

Université de Montréal

**Modulation des réactions alloimmunitaires par les cytokines
maîtresses IFN- γ et TGF- β**

Par

Jean-Sébastien Delisle

Institut de recherche en immunologie et oncologie

(IRIC)

Département des Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D)

en Sciences biomédicales

Juin 2010

© Jean-Sébastien Delisle

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Modulation des réactions alloimmunitaires par les cytokines
maîtresses IFN- γ et TGF- β**

Présentée par :

Jean-Sébastien Delisle

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Françoise Le Deist
Présidente-rapporteuse

Dr Claude Perreault
Directeur de recherche

Dr Alexandre Prat
Membre du jury

Dr Denis Girard
Examineur externe

Dr Ali Ahmad
Représentant du doyen

Sommaire

L'injection de cellules immunologiquement compétentes à un hôte histo-incompatible amène une réaction qui peut se traduire par la maladie du greffon-contre-l'hôte (GVHD). La GVHD demeure une barrière importante à une utilisation plus répandue de la greffe allogénique de cellules hématopoïétiques (AHCT), pourtant un traitement efficace pour traiter de nombreuses maladies. Une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette pathologie pourrait en faciliter le traitement et la prévention. L'Interféron-gamma (IFN- γ) et le *Transforming Growth Factor*-béta (TGF- β) sont deux cytokines maîtresses de l'immunité impliquées dans la fonction et l'homéostasie des cellules greffées. Nous démontrons chez la souris que l'IFN- γ limite la reconstitution lympho-hématopoïétique de façon dose-dépendante en mobilisant des mécanismes d'apoptose et en inhibant la prolifération cellulaire. Le TGF- β est quant à lui généralement connu comme un immunosuppresseur qui contrôle l'immunité en utilisant plusieurs voies de signalisation. Le rôle relatif de ces voies en AHCT est inconnu. Nous avons étudié une de ces voies en greffant des cellules provenant de donneurs déficients pour le gène SMAD3 (SMAD3-KO), un médiateur central de la voie canonique du TGF- β , à des souris histo-incompatibles. Bien que l'absence de SMAD3 ne cause aucune maladie chez nos souris donneuses, l'injection de cellules SMAD3-KO amène une GVHD du colon sévère chez le receveur. Cette atteinte est caractérisée par une différenciation Th1 et une infiltration massive de granulocytes témoignant d'un rôle central de SMAD3 dans la physiologie des lymphocytes T CD4 et des cellules myéloïdes. Nous avons focalisé ensuite nos efforts sur le rôle de SMAD3 chez les lymphocytes T CD4 en sachant que SMAD3 était actif chez les lymphocytes T CD4 tolérants. Nous avons découvert que SMAD3 était rapidement inactivé après une activation des cellules T, suggérant que l'inactivation de SMAD3 était fonctionnellement importante pour briser l'état de tolérance. Des études de micro-puces d'ADNc nous ont montré que SMAD3 contrôlait en effet l'expression de nombreux transcrits de gènes connus comme étant reliés à la tolérance et/ou à des processus biologiques dont les rôles dans le maintien de la tolérance sont plausibles.

Mots Clés : Interféron-gamma, TGF-béta, GVHD, tolérance immunitaire, Th1, granulocyte.

Abstract

The injection of immuno-competent cells into a histo-incompatible host can result in the development of Graft-versus-Host disease (GVHD). GVHD is the most significant barrier to a more widespread use of allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT), a potent treatment for several diseases. A better understanding of the pathophysiological underpinnings of GVHD would facilitate the design of rational approaches to treat and prevent this complication of AHCT. Gamma-interferon (IFN- γ) and Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) are master cytokines of immunity and have a role in the function and homeostasis of transplanted cells. Using a murine model, we show that IFN- γ curtails lymphohematopoietic reconstitution in a dose-dependent fashion by increasing apoptosis and by limiting donor cell proliferation. TGF- β is an immunosuppressive cytokine that controls immune cells through multiple signaling pathways. The relative contribution of these pathways in AHCT is unknown. We specifically studied the role of one of these pathways by transplanting SMAD3 deficient cells (SMAD3-KO) in histo-incompatible hosts. SMAD3 is a key mediator of the so-called canonical TGF- β signaling pathway. Although SMAD3-KO donor mice are healthy, the injection of SMAD3-KO cells leads to severe GVHD in the hosts, characterized by intestinal involvement associated with Th1 skewing and massive granulocyte infiltration. These findings hint at a crucial role for SMAD3 in CD4 T-cell and myeloid cell biology. We then focalized on the role of SMAD3 in CD4 T cells knowing that SMAD3 is active in tolerant, resting CD4 T cells. We found that SMAD3 was rapidly inactivated upon T cell activation, suggesting that SMAD3 inactivation was functionally important to break the state of tolerance. Our cDNA microarray experiments show that indeed, SMAD3 regulates the transcript levels of multiple genes known to be involved in T cell tolerance and in biological processes plausibly related to immune tolerance.

Keywords : gamma-interferon, TGF-beta, GVHD, immune tolerance, Th1, granulocyte.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES PUBLICATIONS	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
REMERCIEMENTS	xi
INTRODUCTION	13
1. La réponse immunitaire	13
1.1 Système immunitaire inné et adaptatif	13
1.1.1 Immunité innée	14
1.1.2 Immunité adaptative	15
1.2 La réponse immunitaire T	16
1.2.1 Reconnaissance et activation	17
1.2.2 Différenciation	18
1.2.3 Contraction et mémoire	21
1.3 La tolérance et l'homéostasie	22
1.3.1 La tolérance périphérique	23
2.L'histocompatibilité	26
2.1 L'individualité immunologique	26
2.2 Le MHC	27
2.2.1 MHC de classe I et II	27
2.2.2 MHC et interactions cellulaires	29
2.3 Les déterminants immunogénétiques non-MHC de l'histocompatibilité	31
3. L'alloréactivité	32
3.1 La réaction immunitaire contre des alloantigènes	32

3.1.1	Mécanismes de rejet	33
3.2	Greffe de cellules hématopoïétiques	35
3.2.1	GVHD, principes	36
3.2.2	GVHD aiguë	38
3.2.3	GVHD chronique	40
3.3	La reconstitution hémato-lymphoïde et la GVHD	40
3.4	Les modulateurs de l'alloréactivité et de l'allo-tolérance	42
4.L	IFN-γ et le TGF-β	43
4.1	L'IFN- γ , cytokine pivot de la réaction immunitaire	43
4.1.1	IFN- γ , signalisation	43
4.1.2	IFN- γ , physiologie et immunité	45
4.2	L'IFN- γ et l'AHCT	48
4.3	Le TGF- β et le maintien de la tolérance périphérique	49
4.3.1	TGF- β , signalisation	49
4.3.2	TGF- β , physiologie et immunité	52
4.4	Le TGF- β et l'AHCT	56
4.5	Deux voies antagonistes ?	57
5.	Hypothèse globale et nouvelles connaissances sur le rôle de l'IFN-γ et de l'axe TGF-β/SMAD3 dans la régulation de la GVHD	59
5.1	Les niveaux d'IFN- γ programment la reconstitution hémato-lymphoïde et la signalisation par l'IFN- γ R module la GVHD pulmonaire et intestinale	59
5.2	L'absence de SMAD3 chez les cellules du donneur accentue la GVHD	60
5.3	Une forte stimulation par le TCR inhibe la voie TGF- β /SMAD3	61
5.4	Le transcriptome dépendant de la voie TGF- β /SMAD3 révèle des mécanismes susceptibles de contrôler la tolérance des lymphocytes T	61
6.	ARTICLES ET ANNEXE	62
6.1	Article I	62
6.2	Article II	107
6.3	Article III	156

6.4 Annexe I	201
DISCUSSION	213
7. L'IFN-γ, une question de dose et de lieu - Article I	213
7.1 L'IFN- γ , hématolympopoïèse et homéostasie, hypothèses et discussion	214
7.1.1 La prolifération et l'apoptose	215
7.1.2 La programmation	216
7.2 IFN- γ et organes cibles de la GVHD, mécanismes à entrevoir	217
7.2.1 Le système hématopoïétique comme cible	217
7.2.2 La densité antigénique et la GVHD, implications pour l'immunologie Anti-tumorale	218
7.2.3 Toxicité directe sur les tissus cibles	219
8. L'axe TGF-β/SMAD3, la GVHD et la physiologie des lymphocytes T (Article II, III et Annexe I)	220
8.1 Impact de SMAD3 sur la GVHD	220
8.2 Les sous-types cellulaires "non-T" et la GVHD	221
8.2.1 La réponse innée et la GVHD	221
8.2.2 Les neutrophiles comme nouveaux joueurs de la GVHD	222
8.3 SMAD3 et les lymphocytes T	224
8.3.1 Les phénotypes Th, la régulation et la GVHD	225
8.4 Quels pourraient être les fondements de l'effet tolérogène de SMAD3	226
9. Perspectives générales sur la signalisation cytokinique dans les processus complexes	229

10. Pertinence et applications	231
CONCLUSION	234
BIBLIOGRAPHIE	236

Liste des publications

Les publications présentées dans cette thèse sont les suivantes :

ARTICLE I:

Delisle JS., Gaboury L., Bélanger MP., Tassé É., Yagita H., Perreault C.,

Graft-versus-host disease causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in interferon- γ receptor-deficient hosts, *Blood*. 2008;112:2111-2119

ARTICLE II:

Giroux M.*, Delisle JS.*, Gauthier SD., Heinonen KM., Hingsinger J., Houde B., Gaboury L., Brochu S., Wu J., Hébert MJ., Perreault C.,

SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocyte-mediated tissue damage, *En cours de revision, Blood*.

*Contribution égale en tant que premiers auteurs.

ARTICLE III:

Giroux M., Delisle JS., O'Brien A., Hébert MJ., Perreault C.,

T cell activation leads to protein kinase C θ -dependent inhibition of TGF- β signaling, *Journal of Immunology*, *sous presse*.

Liste des figures et tableaux

<u>Figure 1.</u> Schématisation du modèle hiérarchique et pyramidal de l'hématopoïèse.	14
<u>Figure 2.</u> Environnement cytokinique et différenciation lymphocytaire T.	21
<u>Figure 3.</u> Représentation de la réponse adaptative.	24
<u>Figure 4.</u> L'IFN- γ R et la voie signalétique de l'IFN- γ .	44
<u>Figure 5.</u> La voie signalétique canonique du TGF- β .	50
<u>Figure 6.</u> Régulation de la voie TGF- β /SMAD.	51
<u>Figure 7.</u> Survol des fonctions principales du TGF- β en immunité.	55
<u>Tableau I.</u> Influences cytokiniennes principales et différenciation Th.	19
<u>Tableau II.</u> Effets de TGF- β connus comme étant SMAD3-dépendants dans les sous-types de cellules immunitaires.	56

Liste des abréviations

ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AHCT	<i>Allogeneic hematopoietic cell transplantation</i> – Greffe allogénique de cellules hématopoïétiques
AKT	Protéine kinase B
AMPK	<i>5' adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i> - Cellule présentatrice d'antigène
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
BAMBI	<i>BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog</i>
Blimp-1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
Cbl-b	<i>Casitas B-lineage lymphoma-b</i>
CBP	<i>Core-binding protein</i>
CD40L	CD40 ligand
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CR3	Complément récepteur 3
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4</i>
DHR	Di-hydro Rhodamine
Eomes	Eomesodermine
ER	<i>Estrogen receptor</i> - Récepteur de l'œstrogène
FasL	<i>Fas ligand</i>
FcγRIIa	CD32. Récepteur de la partie Fc (<i>Fragment crystallizable region</i>) des immunoglobulines.
FKBP12	<i>FK binding protein 12</i>
FOXO	<i>Forkhead box O-type</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
GAS	<i>Interferon-gamma activated sequence</i>
GATA3	<i>GATA binding protein-3</i>
GVHD	<i>Graf-versus-host disease</i> - Maladie du greffon contre l'hôte
GVT	<i>Graft-versus-tumor</i> - Effet greffon contre tumeur
HFE	High Fe (Fer)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICAM-1	<i>Inter-cellular adhesion molecule 1</i>
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN-γ	Interféron-gamma
IFN-γR	Récepteur de IFN-γ
IFN-γRI/II	Chaîne I ou II du récepteur à l'IFN-γ
IL-	Interleukine
IL-12R	Récepteur de l'IL-12
IL-1RA	<i>IL-1 Receptor antagonist</i> - Antagoniste du récepteur à l'IL-1
iNOS	<i>Inducible Nitric oxide synthase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>

ITK	<i>IL-2 inducible T cell kinase</i>
JAK	Janus kinase
KDa	Kilo Dalton
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
KIR	<i>Killer immunoglobulin-like receptors</i>
KLRG1	<i>Killer cell lectin-like receptor G1</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LAP	<i>Latency associated peptide</i>
LPS	Lipo-polysaccharide
LSKF	<i>Lineage negative, Sca-1 positive, c-kit positive, FLT3 ligand receptor negative or positive</i>
LTBP	<i>Latent TGF binding protein</i>
Lymphocytes $\gamma\delta$, $\alpha\beta$	Lettre grecque référant au type de chaîne du TCR.
MAdCAM	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule</i> <i>Microbe-associated molecular pattern</i> - motifs moléculaires associés aux microbes
MAMP	
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mb	Megabases
MBL	<i>Mannan-binding lectin</i>
mHAg	Antigène mineur d'histocompatibilité
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexe majeur d'histocompatibilité
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein-1 alpha</i> <i>Memory precursor effector cells</i> - Cellules effectrices précurseuses de cellules mémoires
MPEC	
MPO	Myéloperoxidase
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cell</i> - Facteur nucléaire des cellules T activée
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>NK T cell</i>
NO	<i>Nitric oxide</i> - Oxyde nitrique
NOD2/CARD15	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2/caspase recruitment domain family, member 15.</i>
Par6	<i>Abnormal embryonic partitioning-6</i>
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIAS1	<i>Protein inhibitor of activated STAT-1</i>
PKC θ	Protein-kinase C Theta
PP2A	Protéine phosphatase 2
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i> - Récepteur de reconnaissance de motifs
PTP	Protein-tyrosine phosphatase
ROR γ t	<i>nuclear receptor ROR-gamma</i>
R-SMAD	SMAD associé au récepteur
SBE	<i>SMAD-binding element</i>
SLEC	<i>Short-lived effector memory</i> - Cellules mémoires effectrices de courte vie
SMAD3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>

SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	Signal transduction in activated T cells
T	lymphocytes T
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> -récepteur des cellules T
TGF- β	<i>Transforming growth factor-béta</i>
TGF- β R	Récepteur du TGF- β
TGF- β RI/II	Chaînes I ou II du récepteur du TGF- β
TGIF	<i>TGF-β induced factor</i>
Th	<i>Helper T cell</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i> - Récepteur Toll-like
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor - alpha</i>
TReg	Lymphocytes T CD4 régulateurs
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> - Récepteur de la vitamine D
Wnt	<i>Wingless</i>
WT	<i>Wild type</i> (type sauvage)
YB-1	<i>Y-box binding protein 1</i>

Remerciements

Je voudrais souligner la très grande contribution de mon superviseur, Claude Perreault à mon cheminement scientifique. Je tiens à le remercier pour tous les conseils, tout le support et tout l'enthousiasme (et probablement aussi toute la patience) dont il a fait preuve. Aux membres du laboratoire, je voudrais aussi témoigner ma gratitude pour toutes ces années de camaraderie et d'émulation. À Martin Giroux, associé de « l'axe TGF- β » du laboratoire et compagnon de fortune et d'infortune, je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance pour tout ce qu'il m'a appris, dont les joies du travail d'équipe en science.

