several studies have reported a correlation between viral load and Treg levels during chronic infection, even though this is not always the case [32,35–37].

The elevated Treg levels observed in HCV-infected patients may result from two principal mechanisms directly influenced by the virus. Firstly, HCV may promote the active recruitment of existing Treg by modulating other immune cells such as dendritic cells and B cells. In a co-culture experiment, monocyte-derived dendritic cells (mo-DC) increased their production of the Treg-attracting chemokines CCL17 and CCL22 when they interacted with HCV-infected Huh7 cells [38]. A larger quantity of intrahepatic CCL22 and CCL17 mRNA has been reported in the liver of chronic HCV patients, thus supporting this hypothesis. Moreover, mo-DC generated from chronic HCV patients have been seen to possess a greater capacity to generate Treg from naive CD4+ T-cells than mo-DC from a healthy donor [39]. Finally, B cells exposed to HCV have been shown to display an enhanced ability to generate Treg [40].

Secondly, HCV-infected cells may directly interact with T-lymphocytes and favour their conversion into Treg. When activated CD4+ T cells were co-cultivated with HCV-infected Huh7 cells, they expressed higher levels of the Treg markers CD25 and FoxP3 [41,42]. This effect was induced synergistically by TGF beta and galectin-9, the expression of which is increased in infected Huh7 cells. Blockade of the interaction between galectin-9 and Tim-3 suppressed this conversion. Indeed, high levels of galectin-9 are detected in the serum and liver of HCV-infected patients. Kupffer cells and infected hepatocytes are the principal sources of galectin-9 in the liver [43,44].

Alternatively, HCV proteins may interact directly with T-cells and render them immunosuppressive. Jurkat T-cells expressing HCV core protein up-regulate FoxP3 and acquire suppressive function, and the transduction of HCV core protein in CD4+ T-cells induces the expression of FoxP3 and Treg markers [45,46]. In vivo, the immunization of mice using an adenoviral vector containing HCV core protein enhances CD4+ and CD8+ Treg expressing CD25 and FoxP3 [47]. Furthermore, numerous reports have indicated that

Dahlqvist Géraldine – Thèse de doctorat – 2020

Treg from HCV-infected patients have greater suppressive ability than Treg isolated from healthy donors [18,31,34,48]. However, the ability of HCV to infect Treg and eventually increase their suppressive properties still needs to be formally demonstrated.

4. Role of Treg in HCV-related fibrosis

Although Treg may favour persistence of the virus by regulating the host anti-HCV immune response, they may initially limit the extent of immune-induced liver injury. Two independent studies reported that Treg from patients displaying active hepatitis and elevated alanine transaminase (ALT) levels were less suppressive than Treg isolated from patients with persistently normal ALT, thus supporting this hypothesis [49,50].

However, HCV-induced fibrosis is inevitable after long-term chronic HCV infection, despite moderate inflammatory activity. The role of Treg in this process is controversial. On the one hand, intrahepatic CD4+ FoxP3+ T cells are present at higher levels in HCV-infected livers with limited fibrosis, and the ratio of FoxP3+/CD8+ cells is reduced in livers affected by severe HCV-related fibrosis [35,51]. Furthermore, TGF beta produced by HCV-specific CD4+ and CD8+ T-cells appears to suppress liver fibrogenesis instead of acting as a pro-fibrotic factor [52].

On the other hand, the expression of Treg markers (FoxP3, CTLA4, GITR) and Tr1 markers (CD49b, CD18, IL10) was increased in the livers of patients with HCV-related cirrhosis when compared to chronically infected patients without liver injury [53]. No increase in Th1 and Th2 markers was observed. Moreover, activated CD4+ FoxP3+ T cells expressing IL8 were enriched in the liver in close proximity to alpha-SMA+ hepatic stellate cells and areas of fibrosis [54]. The production of IL8 by Treg is specifically associated with HCV infection and the culture supernatant of IL8+ Treg clones activates hepatic stellate cells via IL8. Overall, these results suggest that different subsets of regulatory T-cells might have an opposite influence on HCV-related fibrosis.

Liver fibrosis can evolve into liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, both of which require liver transplantation (LT). However, if the patient is infected by HCV, graft re-infection is universal after LT. Moreover, graft damage and fibrosis are often accelerated after the re-infection, leading to cirrhosis in 30% of patients within 5 years and an overall reduction in patient survival compared to other indications. The mechanisms of accelerated HCV-induced liver damage after LT are poorly understood. However, in recent years, the influence of Treg on the severity of post-transplantation HCV recurrence has been evaluated.