J'aimerais aussi remercier les docteurs Le Deist, Prat, Girard et Ahmad pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je salue aussi ma famille, parents et amis pour un support continu et indéfectible. En tout premier lieu Isabelle ma conjointe, épice de bonheur, qui a toujours pu me supporter, surtout ces dernières semaines malgré son horaire chargé, ainsi que nos trois merveilleux enfants Ariane, Charles-Antoine et Louis-Philippe.

Introduction

L'objectif principal des travaux contenus dans cette thèse était de mieux cerner l'impact de l'IFN- γ et de SMAD3, un médiateur central de la voie signalétique du TGF- β , dans la reconstitution et la physiologie des cellules hémato-lymphoïdes après une greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques.

Il est difficile d'esquisser un portrait simple de quelque chose de complexe. Cette introduction se veut être une description concise et intelligible de notre système immunitaire et de l'alloréactivité. Le but est de mettre en contexte les observations faites dans les manuscrits ci-joints en approfondissant certains éléments par rapport à d'autres.

Les actions de l'IFN- γ et du TGF- β coordonnent de façon cohérente plusieurs des mécanismes décrits dans ce survol de la physiologie de la réponse immunitaire et nous insisterons sur ces processus. La dernière section de l'introduction décrit sommairement les travaux originaux inclus dans cette thèse en insistant sur les connaissances nouvelles qu'ils apportent.

1-La réponse immunitaire

1.1-Système immunitaire inné et adaptatif¹

Notre système immunitaire doit nous protéger contre les agents infectieux. Pour accomplir cette tâche monumentale, notre organisme a intégré des outils cellulaires et moléculaires tout au long de l'évolution. De façon remarquable, cet amalgame de fonctions agit de façon coordonnée. Les théoriciens modernes de l'immunité ont élaboré deux modèles non-exclusifs, lesquels articulent la réponse immunitaire à partir de deux points de départ distincts. Ainsi, selon les modèles disponibles, notre système immunitaire répond à ce qui est dangereux² et/ou à ce qui est étranger^{3,4}. Les données actuelles nous permettent de croire que ces deux types de reconnaissances co-existent, souvent simultanément⁵. Une analyse des deux modèles est toutefois utile afin de conceptualiser la compartimentation (non-étanche) de notre système immunitaire. En effet, les signaux de danger semblent initier la réponse immunitaire en agissant sur les cellules du système « inné », apparu plus précocement dans

l'évolution et les déterminants étrangers (non-soi), quant à eux, stimulent les cellules du système immunitaire adaptatif.

1.1.1 Immunité innée.

Les cellules du système immunitaire inné et adaptatif sont des cellules du système hématopoïétique, qui ontologiquement ont toutes la même origine, la cellule souche hématopoïétique⁶ (Figure 1).

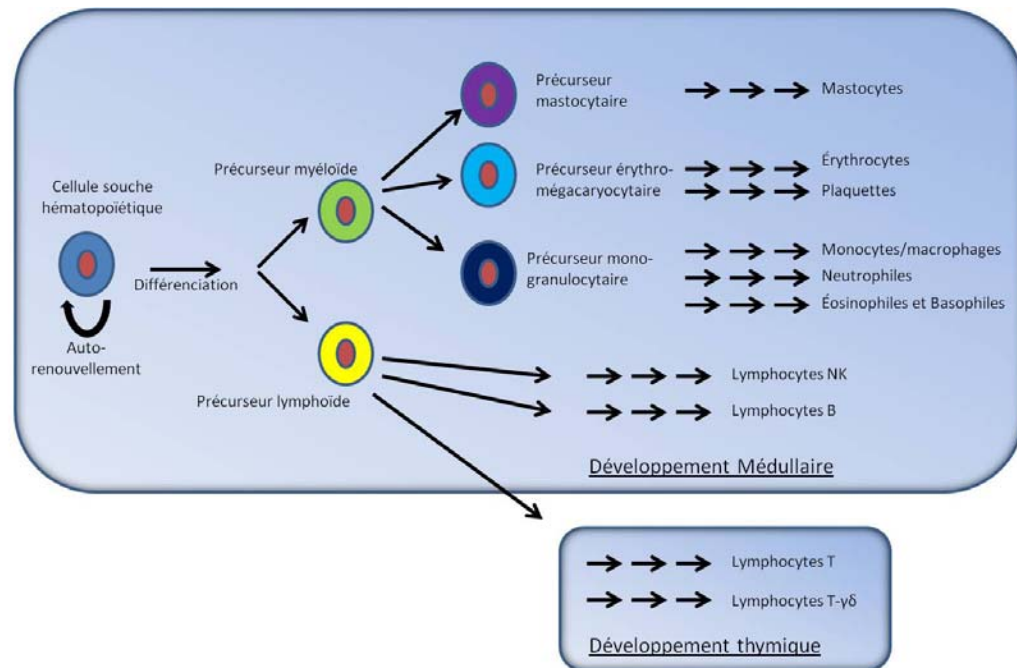


Figure 1. Schématisation du modèle hiérarchique et pyramidal de l'hématopoïèse. Les flèches indiquent les étapes de différenciation ou d'auto-renouvellement de façon sommaire. Inspiré de⁶

Les cellules du système inné sont les granulocytes, les macrophages et des sous-types de cellules lymphoïdes (NK, lymphocytes- $\gamma\delta$). La fonction de ces cellules est de reconnaître, de détruire des cellules présentant des signaux de danger, de propager la réponse immunitaire (vers d'autres cellules du système inné ou vers les cellules du système adaptatif) et de participer à la réparation et au remodelage des tissus après l'élimination du « danger ». Les cellules du système inné (principalement les granulocytes et les macrophages) accomplissent cette tâche grâce à des récepteurs non-polymorphiques^{7,8} (TLR-*Toll-like receptors* and PRR *Pattern recognition receptors*) qui reconnaissent des signaux sous forme de structures moléculaires conservées par l'évolution, provenant de tissus endommagés ou des agents infectieux

eux-mêmes. Ces derniers sont appelés MAMP (*microbe-associated molecular pattern*-Structures moléculaires associées aux microbes)¹. La liaison entre les MAMP et leurs récepteurs amènent des changements profonds chez les cellules du système inné qui faciliteront le développement de fonctions phagocytaires et microbicides notamment par la production de superoxydes⁹. Aussi, certaines de ces cellules vont stimuler la réponse adaptative par la sécrétion de cytokines et en présentant des antigènes aux cellules du système adaptatif (décrit plus bas). Les cellules lymphoïdes du système inné reconnaissent des signaux de stress cellulaire (tel que présents chez une cellule infectée) et procèdent à leur élimination par sécrétion de molécules pro-apoptotiques et de cytokines¹⁰. Les descriptions usuelles du système immunitaire inné rendent compte également de mécanismes non-cellulaires tels les barrières muco-cutanées (organisation tissulaires et molécules anti-microbiennes) et des protéines du complément dont les actions servent à attirer les cellules immunitaires aux sites d'infection (chimiotactisme), ainsi qu'à opsoniser (préparer pour la phagocytose) et lyser les cellules infectées¹.

Chez les vertébrés, le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre les infections. Une conception étroite des cellules innées comme simples initiatrices de la réponse immunitaire n'est cependant plus possible¹¹⁻¹³. La présence et les actions de cellules innées telles les macrophages et les neutrophiles tout au long de la réponse définissent l'inflammation, un état tissulaire complexe résultant en l'accumulation d'effecteurs immunitaires de toutes sortes (médiateurs solubles, cellules, etc.) qui a un impact profond sur l'homéostasie du tissu affecté. En altérant le contexte tissulaire, le système inné influe également sur les cellules du système immunitaire elles-mêmes. Un des impacts les plus déterminants découlant de la réponse innée est la réponse immunitaire adaptative. En effet, une des fonctions des cellules du système inné est d'agir en tant que cellules présentatrices d'antigènes (APC). Un antigène est un déterminant moléculaire précis et unique (contrairement aux MAMP) qui est reconnu par les cellules du système immunitaire adaptatif¹.

1.1.2 Immunité adaptative.

Le système dit adaptatif est caractérisé par six éléments essentiels ; 1) La spécificité (assure une réponse spécifique à des déterminants antigéniques précis), 2) la diversité

(assure une protection contre un vaste ensemble d'antigènes), 3) la mémoire (permet une réponse plus vigoureuse lors d'une ré-exposition à un antigène), 4) la spécialisation (réponse adaptée selon le type de microbe), 5) l'auto-régulation (la capacité de terminer la réponse après l'éradication de l'antigène) et 6) la tolérance au soi (ne reconnaît que les antigènes étrangers et épargne l'hôte lors d'une réponse)¹. Les cellules du système adaptatif sont les lymphocytes B et T, maîtres d'œuvre respectivement de la réponse humorale et cellulaire. Lors de la réponse humorale, les lymphocytes B produisent des anticorps, médiateurs solubles pouvant se lier aux particules et cellules portant l'antigène visé. Une des conséquences de la liaison d'un anticorps sur une particule ou une cellule est la phagocytose ou la lyse par des effecteurs du système inné, soulignant encore une fois le degré de coopération entre les compartiments du système immunitaire. De plus, les messages transmis par les cellules du système adaptatif modifient les fonctions des cellules du système inné. La réponse adaptative cellulaire est celle des lymphocytes T et sera décrite ci-après.

1.2-La réponse immunitaire T

Les précurseurs de lymphocytes T migrent de la moelle osseuse vers le thymus où ils terminent leur différenciation. Plusieurs étapes de sélection font en sorte qu'ils développent un récepteur unique qui pourra interagir avec les APC sans toutefois pouvoir s'attaquer aux antigènes du soi (voir 2.1 et 2.2). Les lymphocytes T génèrent donc *au hasard* (sans avoir préalablement rencontré un antigène étranger) par voie de recombinaison génique un récepteur T (TCR). Cette façon anticipatoire de se préparer à reconnaître des antigènes inconnus est une stratégie unique. On estime jusqu'à 10^9 le nombre d'antigènes pouvant être ainsi reconnus chez un individu¹. Les lymphocytes T quittent le thymus à l'état naïf et circulent, principalement d'un organe lymphoïde à un autre, où ils rencontrent des APC présentant des antigènes.

La réponse adaptative typique s'élabore dans le temps en cinq phases¹, soit les phases de reconnaissance, d'activation, d'élimination, de déclin et de mémoire. La première phase est donc celle de la reconnaissance où le lymphocyte T entre en contact avec l'APC. Suite à ce contact il s'active et se différencie. La reconnaissance et l'activation sont complétées dans les 7 à 10 jours après une exposition à l'antigène. La phase suivante est la phase effectrice durant laquelle l'antigène est éliminé avec la

cellule qui le présente soit l'APC et lors d'une infection, la cellule infectée (10-21 jours). La phase de déclin, ou contraction, chevauche en partie la phase d'élimination et verra plus de 95% des lymphocytes générés mourir par apoptose. Des millions de lymphocytes spécifiques ayant été générés lors de la réponse immunitaire, c'est moins de 5 % qui persistent comme cellules mémoires (la cinquième phase). Celles-ci pourront ré-initier une réponse si elles sont exposées de nouveaux au même antigène. Cette réponse sera plus rapide tout en requérant moins de signaux activateurs¹⁴.

La réponse immunitaire T est au cœur des travaux présentés dans cette thèse et certains aspects sont abordés plus en détails ci-après.

1.2.1 Reconnaissance et activation

Le contact entre les APC et les lymphocytes T est la clef de voûte de toute la réaction immunitaire adaptative^{15,16}. En effet, les messages reçus lors de cette rencontre déterminent plusieurs fonctions lymphocytaires à long terme¹⁷. Il est donc utile de rappeler ici l'hypothèse des deux signaux¹⁸, paradigme dominant au sujet de l'activation des lymphocytes T. Par le TCR, le lymphocyte T s'assure de pouvoir reconnaître un antigène de façon spécifique. Tous les antigènes n'étant pas nécessairement nocifs, une reconnaissance par le TCR peut amener une anergie (tolérance) ou une activation selon un second signal. Ce second signal est amené par l'APC selon le type et le degré d'activation de cette dernière. De façon typique, une APC exposée à des MAMP tel le lipo-polysaccharide (LPS-indiquant la présence de bactéries), exprime des molécules de co-activation activatrices (les mieux décrites étant B7-1 et B7-2) qui interagissent avec des récepteurs indépendants du TCR sur le lymphocyte T (le ligand de B7-1 et B7-2 est CD28)^{1,19}. Ce second signal ajoute à la spécificité du système adaptatif en traduisant le signal de « danger » détecté par l'APC²⁰. Aussi, il est utile de savoir que les lymphocytes T activés peuvent exprimer des récepteurs (ex : CD40L) et sécréter des cytokines (ex : IFN- γ) capables d'amener l'activation des APC^{21,22}. Cette interaction à double sens constitue le lien le plus fondamental entre le système inné et adaptatif. Le modèle des deux signaux est conceptuellement utile, mais représente une grossière sous-estimation des relations multiples qu'entretiennent les lymphocytes T et les APC, notamment via les cytokines (que plusieurs auteurs appellent le troisième signal)^{17,23}.

Ainsi, suite à une stimulation du TCR dans un contexte de co-stimulation favorable, un vaste enchaînement de cascades biochimiques et transcriptionnelles va bouleverser les fonctions cellulaires et induire un programme de différenciation précis. Rapidement, on assiste à un influx majeur d'ions calcium dans le cytoplasme²⁴. L'orchestration de l'activation lymphocytaire est tributaire des facteurs de transcriptions NFAT dont l'activation dépend de la calcineurine, une protéine activée par le calcium²⁵. De plus, le calcium aurait un rôle important dans l'initiation de la prolifération en induisant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*)²⁶. Le lymphocyte naïf activé doit entre autre s'engager dans une prolifération titanesque, qui est supportée par plusieurs cytokines dont la mieux connue est l'IL-2, sécrétée par les lymphocytes T eux-mêmes de façon NFAT-dépendante. Au cœur de cette prolifération et activation, nous observons aussi une réaffectation des voies métaboliques. Un métabolisme quiescent, reposant sur la phosphorylation oxydative et le catabolisme, se transforme en un métabolisme glycolytique, rendant ainsi les autres substrats (lipides et acides aminés) disponibles pour l'effort anabolique requis (synthèse de membranes, acides nucléiques, etc.)²⁷.

1.2.2 Différenciation

Le destin des lymphocytes T lors d'une réponse immunitaire a été un sujet d'intenses recherches au cours des dernières années. La différenciation des lymphocytes T CD4 est même devenue une référence lorsqu'on aborde les concepts de plasticité et de *lineage commitment* (engagement irréversible vers un phénotype donné). Le lymphocyte T CD4 est le coordonnateur de la réponse immunitaire. Au premier chef, il active le lymphocyte T CD8 directement et indirectement via des signaux transmis aux APC^{22,28,29}. Certaines données nous laissent également croire que les lymphocytes T CD4 peuvent avoir des fonctions cytotoxiques directes^{30,31}.

Principal interacteur des APC, le lymphocyte T CD4 transmet ses directives aux autres cellules par voie de cytokines et de récepteurs membranaires. La nature de ces signaux dépend de sa différenciation selon 4 schèmes principaux ; Th1, Th2, Th17 (h pour *helper*) et Treg. L'hétérogénéité des sous-types Th est bien plus vaste (Th9, Th22, Tfh, etc.) et le sera vraisemblablement davantage³². On appelle ces lymphocytes Th des cellules *helper* compte tenu du rôle qu'elles ont sur les autres

effecteurs du système immunitaire. C'est l'environnement (surtout cytokinique³³) et la force du signal reçu par le TCR qui dictent principalement (mais non-entièrement) le choix de différenciation du lymphocyte T CD4. Le Tableau I résume et la Figure 2A illustre ces influences principales. Un article de revue récent et exhaustif³² met en relief l'extraordinaire complexité et souplesse de cette différenciation. En effet, les profils de différenciations Th ne sont ni exclusifs, ni définitifs³⁴. La base fondamentale de cette hétérogénéité et plasticité est l'organisation de la chromatine à certains locus^{33,35}. Ainsi, l'organisation de la chromatine des gènes nécessaires à une différenciation donnée est, ou bien silencieuse, silencieuse mais permissive (*poised*) ou bien active et accessible. C'est une suite d'évènements impliquant des facteurs de transcriptions et des enzymes modifiant les histones ou l'ADN qui contribuent à « solidifier » l'identité Th dans des contextes où une telle chose est nécessaire. Ultimement, l'identité Th se traduit par une marque épigénétique qui est transmissible aux cellules filles lors de la division cellulaire.

Tableau I. Influences cytokiniennes principales et différenciation Th. (selon³²)

	Signaux initiateurs principaux	Signaux propagateurs principaux	Facteur de transcription principal	Cytokine(s) produite (s) De façon exclusive
Th1	IL-12, IFN- γ , Signal TCR fort	IL-12, IFN- γ , IL-18	T-bet	IFN- γ
Th2	IL-4, IL-2, Signal TCR faible	IL-33, IL-7, TSLP, IL-4	GATA-3	IL-4, IL-5, IL-13
TReg	IL-2, TGF- β (haute concentration)		FoxP3	TGF- β
Th17	IL-6, TGF- β (faible concentration), IL-21	IL-1, IL-23, IL-21	ROR γ t	IL-17A, IL-17F, IL-22

Les réponses immunitaires coordonnées par les sous-types Th1 et Th2 diffèrent grandement. Aussi, les programmes transcriptionnels qui supportent l'une ou l'autre des différenciations ne sont pas seulement différents, mais ils s'antagonisent. Le facteur de transcription GATA-3, maître d'œuvre de la différenciation Th2, est exprimé à des niveaux détectables chez les cellules T naïves³⁶. Suite à une stimulation par l'IL-4, l'expression de GATA-3 sera augmentée, mais sera réprimée dans un contexte favorable à la différenciation Th1 (Figure 2A). Ainsi, GATA-3 réprime la transcription de STAT4, un facteur de transcription au cœur de la signalisation de

l'IL-12³⁷. L'IL-12 induit T-bet, orchestrateur de la différenciation Th1 (Figure 2A), qui lui réprime directement GATA-3³⁸. Cet antagonisme s'exerce aussi à l'aide de facteurs de transcription secondaires^{32,39}. Avant même d'atteindre la chromatine, des interactions protéine-protéine peuvent contribuer à l'antagonisme T-bet/GATA-3. Ainsi, la phosphorylation de la tyrosine 525 de T-bet par ITK permet à T-bet d'inactiver GATA-3 en s'y liant⁴⁰. Les antagonismes entre ROR γ t et FoxP3, spécifiant la différenciation Th17 et TReg respectivement en présence de TGF- β sont plus flous, mais une interaction directe entre FoxP3 sur ROR γ t⁴¹ inhibe ce dernier. Le lymphocyte sécrétera éventuellement ses propres facteurs de différenciation et antagonisera le programme de différenciation rival (Figure 2A). Outre le blocage d'un programme opposé, plusieurs boucles de rétroaction positive cimentent peu à peu une différenciation Th donnée. Le cas de la régulation de la différenciation Th1 et de l'IFN- γ , acteurs fondamentaux des deux principaux articles inclus ci-après, illustre très bien ce phénomène. En effet, l'IL-12 produite par les APC (cellules dendritiques et macrophages surtout), stimule STAT4 qui induit directement l'IFN- γ , IL-12R et T-bet chez les lymphocytes T^{37,38}. L'IFN- γ induit STAT4⁴². La signalisation IFN- γ via STAT1 augmentera davantage la transcription de T-bet⁴³. T-bet et Eomes participeront ensuite à la production maximale d'IFN- γ ⁴⁴. Ainsi, au cours du processus, la sensibilité à l'IL-12 et à l'IFN- γ (ainsi qu'à d'autres facteurs tel l'IL-18³²) s'accroît progressivement et si les signaux le dirigeants vers d'autres schèmes Th sont moins abondants ou inhibés, le lymphocyte T CD4 complètera sa différenciation Th1. On estime à 4 divisions le temps que requiert un lymphocyte T CD4 naïf pour terminer sa différenciation *in-vitro*⁴⁵. Cette régulation, faite de multiples boucles de rétro-action positives et d'antagonismes sélectifs dans un contexte de stimulation favorable soutenue et renforcée⁴⁶ (par l'environnement et le lymphocyte CD4 lui-même), semble permettre un certain contrôle tout en accordant un changement de programme si l'environnement change. Cette plasticité ne s'exerce pas seulement lors des étapes initiales de la différenciation Th. Il semble en effet de plus en plus plausible que même les lymphocytes T CD4 parfaitement différenciés peuvent adopter des fonctions et phénotypes typiques de d'autres schèmes Th selon les signaux ambiants⁴⁷. Le meilleur exemple est la fluidité des schèmes Th1-Th17 et

Treg que nous reprendrons aux points 4.1.2 et 4.3.2 alors que nous aborderons les aspects physiologiques de l'IFN- γ et du TGF- β .

Chez les lymphocytes T CD8, la somme des évidences nous indique que les schèmes de différenciation selon le type de cytokines sécrétées sont plus flous⁴⁸⁻⁵⁰. Les mécanismes d'induction de l'IFN- γ demeurent analogues (avec une importance accrue d'Eomes par rapport à T-bet). Cependant, ces deux facteurs de transcription sont des joueurs de premiers plans dans la formation des lymphocytes T CD8 mémoires⁵¹ (Figure 2B).

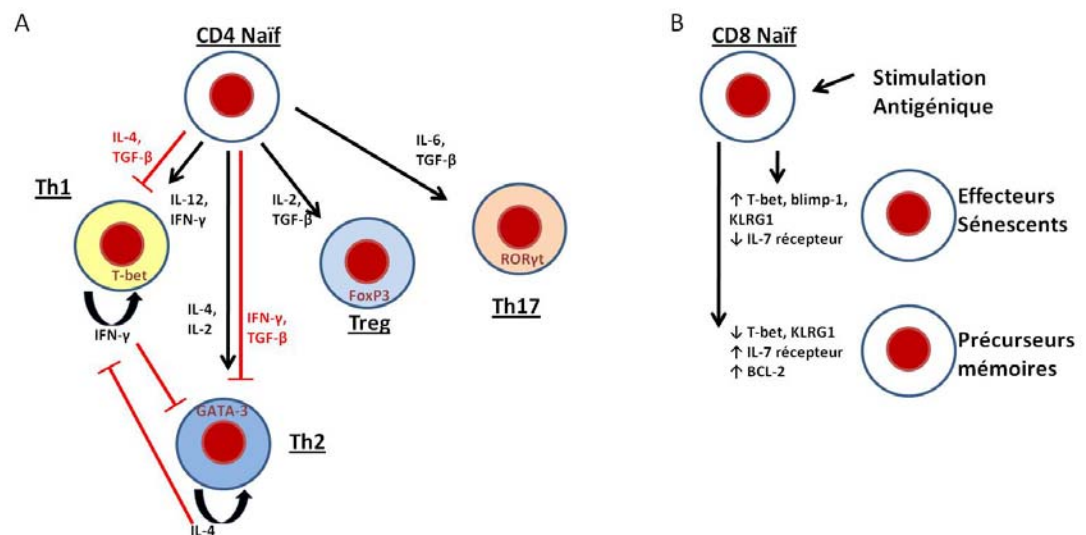


Figure 2. Environnement cytokinique et différenciation lymphocytaire T. A) Résumé des aspects abordés dans le texte. Les signaux régissant les différenciations Th positivement et négativement sont en noir et rouge respectivement. B) Illustration des aspects de différenciation des lymphocytes T CD8 abordés dans le texte. Les flèches indiquent les niveaux relatifs d'expression.

1.2.3 Contraction et mémoire

La contraction de la réponse immunitaire est cruciale afin de maintenir l'homéostasie immunitaire. En effet, la survie prolongée d'effecteurs pourrait mener à des dommages tissulaires importants par réactivité croisée avec des antigènes du soi et la sécrétion de cytokines pro-apoptotiques. Lors de cette contraction, des mécanismes d'apoptose extrinsèque (par récepteurs de mort cellulaire tel Fas) et intrinsèque (voie mitochondriale) sont mis à contribution⁵². De façon remarquable, les signaux reçus au début de la réponse immunitaire préparent non seulement le décours de celle-ci, mais

aussi sa fin¹⁷. Il y a donc dans le développement de la réponse adaptative une importante notion de programmation⁵³.

La formation d'effecteurs et de cellules mémoires est une étape cruciale de la réponse T. Plusieurs auteurs ont tenté de caractériser ce qui se passe après une activation chez les lymphocytes T CD8. À ce jour la description la plus exhaustive nous est donnée par l'équipe de Susan M. Kaech⁵⁴. Selon le modèle proposé (Figure 2B), la plupart des effecteurs CD8 deviendront sénescents et mourront par apoptose. Ces effecteurs expriment des niveaux élevés de T-bet, de blimp-1, de KLRG1 (un marqueur connu de sénescence) et de faibles niveaux d'IL-7 récepteur. Un profil similaire caractérise les cellules mémoires-effectrices de courte durée de vie (*short-lived effector memory-SLEC*). À l'autre bout du spectre, les précurseurs de cellules mémoires centrales (*Memory precursor effector cells – MPEC*), expriment peu de T-bet⁵¹. La distinction entre cellules T CD8 qui formeront des effecteurs ou des cellules mémoires semble se produire assez tôt⁵⁵⁻⁵⁷. Un groupe propose même que cette distinction se fait dès la première division par voie de division asymétrique⁵⁸. Ainsi, le paradigme actuel dominant est que les destins cellulaires sont fixés dès la stimulation initiale (différenciation divergente), plutôt qu'en cours de réponse (différenciation linéaire)⁵⁹. La formation de cellules mémoires chez les sous-types CD4 Th pourrait cependant davantage obéir aux deux modèles car on a pu démontrer que des cellules effectrices, donc produisant des cytokines de types Th1 ou Th2, peuvent devenir des cellules mémoires après transfert adoptif (transfert chez un hôte non-exposé à l'antigène)^{60,61}. Cependant, une interaction initiale longue (plusieurs heures) avec l'APC ainsi que des signaux TCR et cytokiniens forts semblent être déterminants pour la génération de la mémoire CD4^{59,62}.

1.3-La tolérance et l'homéostasie

La tolérance au soi est une des caractéristiques fondamentales du système adaptatif. Ceci dit, cette propriété est tributaire de nombreux mécanismes distincts dont les dysfonctionnements peuvent s'avérer catastrophiques⁶³. Les lymphocytes B et T doivent être contenus afin de ne pas induire d'autoimmunité. Nous focaliserons sur les lymphocytes T qui, dès leur ontogénèse dans le thymus, sont soumis à une sélection rigoureuse qui permet l'élimination des clones dont la réactivité au soi est

forte (revu dans⁶⁴). L'ensemble des étapes critiques à la génèse de lymphocytes T non auto-réactifs, ainsi que la génération de Treg dits « naturels » (nTReg) parce que formés dans le thymus, constituent les mécanismes de la tolérance centrale et ne seront pas développés dans cette thèse.

1.3.1 La tolérance périphérique.

La tolérance centrale est imparfaite et incomplète¹⁵. Certains clones auto-réactifs s'échappent du thymus et peuvent reconnaître des auto-antigènes en périphérie. Ainsi, un vaste arsenal de mécanismes existe afin de préserver les tissus du soi. Globalement, l'ensemble de ces mécanismes sous-tendent la tolérance dite périphérique. En étant principalement retenus dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate), les lymphocytes T naïfs potentiellement auto-réactifs sont tenus à l'écart des organes où ils pourraient rencontrer des auto-antigènes (ignorance des auto-antigènes¹). De plus, il appert que dans les organes lymphoïdes secondaires des cellules non-hématopoïétiques peuvent présenter des auto-antigènes de façon non-immunogénique, afin de tolérer les cellules T de façon analogue à ce que l'on voit dans le thymus⁶⁵. Tel que mentionné précédemment, c'est la présentation antigénique par les APC qui est fondamentale au maintien de la tolérance. Celle-ci est largement dépendante de l'état d'activation des APC, dont les principales sont les cellules dendritiques⁶⁶. L'interaction des lymphocytes T avec des APC tolérogènes mobilise plusieurs mécanismes intrinsèques aux lymphocytes T qui sont aussi essentiels au maintien de la tolérance au soi. Ces molécules qui contrôlent l'activation T appartiennent à différentes familles qu'il est inutile ici de décrire de façon exhaustive¹⁹. Les mieux définies sont cbl-b (*casitas B-lineage lymphoma-b*) et Itch, des ubiquitine ligases ainsi que les récepteurs de surface CTLA-4 et PD-1. Cbl-b et Itch, contribuent à la dégradation d'intermédiaires de signalisation en aval du TCR par le système ubiquitination/protéasome⁶⁷. Les récepteurs de co-stimulation négative CTLA-4 (qui interagit tel CD28 avec B7-1 et B7-2, mais amène des phénotypes opposés) et PD-1, inhibent la prolifération et l'activation et peuvent même induire l'apoptose chez des lymphocytes T activés^{15,68}. De plus l'expression continue de ces ligands maintient les cellules T dans un état d'anergie (ne pouvant être ré-activées). Cette dernière forme de tolérance est la tolérance adaptative, où la reconnaissance

d'un antigène n'est pas bloquée mais la réponse à celui-ci contrôlée. Dans un contexte physiologique, cette forme de tolérance s'observe lorsqu'un antigène persiste sans être éliminé (typiquement lors d'infection virales persistantes)^{69,70}. On dit alors que la réponse s'épuise (*exhaustion*). La stimulation chronique amène aussi la stimulation des voies apoptotiques mitochondriales et Fas-dépendante, menant à la délétion des cellules T antigène-spécifiques^{71,72}. Les mécanismes d'apoptose sont aussi mobilisés lors d'une réponse immunitaire normale tel que décrit plus haut et contribuent à l'homéostasie immunitaire. La figure 3 schématise la réaction immunitaire adaptative en insistant sur les contrôles homéostatiques dans le temps.