5. Treg and HCV recurrence after liver transplantation

High levels of the intrahepatic Treg markers FoxP3, CTLA4 and GITR have been detected in biopsies from patients experiencing HCV recurrence 1 year and 5 years after LT. In addition, the Tr1 markers CD49b and CD18, as well as expression of the immunosuppressive cytokines IL10 and TGF beta were also increased and their levels of expression correlated positively with the severity of the recurrence. These results suggested for the first time that Tr1 cells play a specific deleterious role in the context of HCV recurrence post-transplantation [55]. It has been also observed that the expression of CD49b might be predictive of the response to combined interferon and ribavirin antiviral therapy after transplantation, a high level of CD49b RNA extracted from patient sera being associated with a lack of response to the treatment [56].

Peripheral CD4+ CD25+ T-cells were also found to be elevated soon after a post-transplant HCV recurrence and they had a greater suppressive capacity than CD4+ CD25+ T-cells from healthy donors [48]. Interestingly, the levels and suppressive potential of CD4+ CD25+ T-cells from patients with acute hepatitis C were similar, suggesting that HCV reinfection reproduces the same pattern as the primary infection in terms of Treg induction.

When Treg were analyzed during a recurrence of HCV fibrosis at least 1 year post-transplantation, severe fibrosis was associated with high levels of peripheral CD4+ CD25+ FoxP3+ Treg, high levels of IL10-secreting CD4+ T-cells and high levels of Th17 [57]. Treg inhibited the production of IFN gamma from HCV-specific CD4+ T-cells but not the production of IL17, suggesting that Treg may suppress the immune response against HCV while allowing the establishment of a pro-inflammatory environment.

6. Open issues and future perspectives

Treg levels are universally elevated during chronic HCV infection and in the context of post-transplantation HCV recurrence, in both the peripheral blood and livers of infected patients (Fig. 1). They appear to constitute an essential immunosuppressive mechanism that is directly mediated by the virus, allowing its persistence by limiting liver damage and repressing a CD8+ mediated immune response.

Beyond this widely accepted consensus, the lack of Treg-specific markers and common immunophenotyping protocols among research teams render comparisons between studies hazardous concerning more subtle aspects of the infection. In particular, older studies tended to focus on the CD4+ CD25+ subsets while more recent studies have often added FoxP3 as a specific marker. These discrepancies in characterization may explain the contradictory results obtained, such as the differences between Treg levels observed at the onset of infection. As for the use of specific markers, it is worth mentioning that future studies could benefit from the addition of “natural” versus “induced” Foxp3+ Treg markers such as Helios or Neuropilin-1 in order to refine our knowledge of the origin of Treg in the context of HCV infection.

Future studies could also benefit from an epigenetic analysis of the Treg-specific demethylation region (TSDR) in the FoxP3 locus in order to accurately discriminate Treg from activated T-cells that transiently express FoxP3. Indeed, TSDR demethylation is associated with Treg but not activated T-cells [58]. This method has mainly been applied to peripheral blood T-cells, although very rarely in the context of liver transplantation, but can also be used on paraffin embedded tissues [59].

Few studies have described the status of Treg during post-transplantation HCV recurrence, although in this situation the rise in Treg levels appears to be universal. Moreover, Treg may actively participate in the acceleration of fibrosis in this particular context [57]. This is an important issue because Treg have a positive effect on graft tolerance, and strategies consisting of raising their levels in order to reduce or even discontinue immunosuppressive therapy are currently being investigated.

Indeed, it is now well known that calcineurin inhibitors have a deleterious effect on Treg, while mTOR inhibitors favour their maintenance. As antiviral therapies may also affect Treg (such as ribavirin which reduces their suppressive capacities), finding the right balance of medication that will favour graft acceptance and limit the recurrence of infection might prove problematic without further studies [60,61]. To our knowledge, the influence on Treg on the recently approved antiviral drug sofosbuvir has not yet been studied.

Interestingly, HCV infection does not negatively influence the establishment of operational tolerance of the liver allograft after the withdrawal of immunosuppression, whereas concomitant infections are generally considered to be detrimental to the process of allograft tolerance [62]. As expected, the induction of Treg might be involved in this phenomenon, alongside high levels of intrahepatic

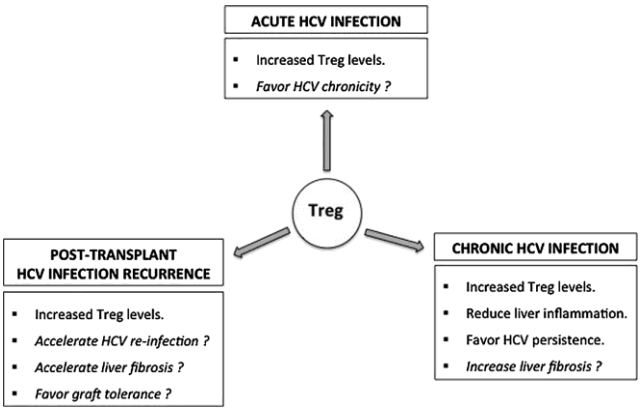


Fig. 1. Known and hypothetical (italics) roles of regulatory T cells during acute, chronic and post-transplantation recurrent hepatitis C infection. HCV, hepatitis C virus; Treg, regulatory T cells.

interferon-stimulated gene expression which may paradoxically promote a tolerogenic micro-environment in the context of HCV infection.