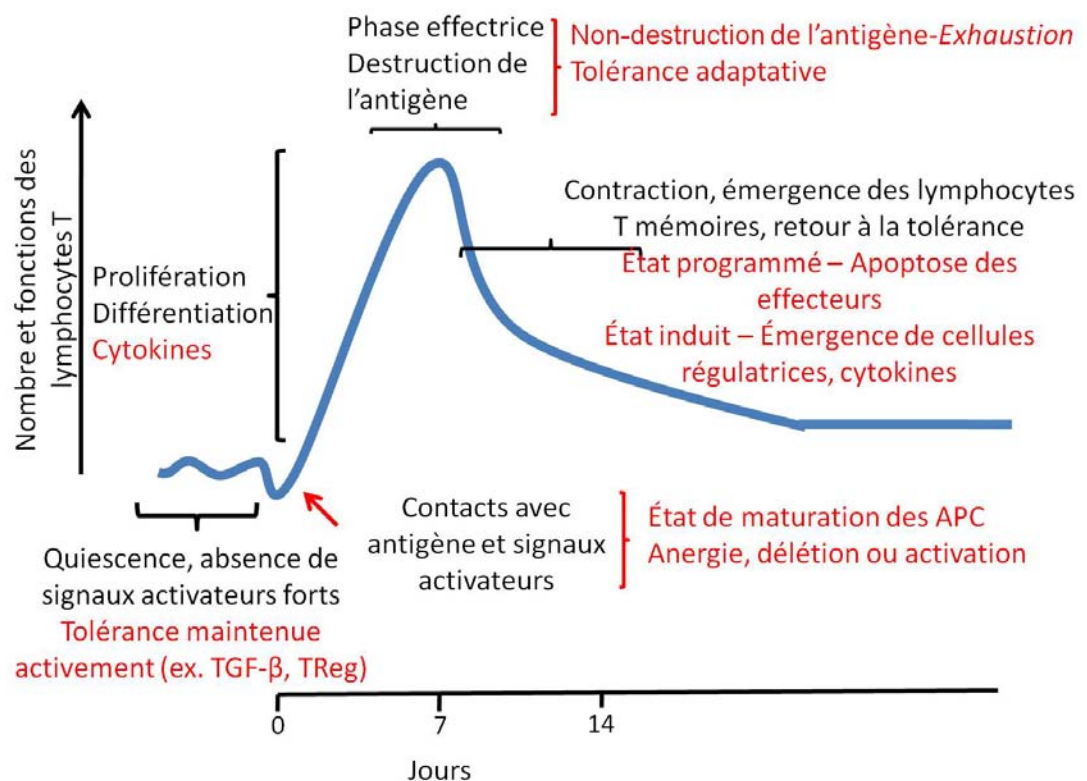


Figure 3. Représentation de la réponse adaptative. Les 5 phases de la réponse adaptative y sont représentées. Les mécanismes homéostatiques de tolérance sont décrits en rouge.

Outre les APC, d'autres cellules participent à la tolérance en limitant la réponse T. Les lymphocytes régulateurs, dont les plus étudiés sont les TReg⁷³, limitent la réponse T. On évoque aussi que les lymphocytes- $\gamma\delta$, NK et NKT peuvent agir comme régulateurs dans certaines situations⁷⁴⁻⁷⁶. Cette inhibition utilise plusieurs mécanismes de suppression selon le contexte (élimination des APC, sécrétion de cytokines, lyse

des lymphocytes T effecteurs, inhibition par contact direct, etc.). Plusieurs sous-types de cellules myéloïdes contribuent aussi à inhiber la réponse T. Les neutrophiles⁷⁷ et les macrophages⁷⁸ peuvent notamment se montrer immunosuppresseurs après une polarisation qui n'est pas sans rappeler la dichotomie Th1/Th2. Un groupe hétérogène de cellules appartenant à la lignée myéloïde semble même se spécialiser dans la suppression de la réponse T adaptative (revu dans⁷⁹). En effet, les cellules myéloïdes suppressives (*Myeloid-derived suppressor cells*) utilisent notamment la production de superoxydes et de NO (via *Inducible nitric oxide synthase* (iNOS)) ainsi que la déplétion d'arginine afin de freiner la prolifération des lymphocytes T (via l'action de l'arginase-1). La déplétion d'acides aminés et l'action des produits de leur dégradation est d'ailleurs un thème important en immunorégulation depuis la caractérisation de la dégradation du tryptophane en kyurénines par l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO), exprimée dans des sous-types de cellules dendritiques et tumorales⁸⁰. Plusieurs cytokines répriment également les cellules immunitaires, dont les plus connues sont l'IL-10 et le TGF- β . L'IL-10 mériterait qu'on lui consacre toute une thèse, mais nous nous limiterons à dire que cette cytokine est centrale dans le contrôle de la réponse immunitaire contre les pathogènes afin de préserver l'hôte⁸¹. Nous pouvons aussi nous servir de cet exemple afin de mentionner que l'IL-10 est au cœur d'une boucle de rétroaction négative, car parmi les sécréteurs principaux de cette cytokine, nous trouvons les lymphocytes T CD4 Th1⁸². Le rôle de TGF- β dans l'immunité est abordé au point 4.3.2. De plus, les relations tolérogènes entre les cellules innées et adaptatives, sont vraisemblablement plus complexes et bidirectionnelles. En effet, nous réalisons que les cellules du système adaptatif peuvent freiner la réponse innée⁸³.

La description faite ici en est une d'une réponse homéostatique idéalisée, faite de nombreuses boucles de rétro-actions positives et négatives afin d'optimiser la réponse immunitaire. L'orchestration des mécanismes pro- et anti-inflammatoires n'est pas si simple. En effet, les mécanismes immuno-stimulateurs et immuno-régulateurs sont souvent enclenchés simultanément et leur coordination n'est pas toujours harmonieuse, ou logique. C'est l'intégration de multiples variables (parfois inconnues) qui agissent dans le temps et dans une certaine gamme dynamique (*dynamic range*), qui semble déterminer les phénotypes^{84,85}.

2- L'histocompatibilité

2.1 L'individualité immunologique

L'histocompatibilité est l'habileté qu'a un organisme de reconnaître et de tolérer ses propres cellules et de les distinguer des cellules étrangères⁸⁶. Ce phénomène universel aux métazoaires s'observe entre les espèces et entre les individus d'une même espèce (à l'exception d'individus ayant le même génome, tel les jumeaux monozygotes). Alors, pourquoi sommes-nous immunologiquement uniques ? La réponse la plus fondamentale que nous pouvons envisager à cette question s'élabore à partir d'études faites chez les protochordates, des organismes marins phylogénétiquement séparés des mammifères par des centaines de millions d'années. L'ascidien *B. schlosseri* possède un système de reconnaissance du soi rudimentaire, mais apparenté au complexe majeur d'histocompatibilité (*Major histocompatibility complex* – MHC) des vertébrés, dont la fonction principale n'est pas de lutter contre les infections, mais plutôt de se protéger contre l'invasion de cellules souches d'espèces apparentées⁸⁶. En effet, cet organisme produit des colonies jointes par un système vasculaire unique qui peuvent fusionner avec des colonies adjacentes. Cette idée de lutte contre le « parasitisme » de cellules souches (*stem cell parasitism*) afin de maintenir une certaine forme d'intégrité, serait donc une base fondamentale à partir de laquelle a évolué le système immunitaire adaptatif.

Chez les vertébrés, les locus du MHC sont les gènes les plus polymorphiques de tout le génome⁸⁷. Il semble même que le maintien de cette hétérogénéité est activement recherché lors de la reproduction sexuée chez les mammifères (au moins chez les souris^{88,89} !). En quoi alors la diversité est-elle utile ? L'explication la plus logique semble être reliée au fait que le MHC chez ces organismes est intimement lié aux mécanismes visant à combattre les infections⁹⁰. En effet, plusieurs allèles polymorphiques de molécules du MHC sont associés à de meilleures réponses contre certaines infections (revu dans⁹¹). Ainsi, une grande hétérogénéité pourrait être à la fois le résultat de pressions sélectives différentes selon les régions et les époques et le meilleur moyen d'assurer à l'échelle d'une population que tous ne présentent pas les mêmes vulnérabilités faces aux infections épidémiques.

L'individualité immunologique n'est donc pas un accident, elle a une longue histoire que les pressions évolutives ont raffinée. Nous décrivons ci-après les déterminants génétiques fondamentaux de l'histocompatibilité chez les mammifères.

2.2 Le MHC

Le MHC comprend les gènes fondamentaux de l'individualité immunologique. Situé sur le chromosome 6 chez l'humain et 17 chez la souris, cette région comprend plusieurs gènes reliés au système immunitaire. Chez l'humain la région du « MHC étendu » comprend 7.6 Mb sur le bras court du chromosome 6. Cette région est sous-divisée en 5 parties et comprend 421 locus, desquels au moins 252 gènes sont exprimés⁸⁷. Notamment, plusieurs de ces gènes jouent des rôles importants dans la réponse immunitaire. La surabondance de gènes « immunologiquement » pertinents à cet endroit demeure un mystère mais pourrait être le résultat de duplications. De plus, la proximité géographique de gènes ayant des fonctions reliées faciliterait leur expression coordonnée. Le MHC comprend aussi des groupes de gènes (*clusters*) d'histones et d'ARN de transfert (tRNA) qui sont très sollicités chez les eukaryotes. Le regroupement de tels gènes avec plusieurs gènes de l'immunité n'est vraisemblablement pas fortuit et suggère un rôle de l'organisation chromosomique dans la physiologie cellulaire et la réponse immunitaire. On décrit la région du MHC comme une région synténique, c'est-à-dire que son organisation est conservée chez les vertébrés⁸⁷. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle la topographie des groupes de gènes s'y trouvant joue un rôle important. De façon globale, le MHC est une région où l'activité transcriptionnelle est intense (*transcriptionnal hotspot*). Aussi, d'un point de vue évolutif, la proximité de séquences « échangeables » entre différents gènes en cis pourrait contribuer à favoriser la diversification de ces locus⁹². Nous nous concentrerons maintenant sur les produits des gènes MHC de classe I et II, piliers de l'individualité immunologique.

2.2.1 MHC de classe I et II

Ainsi, le supergroupe des MHC de classe I chez l'humain comprend plusieurs protéines de la même famille soit les molécules MHC de classe I classiques (HLA-A, HLA-B et HLA-C), ainsi que non-classiques (HFE, HLA-E, HLA-F et HLA-G)⁸⁷.

Les molécules MHC de classe I classiques, polymorphiques, présentent des antigènes aux lymphocytes T CD8. Les molécules MHC non-classiques, quant à elles, sont beaucoup moins polymorphiques mais peuvent toutefois interagir avec des cellules immunitaires, dont les cellules NKT et lymphocytes- $\gamma\delta$ ⁹³. La protéine HFE est liée au métabolisme du fer, mais sa capacité d'activer les lymphocytes T $\alpha\beta$ classiques a été évoquée⁹⁴. Les molécules MHC de classe I sont formées d'une chaîne alpha comprenant 3 domaines, le domaine $\alpha 3$ qui lie la chaîne à la membrane cellulaire et les domaines polymorphiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui forment, entre autres, un site de liaison pour des peptides de 8 ou 9 acides aminés. À la surface des cellules, cette chaîne est liée à la β_2 -microglobuline qui sert de stabilisateur. En effet, les animaux déficients en β_2 -microglobuline n'expriment pas de MHC à la surface des cellules¹. Cependant, les molécules MIC (dont les gènes sont présents dans la région du MHC), polymorphiques et analogues à la chaîne alpha des MHC de classe I⁸⁷, peuvent être exprimés sans lier la β_2 -microglobuline en cas de stress cellulaire. Ceux-ci servent de ligands activateurs aux cellules NK, par liaison avec le récepteur NKG2D⁹⁵. Cette relation entre gènes du locus MHC et l'activation de cellules lymphoïdes dites innées n'est pas sans rappeler le lien entre les MHC non-classiques et l'activation des lymphocytes NKT et $\gamma\delta$. La distinction entre système immunitaire acquis et inné reste donc largement artificielle, représentant davantage un continuum qu'une dichotomie franche.

Les molécules MHC de classe II chez l'humain comprennent HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR. HLA-DR, est avec les molécules MHC de classe I HLA-A et HLA-B, la plus polymorphique de toutes les molécules du MHC. Le groupe des MHC de classe II contient aussi des protéines dites non-classiques⁸⁷. Il s'agit chez l'humain de l'HLA-DM et HLA-DO, qui ne sont pas exprimées à la surface des cellules, mais dont les formes hétérotétramériques participent au transfert de peptides vers les MHC de classe II classiques avant que ceux-ci atteignent la surface de la cellule. Les molécules de classe II sont formées de deux chaînes comprenant chacune un domaine transmembranaire et un domaine liant un peptide. En fait, les deux chaînes sont liées de façon non-covalente et forment un site de liaison pour peptides de longueur plus variable que pour les classes I (typiquement de 13 à 26 acides aminés)^{1,96}.

Ultimement, les MHC de classe II exprimés à la membrane cytoplasmique interagissent avec les lymphocytes T CD4.

La liaison des peptides aux molécules MHC de classe I ou II obéit à des contraintes physico-chimiques précises qu'il serait inutile de décrire ici. Les sites de liaison peptidique sont au cœur de l'individualité immunologique et de la réponse immunitaire adaptative. Les peptides présentés par les molécules du MHC proviennent de l'intérieur de la cellule et sont typiquement insérés aux sites de liaison des molécules du MHC alors que ceux-ci se trouvent dans des organelles intracellulaires. Dans la plupart des cas, les molécules MHC de classe I présentent des peptides provenant de protéines synthétisées de façon endogène à la cellule (protéines du soi ou protéines virales produites à l'aide de la capacité de synthèse de l'hôte) et les molécules MHC de classe II présentent des fragments peptidiques provenant de protéines extérieures à la cellule récemment endo ou phagocytosées. Cependant, par un processus de présentation croisée, les MHC de classe I peuvent présenter des antigènes exogènes⁹⁷⁻⁹⁹ et de nombreux exemples nous indiquent que les MHC de classe II peuvent présenter des peptides endogènes^{100,101}. Ainsi, les peptides associés aux molécules du MHC sont un échantillonnage de l'environnement intérieur et extérieur de la cellule. La présence d'un peptide est essentielle à la stabilité des molécules MHC de classe I et II à la surface de la cellule, suggérant un rôle de premier plan dans la définition du soi. Toutes les cellules nucléées humaines expriment des MHC de classe I, tandis que l'expression des molécules de classe II est restreinte. En effet, seuls quelques sous-types de cellules hématopoïétiques, surtout celles dont le rôle principal est de présenter des antigènes (APC), expriment constitutivement des molécules de classe II¹. Dans des contextes inflammatoires cependant, l'expression des complexes MHC de classe II est augmentée sur les APC et devient beaucoup moins restreinte (cellules endothéliales et épithéliales)^{102,103}.

2.2.2 MHC et interactions cellulaires

Le complexe MHC-peptide à la surface des cellules peut être « lu » par les lymphocytes T. Lors de leur ontogénie dans le thymus, les lymphocytes T développent un TCR dont la fonction principale est de reconnaître les complexes MHC du soi. Plusieurs étapes de sélection veillent à ce que seules les cellules T ayant

une affinité modérée pour les complexes MHC-peptides du soi puissent survivre (revu dans ^{104,105}). Ainsi, les lymphocytes T peuvent se lier aux MHC du soi via leur TCR, mais ceux dont l'affinité est trop forte pour les complexes MHC-peptide du soi sont éliminés afin de ne pas causer d'auto-agression. Dans le thymus, des cellules spécialisées expriment une grande variété de protéines du soi¹⁰⁶ afin de sélectionner négativement (éliminer) les lymphocytes dont le TCR reconnaît avec trop d'avidité les peptides du soi. De cette façon, la présence de peptides provenant de protéines étrangères (virus) ou anormales (protéine dont le gène a été muté lors d'une cancérisation par exemple)¹⁰⁷ peuvent stimuler une réponse de la part de lymphocytes T matures en périphérie.

Les co-récepteurs CD4 et CD8 se lient respectivement aux MHC de classe II et de classe I et ainsi déterminent avec quel type de complexe MHC-peptide interagira le TCR. Il est utile de rappeler que cette distinction est fort éclairante lorsqu'on réexamine les fonctions principales des deux sous-types de cellules T. En effet, les lymphocytes T CD4 interagissent surtout avec des cellules dont une des fonctions principales est de présenter des complexes MHC-peptides dans le cadre d'une réaction immunitaire : les APC. Cette interaction est déterminante et selon les messages reçus alors, le lymphocyte T CD4 coordonnera le reste de la réponse. Les lymphocytes T CD8, quant à eux, reconnaissent le MHC de type I et donc peuvent potentiellement s'attaquer à tous types de cellules nucléées si adéquatement stimulés par les lymphocytes T CD4²⁹, ou lors d'une réponse secondaire par des cellules CD8 mémoires¹⁰⁸. Plusieurs travaux suggèrent que les niveaux d'expression des complexes MHC-peptides sur les cellules cibles déterminent la qualité de la réponse T CD8. Ainsi, une forte expression amènerait une reconnaissance accrue et une lyse. L'augmentation de la densité antigénique (quantité de molécules de classe I chargées de peptides) peut accroître la vulnérabilité d'une cellule tumorale précédemment résistante à l'attaque par des lymphocytes T CD8 spécifiques¹⁰⁹. Également, la perte d'expression du MHC est un mécanisme reconnu qui est utilisé par les virus et les cellules tumorales afin d'échapper aux assauts du système immunitaire¹¹⁰. On attribue plusieurs fonctions aux lymphocytes T CD8¹¹¹, mais leur rôle principal en est un d'effecteur cytotoxique, menant à la lyse et/ou l'apoptose de la cellule qui porte le complexe MHC-peptide reconnu par le TCR. Une partie des travaux inclus ci-après

amène un éclairage nouveau sur l'effet d'une régulation de l'expression des complexes MHC-peptide par l'IFN- γ et la réponse T CD8.

Les molécules du MHC ont d'autres rôles dans le système immunitaire. En effet, ils permettent d'empêcher la lyse par les cellules NK. Les cellules NK, ou *natural killer*, ont hérité ce coquet nom de matamores justement parce qu'elles peuvent tuer toute cellule qu'elles ne reconnaissent pas comme appartenant au soi. Par le biais de certains KIR (*Killer immunoglobulin-like receptors*), la cellule NK peut se lier au MHC des autres cellules et s'inhiber^{13,112,113}. Le système de reconnaissance des MHC par les cellules NK est beaucoup plus complexe et ne sera pas développé davantage dans cette thèse. Toutefois, la réactivité contre le « soi manquant » (*missing self*), demeure une caractéristique cardinale des cellules NK. Aussi, des molécules MHC non-polymorphiques (classe 1b) jouent un rôle dans la présentation de glycolipides endogènes et bactériens aux cellules NKT et aux lymphocytes T $\gamma\delta$ dont les rôles principaux sont de répondre rapidement contre les infections aux barrières muco-cutanées et de propager la réponse immunitaire¹¹⁴.

2.3 Les déterminants immunogénétiques non-MHC de l'histocompatibilité

Les individus non-monozygotes présentant des MHC identiques ne sont pourtant pas immunologiquement identiques. La réponse T dépend du complexe MHC-peptide. Ainsi, l'origine du fragment peptidique est déterminante. Dans le cas d'une infection virale par exemple, ce sont des fragments de protéines virales (étrangères) qui stimulent la réponse. L'identité immunogénétique dépend aussi des peptides dérivés de protéines du soi qui sont présentés par les molécules MHC. Le protéome de chaque individu est différent et les gènes codant pour ces protéines contiennent fréquemment des polymorphismes^{115,116} ou des délétions¹¹⁷ qui ultimement altèrent la séquence (structure) ou la simple présence des peptides portés par les molécules MHC. Lorsque ces différences peuvent stimuler une réponse immunitaire, nous appelons ces déterminants immunologiques des antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHA_g), contrairement aux MHC eux-mêmes que nous appelons des antigènes majeurs d'histocompatibilité. Cette dénomination se justifie par l'envergure de la réponse que génère l'un ou l'autre dans des contextes expérimentaux ou cliniques de greffe¹¹⁸ (voir ci-après aux points 3.1 et 3.2). Malgré

une très grande fréquence de polymorphismes dans le génome humain, très peu de mHAg ont été identifiés¹⁰¹. Si on regarde globalement les mHAg caractérisés chez les humains et la souris, la plupart sont présentés par des MHC de classe I (donc amènent une réponse T CD8) et environ la moitié provient de gènes du chromosome Y¹¹⁹. Ces derniers sont reconnus par des lymphocytes T de femelles n'ayant pas été sélectionnés négativement dans le thymus.

Le complexe MHC-peptide est de loin le principal déterminant des réactions immunitaires des lymphocytes T et par conséquent le pilier de l'individualité immunologique. Cependant, d'autres facteurs déterminés génétiquement contribuent aux réactions immunitaires contre le non-soi (décrites au point 3). En effet, des anticorps naturels existent contre les déterminants ABO (groupes sanguins) et d'autres anticorps peuvent être développés suite à une exposition à des antigènes étrangers¹²⁰ (tel les molécules du MHC ou les produits du chromosome Y chez une femelle exposée à des cellules provenant d'un mâle¹²¹).

3- L'alloréactivité

3.1- La réaction immunitaire contre des alloantigènes

L'alloréactivité est la réaction immunitaire générée contre des cellules ou des tissus qui sont immunogénétiquement disparates. Dans un contexte expérimental ou médical, il s'agit essentiellement de la réaction d'un hôte contre un organe greffé ou de la réaction de cellules immunocompétentes greffées contre un hôte (*Graft-versus-host disease*-GVHD). L'immense diversité des déterminants de l'individualité immunologique, vraisemblablement utile pour protéger une population contre les infections, devient alors un problème d'envergure. En effet, il est très difficile de greffer des tissus étrangers sans que le système immunitaire de l'hôte les rejette. Ceci est regrettable car dans plusieurs cas d'atteinte terminale, les greffes d'organes et de cellules souches hématopoïétiques s'avèrent être des traitements de choix. La greffe d'organes et de cellules hématopoïétiques est un triomphe de la médecine moderne dont les succès sont directement tributaires de notre capacité à limiter l'alloréactivité, notamment la réponse T. En effet, le cœur des approches immunosuppressives actuelles vise les lymphocytes T directement (anticorps déplétants) ou le blocage de

leurs mécanismes d'activation (inhibition de la calcineurine, blocage de l'IL-2, inhibition de la prolifération avec des inhibiteurs de la synthèse des nucléotides ou interférence avec les mécanismes de co-stimulation)¹²². Ces approches amènent plusieurs effets secondaires et de façon évidente, rendent le receveur vulnérable aux infections.

L'alloréponse est différente selon le type de tissu greffé. Nous développerons brièvement les principes autour desquels s'articule notre conception du rejet immunologique d'un organe solide parce qu'ils s'apparentent à une réaction immunitaire anti-microbienne typique où l'hôte tente d'éliminer une entité étrangère. Ensuite, nous verrons comment ces processus s'appliquent à la GVHD.

3.1.1 Mécanismes de rejet

Lors d'une greffe d'organe solide, trois types de rejet peuvent survenir soit : le rejet hyper-aigu, le rejet aigu et le rejet chronique¹²³. Le rejet hyper-aigu survient généralement 48 heures après la greffe, soit bien avant que puisse se développer une réponse immunitaire adaptative. Il s'agit alors d'un rejet vasculaire lors duquel des anticorps du receveur, présents avant la greffe, reconnaissent des épitopes (antigènes) sur les cellules endothéliales du greffon. Les deux types d'antigènes qui sont généralement reconnus sont les polysaccharides des groupes sanguins ABO et les MHC. La liaison de ces anticorps pré-existants déclenche une cascade inflammatoire et thrombotique qui compromet la survie de l'organe. Pour éviter cela, les greffes sont donc faites entre individus ABO compatibles. On cherche aussi à détecter les anticorps anti-MHC en exposant le sérum du receveur potentiel à des cellules dont les types MHC sont connus ou de façon analogue, en faisant réagir le sérum du receveur potentiel contre des leucocytes du donneur potentiel (*cross-match*)¹²⁰. Environ 1% des individus ont des anticorps anti-MHC, mais ce pourcentage est plus élevé chez les gens ayant eu des contacts avec des MHC étrangers (grossesses, transfusions, greffe antérieure). La présence d'incompatibilité ABO ou d'anticorps anti-MHC est considérée comme une contre-indication, mais plusieurs techniques de désensibilisation peuvent nous permettre de franchir cette barrière si elles sont appliquées avant et après la greffe. On évoque principalement la plasmaphérèse, les immunoglobulines intra-veineuses (IVIg), la splénectomie et les anticorps

monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'IL-2 ou le CD20 (Rituximab)¹²⁴. Il est important de rappeler cependant qu'en l'absence d'anticorps anti-MHC de haute affinité (IgG), il n'est pas nécessaire que le donneur et le receveur aient les mêmes allèles du MHC.

Le rejet aigu quant à lui se définit par la présence d'un infiltrat inflammatoire survenant de 5 jours à 3 mois après la greffe. Il est difficile cependant de le catégoriser physiopathologiquement, car il peut se manifester par des infiltrats à prédominance lymphocytaire T ou à prédominance macrophagienne (dans le cas d'une atteinte surtout vasculaire)¹²³. Ceci dit, on évoque dans le rejet aigu une activation des lymphocytes T et le développement d'une réponse cellulaire dominée par l'infiltration de lymphocytes T CD8 activés. Après 3 mois, le type de lésions change. En effet, le rejet chronique comprend une grande hétérogénéité de lésions pathologiques dont le dénominateur commun est toutefois la fibrose et le remodelage tissulaire, témoins d'une inflammation chronique^{125,126}. Aussi, les mécanismes impliqués s'élargissent et s'ajoutent souvent des anticorps anti-MHC¹²⁷. Nous verrons que ce type de distinction dans les mécanismes effecteurs se répète pour la GVHD aiguë et chronique.

Si on exclut le rejet hyperaigu, conséquence d'anticorps pré-formés, les alloantigènes déterminants du rejet sont ceux que reconnaissent les lymphocytes T. Cette reconnaissance peut se faire de façon directe et indirecte^{1,123}. L'alloréactivité directe implique la reconnaissance du complexe MHC-peptide sur les cellules du donneur par le TCR des cellules T du receveur. La réponse initiale serait déclenchée lorsque les APC contenues dans le greffon migrent dans les ganglions lymphatiques du receveur où ils entrent en contact avec les lymphocytes T CD4 et CD8 du receveur. Les lymphocytes T peuvent à la fois réagir contre la partie peptidique et contre la région ne contenant pas de peptide si le donneur n'est pas MHC identique. La contribution de l'un et de l'autre est souvent débattue, mais l'alloréactivité peut clairement être MHC-dépendante et peptide indépendante^{128,129}. Bien qu'il ne soit pas nécessaire d'utiliser des organes MHC-identiques à ceux du receveur, l'impact négatif de la disparité MHC sur la survie à long terme des greffons est indéniable¹³⁰.

La reconnaissance directe est rapide et susceptible de mener à des épisodes précoces de rejet aigu. La reconnaissance indirecte, quant à elle, utilise les APC du receveur, qui assimilent et présentent des antigènes du donneur après, par exemple, la phagocytose de cellules apoptotiques ou nécrotiques du greffon. Une troisième voie de présentation antigénique, appelée semi-directe, est aussi plausible. La démonstration que des complexes protéiques puissent être transférés d'une cellule à l'autre par échange de membrane amène la possibilité que les APC du receveur puissent présenter des antigènes par la voie directe et indirecte en même temps^{123,131}.

Outre l'incompatibilité immunogénétique, d'autres facteurs déterminent la vigueur de l'alloréactivité. Nous nous limiterons à les définir dans le cadre de la greffe de cellules hématopoïétique, contexte expérimental principal des travaux présentés dans cette thèse.