Most of the studies referred to in this review focused on CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cells, while numerous other regulatory populations have been described. However, the lack of specific markers hinders further research on such populations. Tr1 cells have been described as IL10 secreting CD4+ T-cells that promote viral persistence but protect against fibrosis [63]. Furthermore, elevated post-transplantation CD49b expression suggests that Tr1 may also promote HCV recurrence. Moreover, the presence of regulatory HCV-specific CD8+ T-cells producing IL10 and TGF-beta has been reported during HCV chronic infection, although intrahepatic CD8+ FoxP3+ T-cells appear to be very scarce [51,64,65].

Future studies to focus on such alternative regulatory populations may shed new light on the immunoregulatory networks involved during HCV chronic infection and the recurrence of post-transplantation infection.

Conflict of interest

None declared.

Funding

Clément Barjon was supported by a grant from DIM Biothérapie Ile de France.

References

[1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. 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 1995;155:1151–64.
[2] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. Journal of Experimental Medicine 2006;203:1701–11.
[3] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003;299:1057–61.
[4] Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nature Immunology 2002;3:135–42.
[5] Birebent B, Lorho R, Lechartier H, et al. Suppressive properties of human CD4+ CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. European Journal of Immunology 2004;34:3485–96.
[6] Malek TR, Yu A, Zhu L, et al. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. Journal of Clinical Immunology 2008;28:635–9.
[7] Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. Activation requirements for the induction of CD4+ CD25+ T cell suppressor function. European Journal of Immunology 2004;34:366–76.
[8] Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. Journal of Immunology 2000;164:183–90.
[9] Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. Frontiers in Immunology 2012;3:30.
[10] Lin X, Chen M, Liu Y, et al. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 2013;6:116–23.
[11] Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. Journal of Experimental Medicine 2012;209(Suppl. 1):1723–42.
[12] Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature 1997;389:737–42.
[13] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunological Reviews 2006;212:28–50.
[14] Rahmoun M, Foussat A, Groux H, et al. 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 2006;140:139–49.
[15] Gagliani N, Magnani CF, Huber S, et al. Coexpression of CD49b and -3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. Nature Medicine 2013;19:739–46.
[16] Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, et al. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. European Journal of Immunology 2002;32:2237–45.
[17] Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+ CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. Journal of Immunology 1999;163:5211–8.
[18] Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin 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. Journal of Virology 2005;79:7860–7.
[19] Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2011;17:107–15.
[20] Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2013;10:553–62.
[21] Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. Journal of Clinical Investigation 1996;98:706–14.
[22] Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. Gastroenterology 1999;117:933–41.
[23] Urbani S, Amadei B, Fisicaro P, et al. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. Hepatology 2006;44:126–39.
[24] Semmo N, Day CL, Ward SM, et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. Hepatology 2005;41:1019–28.
[25] Smyk-Pearson S, Tester IA, Klarquist J, et al. Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. Journal of Virology 2008;82:1827–37.

[26] Kared H, Fabre T, Bedard N, et al. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. PLoS Pathogens 2013;9:e1003422.
[27] Larrubia JR, Moreno-Cubero E, Lokhande MU, et al. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. World Journal of Gastroenterology: WJG 2014;20:3418–30.
[28] Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, et al. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. Hepatology 2003;38:1437–48.
[29] Perrella A, Vitiello L, Atripaldi L, et al. Elevated CD4+/CD25+ T cell frequency and function during acute hepatitis C presage chronic evolution. Gut 2006;55:1370–1.
[30] Heeg MH, Ulsenheimer A, Gruner NH, et al. FOXP3 expression in hepatitis C virus-specific CD4+ T cells during acute hepatitis C. Gastroenterology 2009;137:1280–8, e1–6.
[31] Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, et al. Functional suppression by FoxP3+ CD4+ CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. Journal of Infectious Diseases 2008;197:46–57.
[32] Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. Hepatology 2004;40:1062–71.
[33] Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, et al. Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection. Journal of Virology 2008;82:5043–53.
[34] Yang JH, Zhang YX, Yu RB, et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell responses in patients with persistent hepatitis C virus infection. Zhonghua nei ke za zhi 2006;45:29–33.
[35] Claassen MA, de Knegt RJ, Tilanus HW, et al. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. Journal of Hepatology 2010;52:315–21.
[36] Wang JP, Zhang Y, Wei X, et al. Circulating Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 2010;118:261–70.
[37] Chang JB, Xue R, Zhou ZX, et al. Prediction of antiviral efficacy in patients with chronic hepatitis C by changes in forkhead box protein 3 levels. Experimental and Therapeutic Medicine 2014;8:165–8.
[38] Riezu-Boj JI, Larrea E, Aldabe R, et al. Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection. Journal of Hepatology 2011;54:422–31.
[39] Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, et al. Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. Journal of Gastroenterology 2013;48:660–70.
[40] Ayers CL, Firan M, Pillai V, et al. Viral interactions with B-cells contribute to increased regulatory T-cells during chronic HCV infection. Viral Immunology 2011;24:119–29.
[41] Hall CH, Kassel R, Tacke RS, et al. HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta. PLoS ONE 2010;5:e12154.
[42] Ji XJ, Ma CJ, Wang JM, et al. HCV-infected hepatocytes drive CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T-cell development through the Tim-3/Gal-9 pathway. European Journal of Immunology 2013;43:458–67.
[43] Mengshol JA, Golden-Mason L, Arikawa T, et al. A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. PLoS ONE 2010;5:e9504.
[44] Barjon C, Niki T, Verillaud B, et al. A novel monoclonal antibody for detection of galectin-9 in tissue sections: application to human tissues infected by oncogenic viruses. Infectious Agents and Cancer 2012;7:16.
[45] Dominguez-Villar M, Fernandez-Ponce C, Munoz-Suano A, et al. Up-regulation of FOXP3 and induction of suppressive function in CD4+ Jurkat T-cells expressing hepatitis C virus core protein. Clinical Science 2012;123:15–27.
[46] Fernandez-Ponce C, Dominguez-Villar M, Aguado E, et al. CD4+ primary T cells expressing HCV-core protein upregulate Foxp3 and IL-10, suppressing CD4 and CD8 T cells. PLOS ONE 2014;9:e85191.
[47] Krishnadas DK, Li W, Kumar R, et al. HCV-core and NS3 antigens play disparate role in inducing regulatory or effector T cells in vivo: implications for viral persistence or clearance. Vaccine 2010;28:2104–14.
[48] Perrella A, Arenga G, Pisaniello D, et al. Elevated CD4+/CD25+ T-cell frequency and function during hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. Transplantation Proceedings 2009;41:1761–6.
[49] Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. Clinical and Experimental Immunology 2006;144:188–96.
[50] Itose I, Kanto T, Kakita N, et al. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. Journal of Viral Hepatitis 2009;16:844–52.
[51] Sturm N, Thelu MA, Camous X, et al. Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. Journal of Hepatology 2010;53:25–35.
[52] Li S, Vriend LE, Nasser IA, et al. Hepatitis C virus-specific T-cell-derived transforming growth factor beta is associated with slow hepatic fibrogenesis. Hepatology 2012;56:2094–105.
[53] Delhem N, Cottrez F, Carpentier A, et al. Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. Bulletin du cancer 2008;95:1029–38.
[54] Langhans B, Kramer B, Louis M, et al. Intrahepatic IL-8 producing Foxp3(+)CD4(+) regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. Journal of Hepatology 2013;59:229–35.
[55] Carpentier A, Conti F, Stenard F, et al. 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 2009;9:2102–12.
[56] Fabien S, Olivier M, Khaldoun G, 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.
[57] Basha HI, Subramanian V, Seetharam A, et al. Characterization of HCV-specific CD4+ Th17 immunity in recurrent hepatitis C-induced liver allograft fibrosis. American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2011;11:775–85.
[58] Baron U, Floess S, Wieczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. European Journal of Immunology 2007;37:2378–89.
[59] Taubert R, Hardtke-Wolenski M, Noyan F, et al. Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. Journal of Hepatology 2014;61:1106–14.
[60] Kobayashi T, Nakatsuka K, Shimizu M, et al. Ribavirin modulates the conversion of human CD4(+) CD25(−) T cell to CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) T cell via suppressing interleukin-10-producing regulatory T cell. Immunology 2012;137:259–70.
[61] Langhans B, Nischalke HD, Arndt S, et al. Ribavirin exerts differential effects on functions of CD4+ Th1, Th2, and regulatory T cell clones in hepatitis C. PLoS ONE 2012;7:e42094.
[62] Bohne F, Londono MC, Benitez C, et al. HCV-induced immune responses influence the development of operational tolerance after liver transplantation in humans. Science Translational Medicine 2014;6:242ra81.
[63] Kaplan DE, Ikeda F, Li Y, et al. Peripheral virus-specific T-cell interleukin-10 responses develop early in acute hepatitis C infection and become dominant in chronic hepatitis. Journal of Hepatology 2008;48:903–13.
[64] Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. Journal of Clinical Investigation 2004;113:963–72.
[65] Alatrakchi N, Graham CS, van der Vliet HJ, et al. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. Journal of Virology 2007;81:5882–92.