3.2 Greffe de cellules hématopoïétiques

La Deuxième guerre mondiale, dans toute son horreur aura tout de même permis d'accélérer nos connaissances en transplantation (peau et transfusions sanguines) et en biologie des radiations. Les mots histocompatibilité et bombe atomique ne sont pas naturellement associés et pourtant, ils marquent le début de la greffe médullaire tant expérimentale que médicale¹³². L'étude des conséquences désastreuses d'une irradiation massive sur le système hématopoïétique (aplasie irréversible) a permis de comprendre les principes de base gouvernant le transfert de moelle osseuse. En effet, en utilisant des modèles animaux, on a rapidement compris que le transfert de moelle osseuse d'un animal sain à un animal irradié permettait une reconstitution hématologique de type donneur¹³³. Cependant, le transfert de cellules hématopoïétiques allogéniques (*Allogeneic hematopoietic cell transplantation-AHCT*) causait une maladie inflammatoire progressive et létale, la maladie du greffon contre l'hôte (*Graft-versus-host disease - GVHD*). Aussi, il fut rapidement découvert que la proximité génétique entre le donneur et le receveur était beaucoup plus importante qu'en greffe d'organes solides¹³². Malgré cet obstacle d'envergure, qui d'ailleurs perdure toujours aujourd'hui, la greffe médullaire a rapidement pris une place de choix en médecine. La possibilité de remplacer un système hématopoïétique malade par un autre permettait d'ouvrir un nouvel horizon thérapeutique pour des

maladies du système sanguin, les immunodéficiences congénitales, les aplasies congénitales ou acquises et même certaines maladies métaboliques¹³². Cependant, il est à noter que très tôt, le potentiel immunothérapeutique de la greffe pour « rejeter » les cancers, notamment les leucémies, a été évoqué et testé^{134,135}. C'est chez les porteurs de cancers hématologiques que se fait le plus grand nombre de greffes aujourd'hui. En fait des dizaines de milliers de patients doivent la vie à l'effet greffon-contre-tumeur (*Graft versus tumor* GVT) qui représente à ce jour la seule approche d'immunothérapie cellulaire du cancer capable d'éradiquer des néoplasies avancées¹²². Une utilisation plus généralisée de l'AHCT comme traitement des cancers est limitée par deux obstacles majeurs ; 1) Seuls les cancers hématologiques (et certains sous-types plus que d'autres)¹³⁶ ont montré une réponse crédible¹³⁷ à cette forme d'immunothérapie chez l'humain jusqu'à maintenant et 2) la GVHD.

La GVHD limite le choix de donneurs potentiels (haut degré de compatibilité requis), autant que le nombre de receveurs potentiels (complications plus sévères selon l'âge, présence de co-morbidités, etc.). La GVHD est une complication si grave que tous les patients, sauf exception, doivent recevoir un traitement immunosuppresseur dans les premiers mois suivant l'AHCT afin de prévenir la GVHD. La quête de moyens pouvant séparer l'effet GVT de l'effet GVHD (ou au moins atténuer ce dernier) est le défi fondamental de la recherche en AHCT, un leitmotiv répété depuis des décennies.

3.2.1 GVHD, principes

Les principes d'histocompatibilité et les mécanismes de rejet décrits plus haut pour les organes solides s'appliquent à l'AHCT. Dès le milieu des années 1960, Billingham avait identifié trois conditions essentielles au développement de la GVHD soit : 1) la présence de cellules immunocompétentes dans le greffon, 2) l'incapacité pour le receveur de rejeter les cellules du donneur et 3) une histoincompatibilité entre le donneur et le receveur^{138,139}. Le transfert de cellules hématopoïétiques doit se faire chez un hôte immunosupprimé afin que le système immunitaire de celui-ci ne rejette pas les cellules greffées. Ensuite, les lymphocytes T matures du donneur interagissent avec les APC du receveur, reconnaissent des allo-antigènes et s'activent¹⁴⁰. Cette réaction, dépendante des lymphocytes T CD4 et CD8 est essentielle au développement de la GVHD¹⁴¹. Une des méthodes fréquemment utilisée pour

prévenir la GVHD est d'ailleurs la déplétion des lymphocytes T du greffon. L'alloréactivité en AHCT est vigoureuse et est dépendante en grande partie du fait que de nombreux lymphocytes T sont transférés. De plus, rappelons que la compatibilité immunogénétique requise pour assurer le succès de l'AHCT est beaucoup plus grande qu'en greffe d'organes solides. En effet, les incompatibilités MHC sont associées à des taux de mortalité plus élevés et à une incidence de GVHD près de deux fois plus importante^{142,143}. C'est pourquoi, la plupart des greffes se font entre individus ayant les mêmes allèles MHC¹⁴⁴. Les travaux présentés ci-après ont tous été effectués dans des modèles murins où les donneurs et receveurs étaient porteurs des mêmes allèles MHC afin de reproduire le type d'histo-incompatibilité que nous retrouvons majoritairement en AHCT humaine. La réactivité des lymphocytes T post-AHCT est donc tributaire des incompatibilités au niveau des mHAg. Ceci dit, les incompatibilités ABO peuvent amener des réactions d'hémolyse post-AHCT, mais le rejet vasculaire n'étant pas un enjeu lorsqu'on transfère des cellules, elles ne représentent pas une contre-indication à l'AHCT. Aussi, il est utile de mentionner que les trois conditions de Billingham peuvent être réunies dans d'autres circonstances (transfert de lymphocytes T via un organe greffé, transfusions sanguines) pouvant mener à des syndromes de GVHD¹⁴⁵. Nous nous limiterons toutefois à la description de la GVHD dans le contexte de l'AHCT.

Tel que décrit pour les rejets d'organes solides, deux types de syndromes cliniques et histopathologiques caractérisent la GVHD soit : la GVHD aiguë et la GVHD chronique. Arbitrairement on a traditionnellement fixé à 100 jours après la greffe, la délimitation entre GVHD aiguë et chronique. Cette séparation est artificielle et ne rend pas compte de la réalité clinique, notamment parce que des manifestations de GVHD aiguë peuvent survenir bien après le jour 100¹⁴⁶. On peut reconnaître cependant que certaines manifestations sont plus précoces et d'autres plus tardives. Les types d'atteintes cliniques en GVHD aiguë et chronique diffèrent, en partie à cause des processus physiopathologiques sous-jacents. Alors que la GVHD aiguë affecte principalement la peau, le tractus gastro-intestinal et le foie en causant des lésions inflammatoires très cellulaires, la GVHD chronique peut quasiment affecter tous les organes, mais typiquement les surfaces muco-cutanées, les glandes lacrimales et salivaires, le poumon, le foie, les surfaces séreuses et le tractus gastro-

intestinal^{141,147,148}. De façon analogue au rejet chronique en greffe d'organes solides, la GVHD chronique est caractérisée par plusieurs signes d'inflammation chronique, notamment la fibrose.

3.2.2 GVHD aiguë

Selon une revue récente, la GVHD aiguë¹³⁸, se développe autour de quatre acteurs : 1) les déclencheurs, 2) les senseurs, 3) les médiateurs et 4) les effecteurs. Cette énumération ne nous amène rien de fondamentalement nouveau, mais elle offre une plateforme pratique pour décrire la pathophysiologie de la GVHD. Les déclencheurs sont les disparités immunogénétiques dont nous avons parlé ci-haut. Bien qu'elles soient essentielles, les disparités immunogénétiques ne sont pas toujours suffisantes pour provoquer ou moduler l'apparition d'une GVHD. En effet, le contexte dans lequel un antigène est présenté est déterminant. Dans la quasi-totalité des cas, l'AHCT se fait dans un contexte où le receveur est pré-traité afin d'induire une immunosuppression. L'intensité de ce traitement (chimiothérapie et/ou irradiation) peut varier, si on veut par exemple, traiter une néoplasie sous-jacente avant la greffe. Ces traitements amènent la libération de nombreuses molécules reliées à l'apoptose et la nécrose de cellules (proteases, ATP, acide urique, lipoprotéines oxydées) qui agissent de façon analogues aux, et en concert avec, les MAMPs tel le LPS pour amener une activation des APC de l'hôte. Les APC, sont donc les senseurs, c'est-à-dire qu'elles détectent les dommages tissulaires (danger), s'activent et expriment abondamment des complexes MHC-peptides de classe I et II ainsi que des molécules de co-stimulation et des cytokines activatrices, telles l'IL-12 et l'IL-1. La présence des APC de type receveur est essentielle au développement de la GVHD aiguë. Dans cette première phase, les cellules dendritiques de l'hôte sont les principaux senseurs. Ce type d'alloréactivité directe, se produisant d'abord dans les organes lymphoïdes secondaires, est l'image miroir du processus se produisant lors des rejets aigus en greffe d'organes solides. Plus tard, alors que les APC de l'hôte sont graduellement éliminées, les APC dérivées du greffon (donneur) peuvent prendre le relais et présenter de façon indirecte des antigènes du receveur^{149,150}.

Les principaux médiateurs de la GVHD aiguë sont les lymphocytes T. Le greffon non-manipulé contient une grande variété de cellules dont un mélange de

lymphocytes T naïfs et mémoires. Selon la plupart des modèles pré-cliniques étudiés, ce sont les lymphocytes T naïfs qui causent la GVHD¹⁴¹. Ceci est parfaitement compréhensible puisque les cellules mémoires chez les donneurs sains ont précédemment rencontré des antigènes microbiens plutôt que des allo-antigènes. Cependant, la génération de lymphocytes T mémoires anti-allo-antigène est possible post-AHCT et pourrait avoir un rôle à jouer dans le maintien de l'alloréponse¹⁵¹. L'allo-immunisation, c'est-à-dire la formation de cellules T mémoires contre des allo-antigènes, demeure la meilleure hypothèse pouvant expliquer le fait que les receveurs de donneuses multipares souffrent davantage de GVHD¹⁵². Le transfert de lymphocytes T mémoires pourrait quant à lui contribuer à la reconstitution de l'immunité anti-microbienne chez le receveur¹⁵³. Le rôle de la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th1, Th2, Th17 et TReg et son impact sur la GVHD est encore débattu¹³⁸. Il est généralement reconnu cependant que la différenciation Th1 est une caractéristique cardinale de la GVHD aiguë¹³⁸. Les TReg inhibent l'alloréactivité dans plusieurs modèles^{154,155}. Une hypothèse attrayante est que la différenciation Th exerce une grande importance dans le type de tissu atteint^{156,157}. En effet, la différenciation Th1 semble importante dans l'atteinte intestinale, alors que la différenciation Th2 et Th17 influe sur la sévérité de la GVHD cutanée et pulmonaire. Les lymphocytes T CD8 sont également activés par les APC de l'hôte chez l'humain et profitent de l'aide des lymphocytes T CD4. Ils deviennent ainsi des médiateurs et des effecteurs. Trois mécanismes cytotoxiques des lymphocytes CD8 sont bien décrits comme pouvant amener un dommage tissulaire. En effet, la sécrétion de perforine et granzyme augmente la sévérité de la GVHD^{158,159} mais de façon non-spécifique, l'expression de FasL exacerbe l'atteinte hépatique¹⁶⁰ tandis que le TNF- α est particulièrement délétère dans l'intestin¹⁶¹. Les autres médiateurs cellulaires de la GVHD apparaissent ultérieurement à l'activation des lymphocytes T et leur rôles précis demeurent à élucider. Les infiltrats inflammatoires pléiomorphes sont composés principalement de lymphocytes T, de macrophages, de granulocytes et de cellules NK. Les rôles de ces effecteurs immunitaires peuvent être contradictoires selon les modèles et selon leur origine (donneur ou receveur)¹³⁸. De plus, une étude récente nous révèle que les monocytes peuvent être allo-spécifiques et montrer une forme de mémoire¹⁶². En effet, les souris Rag^{-/-} peuvent réagir contre des splénocytes

allogéniques injectés de façon sous-cutanée via une réaction macrophagienne et neutrophilique. Cette réaction est augmentée à la suite d'une ré-exposition et est transférable à des souris naïves par transfert adoptif de monocytes précédemment « exposés ». Cette réaction est indépendante des cellules NK et des allèles du MHC. La portée de ces résultats en immunologie humaine et en GVHD reste à évaluer, mais cette dernière étude force une reconsidération du modèle « lymphocyte T centriste » de la GVHD.

3.2.3 GVHD chronique

La GVHD chronique, dont un des facteurs de risque est la GVHD aiguë, est encore à ce jour, un mystère¹⁴⁸. Notre incompréhension rend d'ailleurs son traitement difficile¹⁶³. En effet, les manipulations pharmacologiques « T-centriques » améliorent peu les symptômes. Ses manifestations nous rappellent les maladies autoimmunes et les syndromes inflammatoires chroniques. Les effecteurs sont variés, incluant des auto¹⁴⁸ et allo-anticorps¹²¹, les cellules myéloïdes, les lymphocytes T et une réponse fibrotique exagérée du stroma. D'un point vu physiopathologique, l'hypothèse d'une réaction auto-immunitaire est supportée par le fait que la GVHD endommage le thymus. Ainsi, les lymphocytes se développant à partir des cellules souches du donneur ne peuvent subir une sélection négative étanche. Une démonstration élégante de ce phénomène nous provient de l'équipe d'Emerson. En effet, on a montré que des lymphocytes T CD4 de souche murine C3H se développant dans des thymus de souris B6 (les souches C3H et B6 sont incompatibles à de nombreux locus de mHAg) endommagées par la GVHD pouvaient causer une GVHD chronique chez des receveurs secondaires B6 et des lésions hépatiques et intestinales chez des receveurs secondaires C3H, indiquant clairement qu'ils étaient auto-réactifs. Cependant, ces CD4 pathogéniques n'étaient pas générés chez des hôtes dont le thymus avait été protégé par le *keratinocyte growth factor* (KGF)¹⁶⁴.

3.3- La reconstitution hémato-lymphoïde et la GVHD

Dans la quasi-totalité des cas, le receveur doit recevoir un traitement avant l'AHCT afin de rendre son système immunitaire incapable de rejeter les cellules hématopoïétiques qu'on lui injectera. Cette modulation immunosuppressive est

souvent accompagnée d'un traitement myéloablatif (qui endommage le système hématopoïétique au point de ne pas permettre une reconstitution autologue). Ainsi deux mécanismes éliminent le système hématopoïétique du receveur. Le premier est un effet de déplétion causé par des agents physiques ou chimiques (radiation et/ou chimiothérapie)¹²², qui est assisté d'un mécanisme immunitaire (suite à la reconnaissance d'antigènes sur les cellules hématopoïétiques de l'hôte par les lymphocytes T du donneur)^{122,165}. On peut alors parler d'une sorte de GVHD médullaire¹⁶⁶. Le remplacement se fait par vagues. Initialement, les patients souffrent de pancytopenie (les décomptes de toutes les cellules sanguines sont bas), dont la conséquence immunologique la plus importante est la neutropénie. En effet, les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre les infections bactériennes et leur reconstitution peut prendre de 2 à 3 semaines. Ensuite, les patients sont plus vulnérables aux infections virales et fongiques principalement à cause d'un déficit de lymphocytes T et NK. La prévention pharmacologique de la GVHD durant cette période cible les lymphocytes T, ajoutant au déficit numérique des défauts fonctionnels. La production de lymphocytes T à partir des cellules souches du donneur dans le thymus du receveur ne commence que de 3 à 6 mois après la greffe. Ainsi, la reconstitution des compartiments T tôt après la greffe est faite par des cellules T matures contenues dans le greffon. L'immunité humorale quant à elle reste imparfaite suite à la greffe, malgré une série de ré-immunisations¹⁵³. Il semble que le rôle central des lymphocytes T CD4 dans l'immunité demeure après la greffe. Certains auteurs ont montré que la reconstitution des lymphocytes T CD4 (contrairement aux décomptes de lymphocytes T CD8 ou de cellules NK) trois mois post-greffe était un facteur indiquant une meilleure reconstitution immunitaire^{167,168}.

Plusieurs facteurs vont influencer cette reconstitution. L'âge des donneurs, mais surtout celui des receveurs est important (fonction thymique, niches médullaires). La quantité de précurseurs hématopoïétiques et de lymphocytes T contenus dans le greffon, l'ampleur des traitements préparatoires, la prophylaxie anti-GVHD et surtout la GVHD elle-même sont d'autres facteurs déterminants.

L'exacerbation de la perte de fonction thymique (point 3.2.3) n'est pas la seule conséquence de l'AHCT et de la GVHD sur le système hématopoïétique et

immunitaire. La GVHD amène aussi de lourdes conséquences sur les compartiments hématopoïétiques eux-mêmes. Les lymphocytes T alloréactifs vont subir une expansion et une contraction comme lors d'une réponse immunitaire normale. Cependant, ils entraîneront dans leur sillage la mort de nombreux lymphocytes non-réactifs (*bystanders*)¹⁶⁹. Les mécanismes de ce phénomène sont probablement multiples, mais la régulation de Fas sur les cellules cibles et de FasL sur les lymphocytes T alloréactifs, semblent expliquer une partie de ce fratricide.

3.4 Les modulateurs de l'alloréactivité et l'allo-tolérance

Les deux dernières décennies ont vu la multiplication des approches afin de réduire la GVHD. La déplétion des lymphocytes T du greffon reste la méthode la plus sûre de prévenir la GVHD (l'effet GVT est toutefois substantiellement diminué dans la plupart des cas). Une stratégie attrayante est de spécifiquement dépléter le greffon des lymphocytes T alloréactifs (en éliminant les cellules T qui s'activent ex-vivo en présence d'APC du receveur). Cependant, nous avons pu apprendre que la source de cellules hématopoïétiques et l'intensité du régime de préparation vont aussi moduler l'alloréactivité (revu dans^{153,170}).

À chaque étape de la réponse immunitaire, des variations interindividuelles du donneur et/ou du receveur vont influencer la GVHD. Les plus fondamentales de ces variations demeurent les différences immunogénétiques. Nous pouvons ajouter cependant que la présence d'histoincompatibilités de type mHAg n'est pas suffisante pour déclencher une GVHD¹⁷¹. En effet, toutes les paires donneurs/receveurs MHC identiques non-monozygotes comportent de multiples incompatibilités mHAg et la GVHD ne se développe que dans 50 à 70 % des cas. De plus, l'intensité de celle-ci peut varier considérablement. Outre les différences immunogénétiques, plusieurs variations dans des gènes liés à l'immunité vont moduler l'alloréactivité expliquant la très grande hétérogénéité dans l'incidence et la sévérité de la GVHD chez l'humain¹⁷². En effet, il existe, par exemple, de grandes variations dans les niveaux de cytokines selon certains polymorphismes des régions codantes ou des promoteurs¹⁷³. Le résultat d'une réponse immunitaire étant la résultante d'influences multiples, il est plausible que l'équilibre entre influences pro- et anti-inflammatoires ait une importance déterminante dans le développement de la GVHD. Parmi les cytokines

qui présentent des polymorphismes ayant un impact sur la GVHD notons le TNF- α , l'IL-10, l'IL-6, l'IFN- γ et le TGF- β . De plus, plusieurs polymorphismes dans des gènes de la réponse innée sont aussi associés à la GVHD ou aux infections post-AHCT dont : Fc γ RII α , MPO, IL-1RA, MBL et NOD2/CARD15¹⁷²⁻¹⁷⁵ (bien que cette dernière association fut récemment contestée¹⁷⁶). Des variations dans les récepteurs stéroïdiens VDR et ER sont aussi corrélées avec l'incidence et la sévérité de la GVHD. Il est parfois difficile d'imaginer comment ces corrélations s'intègrent à la pathophysiologie de la GVHD. En effet, certains de ces polymorphismes ont des effets opposés selon qu'ils soient présents chez le donneur ou le receveur. Aussi, ces polymorphismes pourraient tout simplement être associés par déséquilibre de liaison (*linkage disequilibrium*) à d'autres polymorphismes plus importants pour la GVHD¹⁷³.

La recherche de variation dans les gènes de l'IFN- γ et du TGF- β dans des contextes de GVHD a certainement été motivée par le rôle central qu'occupent ces deux cytokines dans la régulation de la réponse immunitaire et dans la tolérance. Nous décrivons maintenant ces rôles.

4- L'IFN- γ et le TGF- β

4.1- L'IFN- γ , cytokine pivot de la réaction immunitaire

4.1.1 IFN- γ , signalisation

L'IFN- γ est fonctionnellement analogue, mais structurellement différent des autres IFN. En fait, l'IFN- γ est le seul membre de la deuxième classe d'IFN et se lie à un récepteur unique formé de 2 types de chaînes formant un hétérotétramère (Figure 4A). Ce récepteur est ubiquitaire, expliquant la portée systémique des effets de l'IFN- γ ¹⁷⁷. La description qui suit au sujet de la signalisation en aval du récepteur de l'IFN- γ (IFN- γ R) est tirée de quatre sources principales¹⁷⁸⁻¹⁸¹. L'IFN- γ est un polypeptide formé de chaînes identiques liées de façon antiparallèle d'environ 20 kDa, qui se lie à deux chaînes identiques IFN- γ RI. Les chaînes IFN- γ RI recrutent chacune une chaîne IFN- γ RII qui, elles, sont constitutivement liées à JAK2, une tyrosine kinase. La liaison des deux types de chaînes amène un changement conformationnel et une auto-phosphorylation de JAK2. Ensuite, JAK2 phosphoryle JAK1, qui elle est liée à

la chaîne IFN- γ RI. JAK1 phosphoryle alors les tyrosines 440 des chaînes IFN- γ RI, qui servent à la liaison de la forme latente de STAT1. STAT1 est alors phosphorylé par JAK2 sur la tyrosine 701, ce qui permet l'activation et l'homodimérisation de STAT1 (Figure 4B).

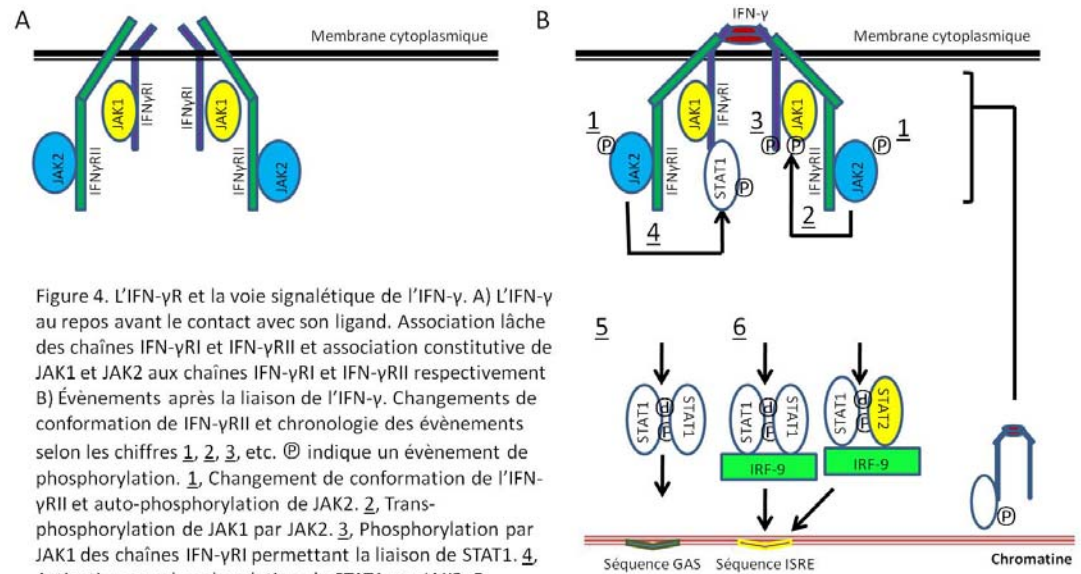


Figure 4. L'IFN- γ R et la voie signalétique de l'IFN- γ . A) L'IFN- γ au repos avant le contact avec son ligand. Association lâche des chaînes IFN- γ RI et IFN- γ RII et association constitutive de JAK1 et JAK2 aux chaînes IFN- γ RI et IFN- γ RII respectivement B) Événements après la liaison de l'IFN- γ . Changements de conformation de IFN- γ RII et chronologie des événements selon les chiffres 1, 2, 3, etc. (P) indique un événement de phosphorylation. 1, Changement de conformation de l'IFN- γ RII et auto-phosphorylation de JAK2. 2, Trans-phosphorylation de JAK1 par JAK2. 3, Phosphorylation par JAK1 des chaînes IFN- γ RI permettant la liaison de STAT1. 4, Activation par phosphorylation de STAT1 par JAK2. 5, Homodimérisation de STAT-1, migration vers le noyau et liaison aux sites GAS sur la chromatine pour moduler la transcription. 6, Signalisation alternative. STAT1 activé, en tant qu'homodimère ou d'hétérodimère (avec phospho-STAT2) peut se lier à IRF-9 et rejoindre les séquences ISRE sur la chromatine. Internalisation du complexe IFN- γ RI-IFN- γ -STAT1 et migration vers le noyau.

Les homodimères de STAT1 peuvent ensuite migrer vers le noyau où ils modulent la transcription en se liant directement à l'ADN (sur des sites de liaison GAS) ou en se complexant avec d'autres facteurs de transcription. Un thème récurrent dans la transcription découlant d'une signalisation cytokinique est la co-dépendance de nombreux facteurs provenant de d'autres voies dans les régulations transcriptionnelles. Dans le cytosol, la présence d'homodimères de STAT1 peut aussi se lier à IRF-9. Ce complexe peut se lier à l'ADN sur des sites ISRE. À moindre niveau, l'activation du IFN- γ R peut aussi mener à la formation d'hétérodimères STAT1-STAT2, ceux-ci peuvent alors diversifier la réponse transcriptionnelle à l'IFN- γ . La transcription IFN- γ -dépendante module des centaines de gènes, dont certains comme l'IRF-1, servent à propager la réponse via des vagues secondaires de transcription. Une étude d'immuno-précipitation de la chromatine suivie de séquençage à haut débit estime à 30 000, le nombre de sites occupés par

STAT1 après une stimulation à l'IFN- γ ¹⁸². Des études *in silico* démontrent la présence de séquences GAS et IRSE dans les promoteurs de dizaines de gènes connus comme ayant un rôle dans la réponse immunitaire. La signalisation/transcription STAT1-dépendante peut être modulée par d'autres voies signalétiques indépendantes de l'IFN- γ (IL-12, LPS, TNF- α , PI3K), notamment par la phosphorylation de la serine 727. De plus, la présence du complexe IFN- γ RI :IFN- γ :STAT1 dans le noyau implique que d'autres mécanismes existent afin de relayer les signaux à partir de la membrane cytoplasmique. STAT1 est donc le messager primaire fondamental de la signalisation découlant d'une stimulation par l'IFN- γ . Certains effets IFN- γ -dépendants sont pourtant STAT1-indépendants¹⁸³. De plus, il est utile de rappeler que STAT1 n'est pas un médiateur exclusif de la voie signalétique en aval de l'IFN- γ R. En effet, la signalisation via les récepteurs des IFN de type I (IFN- α et IFN- β) est aussi fortement diminuée chez les souris STAT1-déficientes^{184,185}. Ces souris se développent normalement mais sont très vulnérables aux infections (surtout virales) et à l'induction de tumeurs (de façon équivalente aux souris IFN- γ R-déficientes)¹⁸⁶. Dans le cas des infections virales, les souris STAT1-déficientes sont généralement plus susceptibles que les souris IFN- γ R-déficientes, soulignant la grande importance des IFN de type I dans ce contexte précis. Cependant, les souris IFN- γ R et IFN- α/β R double-déficientes sont plus susceptibles que les souris STAT1-déficientes impliquant une signalisation en aval des IFN- γ R et IFN- α/β R plus complexe et encore mal définie^{183,187}.

La régulation de la signalisation IFN- γ se fait à plusieurs niveaux. Le récepteur peut être dégradé, la transcription de la chaîne IFN- γ RII réprimée, des inhibiteurs exprimés (tels SOCS1 et SOCS3 capables d'interférer avec des intermédiaires de signalisation) et des phosphatases activées afin de déphosphoryler STAT1. *In-vitro*, la phosphorylation de STAT1 est rapidement inhibée après une heure de stimulation continue par l'IFN- γ .

4.1.2 IFN- γ , physiologie et immunité

Les animaux (et les humains) déficients pour l'IFN- γ ou son récepteur démontrent que l'IFN- γ est un immunostimulant. Dans des contextes physiologiques, une abrogation de la signalisation IFN- γ se traduit principalement par une susceptibilité

accrue aux infections¹⁸⁸, particulièrement aux organismes intra-cellulaires tels les mycobactéries. Les humains déficients pour l'IFN- γ RI ont ainsi une espérance de vie ne dépassant pas les 15 ans¹⁸⁹. Les souris dont le gène de l'IFN- γ a été inactivé se développent normalement en l'absence de pathogènes mais ont une incidence accrue de cancers¹⁹⁰. L'IFN- γ est d'ailleurs au cœur du modèle contemporain le plus répandu d'immuno-surveillance du cancer soit l'*Immunoediting*^{191,192}. Chez des animaux disposés au développement de maladies auto-immunes comme le lupus et le diabète de type I, l'absence d'IFN- γ retarde l'apparition de la maladie^{193,194}. Cependant, tous les modèles de maladies autoimmunes ne supportent pas l'idée que l'IFN- γ est un rouage important de l'auto-agression¹⁹⁵. De plus, l'inhibition de l'IFN- γ dans différentes phase de la réponse immunitaire amène des phénotypes différents¹⁹⁶. De façon synthétique, la somme des évidences nous suggère que l'IFN- γ est important dans l'initiation de la réponse (immunostimulant), mais aussi dans sa limitation et contraction (immunorégulateur).

L'IFN- γ est essentiellement sécrété par les lymphocytes T et les cellules NK. Les macrophages et certains sous-types de cellules dendritiques semblent aussi produire de l'IFN- γ , bien que le rôle physiologique de la sécrétion d'IFN- γ par ces cellules reste encore à définir^{179,180,197,198}. L'IFN- γ amène des changements profonds chez de nombreux leucocytes et cellules non-hématopoïétiques. La réponse inflammatoire, aboutissement de l'activation de plusieurs acteurs cellulaires, est globalement stimulée par l'IFN- γ ¹⁹⁹. Ainsi sur les cellules non-hématopoïétiques, l'IFN- γ induit les mécanismes de présentation des antigènes ce qui augmente l'expression des MHC de classe I et II à la surface des cellules, des molécules d'adhésion, des chimiokines et des protéines anti-virales en plus de freiner la prolifération cellulaire et éventuellement d'induire l'apoptose. La plupart de ces fonctions sur les cellules stromales (cellules endothéliales, mésenchymateuses, parenchymateuses, etc.)^{200,201} nourrissent la réaction immunitaire. Les fonctions antiprolifératives et pro-apoptotiques²⁰² sont des thèmes récurrents dans la physiologie de l'IFN- γ . Les impacts possibles de l'IFN- γ sur la prolifération cellulaire sont nombreux^{179,180}, mais notons l'induction des inhibiteurs p21 et p27^{203,204} ainsi que la suppression de c-myc²⁰⁵.

Dans le système hématopoïétique, l'IFN- γ peut moduler la biologie d'à peu près toutes les cellules, incluant les plus primitives. Lors d'aplasies médullaires acquises, l'IFN- γ est pointé du doigt comme un joueur important de la suppression de l'hématopoïèse^{206,207}. Cependant, une publication récente montre au contraire que dans un modèle d'infection chronique, l'IFN- γ favorise la prolifération des cellules souches²⁰⁸. Un autre thème récurrent est que la biologie de l'IFN- γ est dépendante du contexte.

Les effets physiologiques de l'IFN- γ surprennent néanmoins par leur cohérence. En effet, l'IFN- γ cytokine centrale de la différenciation Th1, oriente toute la réponse cellulaire, humorale et innée dans la même direction. Premièrement, le dialogue APC-lymphocytes T CD4 entretient une boucle de rétroaction positive où la sécrétion d'IL-12 par l'APC activée²⁰⁹ amène une sécrétion d'IFN- γ par le lymphocyte T, qui en agissant sur l'APC favorise davantage la maturation (molécules de co-stimulation et expression des complexes MHC) et la sécrétion d'IL-12 qui agira plus fortement sur le lymphocyte T CD4 chez qui l'IFN- γ amène une plus grande expression d'IL-12R^{210,211}. L'IL-12 activera aussi les cellules NK qui deviendront de grandes sécrétrices d'IFN- γ et chez qui l'IFN- γ stimulera d'autres fonctions effectrices. L'IFN- γ stimulera aussi les fonctions effectrices chez le lymphocyte CD8, notamment l'expression de FasL. Initialement, l'IFN- γ aurait même un rôle positif sur la prolifération d'effecteurs CD8^{212,213}. Ce paradoxe pourrait être expliqué par le fait que les lymphocytes T CD8 inhibent la transcription du IFN γ R2 rapidement après un premier signal. Ainsi un signal « stimulateur » initial ne serait pas supplanté par une signalisation continue qui amènerait une inhibition de la prolifération²¹⁴. L'IFN- γ stimule chez les macrophages et les neutrophiles le système de la NADPH oxydase (*respiratory burst*), l'iNOS, plusieurs enzymes lysosomales et la phagocytose (par le biais de l'augmentation de l'expression des récepteurs Fc et du CR3)¹⁷⁹. La phagocytose est favorisée par l'isotype d'immunoglobuline IgG3 et la lyse par le complément par l'isotype IgG2, deux isotypes dont la production est favorisée par l'action de l'IFN- γ sur les lymphocytes B. De plus, l'IFN- γ stimule l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 favorisant la migration d'effecteurs immunitaires vers les tissus inflammés. Ainsi, l'IFN- γ semble coordonner au niveau de la cellule et entre les cellules un programme immunitaire cohérent.

À cette cohérence s'ajoute un aspect fondamental d'auto-régulation. Tel que décrit plus haut, la réponse immunitaire, quoique salutaire, doit se terminer après l'élimination des pathogènes afin de préserver l'hôte. L'IFN- γ est un maillon essentiel de l'apoptose des lymphocytes T CD4 et CD8 activés^{53,215-218}. Rappelons que de façon autocrine, les lymphocytes T CD4 Th1 semblent pouvoir s'autoréguler par la sécrétion de la cytokine immunosuppressive IL-10⁸². C'est aussi par la manipulation des schèmes Th que l'IFN- γ peut aussi influencer sur la réponse immunitaire. En effet, la génération de lymphocytes CD4 TReg en périphérie est diminuée en l'absence de signalisation par l'IFN- γ ^{180,219}. Aussi, l'IFN- γ est un inducteur puissant de iNOS et d'IDO (dont les fonctions immunorégulatrices sont brièvement décrites au point 1.3.1) chez les cellules du système inné et certaines cellules stromales¹⁷⁹.

L'impact d'une signalisation par l'IFN- γ sur les phénotypes immunitaires peut donc être complexe et variable. Ainsi, le rôle de l'IFN- γ est dépendant des contextes et conséquemment gagne à être évalué dans des modèles physiologiques.

4.2-L'IFN- γ et l'AHCT

En GVHD, l'IFN- γ est principalement sécrété par les lymphocytes T du donneur. Les données disponibles sur le rôle de l'IFN- γ sur l'alloréactivité et la GVHD sont contradictoires²²⁰⁻²²⁵. Globalement, et de façon surprenante, la plupart des études tendent à montrer que l'effet dominant de l'IFN- γ est de limiter la GVHD²²⁶. Cette hypothèse va aussi de paire avec les données humaines montrant que les polymorphismes « hypo-sécrétants » du gène de l'IFN- γ sont associés à une incidence accrue de GVHD¹⁷³. En définitive, il semble que les propriétés immunorégulatrices de l'IFN- γ prédominent, en grande partie grâce aux effets de cette cytokine sur la contraction des lymphocytes T alloréactifs. Cependant, les effets connus de l'IFN- γ sur la présentation antigénique et la sécrétion de chimiokines par les cellules non-hématopoïétiques du receveur (les cibles de la GVHD) pourraient favoriser le développement de la maladie²²⁷. Nous avons entrepris d'évaluer cette possibilité en utilisant un modèle où les cellules du donneur sont sensibles à l'IFN- γ (gardant ainsi intacte la réponse immunorégulatrice dépendante de l'IFN- γ), mais où les cellules du receveur sont déficientes pour IFN- γ RI (et donc insensibles à l'IFN- γ). Les résultats

sont présentés ci-après dans le premier article. Un autre groupe a simultanément étudié une partie de cette question et nous a offert une réponse quelques temps avant la publication de nos travaux. Le groupe de GH Hill²²⁸ a démontré que la signalisation IFN- γ dans les tissus de l'hôte dicte de façon opposée la susceptibilité à la GVHD de l'intestin et du poumon.

4.3- Le TGF- β et le maintien de la tolérance périphérique

4.3.1- TGF- β , signalisation

La famille des ligands TGF- β compte au moins 42 membres dont les fonctions sont très diversifiées²²⁹. La conservation d'un grand nombre de ces gènes dans l'évolution témoigne de leur importance fondamentale. En fait, le TGF- β est apparu avant la divergence des arthropodes et des vertébrés, c'est-à-dire il y a plus d'un milliard d'années²³⁰. TGF- β 1 (parmi trois isoformes TGF- β 1, 2 et 3) est la forme la plus abondante dans les tissus lymphoïdes et nous nous limiterons à décrire les actions de celle-ci²³¹. Le TGF- β est synthétisé comme précurseur et subit une modification importante dans l'appareil de golgi par le biais de *Furin-like peptidases* (ou de *Proprotein-convertases*)²³². En effet, la molécule active du TGF- β est alors séparée du LAP (*Latency-associated peptide*), mais demeure associée à ce dernier de façon non-covalente. Le TGF- β est ensuite sécrété dans l'espace inter-cellulaire où il est toujours lié au LAP et souvent au LTBP (*Latent TGF binding protein*). Il devient actif lorsque libéré du LAP et LTBP, principalement par des peptidases²³³. Il se lie ensuite à son récepteur, un hétérotétramère composé de deux chaînes de TGF- β RI et deux chaînes de TGF- β RII²³³ (Figure 5). Ces chaînes sont toutes deux des kinases serine-thréonine. Initialement, le TGF- β se lie à la chaîne TGF- β RII qui recrute la chaîne TGF- β RI et la transphosphoryle. La chaîne TGF- β RI ainsi activée peut phosphoryler les protéines SMAD associées aux récepteurs (R-SMAD) près de l'extrémité C-terminale^{229,234}. Dans le cas de TGF- β et du système immunitaire, il s'agit des protéines SMAD2 et SMAD3²³¹. Brièvement, les R-SMAD sont des protéines d'environ 500 acides aminés formées par deux domaines globulaires liés par un domaine de liaison (*linker*). Un premier domaine globulaire (MH1) possède une région conservée permettant une liaison à l'ADN. SMAD2 par contre ne peut lier l'ADN car un insert à l'exon 3 bloque le site de contact avec l'ADN chez la plupart

des produits d'épissage alternatif (*splice variants*). Le domaine MH2 quant à lui est le principal lieu d'interaction des R-SMAD avec leurs partenaires protéiques. La région *linker* contient plusieurs sites permettant des modifications (phosphorylation, ubiquitination, etc.) qui notamment servent au dialogue croisé avec d'autres voies signalétiques et altèrent fonctionnellement les SMAD²³⁴. Les R-SMAD activés se lient à un co-SMAD dans le cytoplasme (typiquement SMAD4) et migrent en tant qu'hétérotrimères vers le noyau. Dans le noyau, SMAD3 et SMAD4 peuvent se lier aux SBE (Smad-binding elements – 5'-GTCT-3') et séquences variantes^{234,235} du SBE. Cette liaison n'est pas suffisante pour induire ou réprimer la transcription de gènes. Ainsi, les complexes SMAD modulent la transcription en interagissant avec d'autres facteurs de transcription, souvent tributaires des autres signaux que reçoit la cellule²³⁶. La contribution relative de SMAD2 et SMAD3 dans la formation des trimères avec SMAD4 et l'impact global de l'un et l'autre sur la transcription sont mal compris et demeurent des sujets d'intenses recherches (voir le point 9).

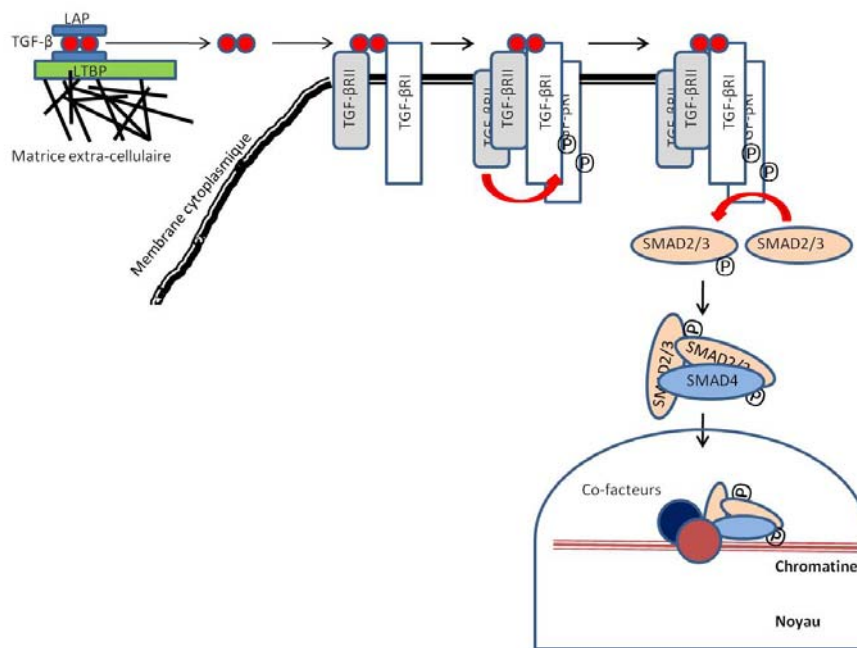


Figure 5. La voie signalétique canonique du TGF- β . Activation du TGF- β latent par des perturbations de la matrice extracellulaire et liaison au TGF- β R, suivi de la liaison du TGF- β à son récepteur. La formation d'un complexe tétramérique formé de deux chaînes TGF- β RII et TGF- β RI est suivi d'une phosphorylation de TGF- β RI par TGF- β RII. Les chaînes TGF- β RI activent ensuite SMAD2 et 3 par phosphorylation, qui se lient alors dans le cytoplasme avec le co-SMAD, SMAD4. Ensuite, les hétéro-trimères migrent vers le noyau où ils interagissent avec des co-facteurs pour moduler la transcription.

La régulation de la voie SMAD se fait à de multiples niveaux (Figure 6). Après avoir lié son ligand, le TGF- β R est internalisé pour être, ou bien dégradé, ou recyclé. Cette régulation serait le fruit d'une internalisation via les caveolae (menant à une

dégradation) ou par les vésicules associées à la clathrine (menant à un recyclage)²³⁷. La liaison des R-SMAD au TGF- β R peut aussi être limitée par un effet de compétition venant de FKBP12, BAMBI et SMAD7²³⁴. Le cas de SMAD7 mérite qu'on s'y attarde. SMAD7 est un SMAD dit inhibiteur, qui ne possède pas de domaine MH1. Les deux mécanismes principaux par lesquels SMAD7 agit sont la compétition pour le TGF- β R et la dégradation des chaînes TGF- β RI via une coopération avec SMURF2, une ubiquitine ligase. SMAD7 est induit par la signalisation TGF- β /SMAD et est donc un maillon d'une importante boucle de rétroaction négative. PIAS1, les MAPK et CDK peuvent respectivement sumoyler ou phosphoryler le linker des R-SMAD et ainsi moduler (positivement ou négativement) leur fonction, notamment le transport nucléo-cytoplasmique. L'autre niveau de régulation important touche les effets transcriptionnels des complexes SMAD. Les protéines SKI et SnoN sont des antagonistes nucléaires des complexes SMAD qui peuvent démanteler les associations que les SMAD forment avec d'autres facteurs de transcription. La relation entre les SMAD et les protéines SKI et SnoN a une longue histoire dans l'évolution et la régulation est bi-directionnelle (il existe une voie SMAD-dépendante d'ubiquitination/dégradation des protéines SKI et SnoN). TGIF est un autre inhibiteur nucléaire qui empêche la transcription SMAD-dépendante en inhibant l'accès des complexes SMAD au co-activateur transcriptionnel p300/CBP de manière compétitive (revu dans²³⁴).

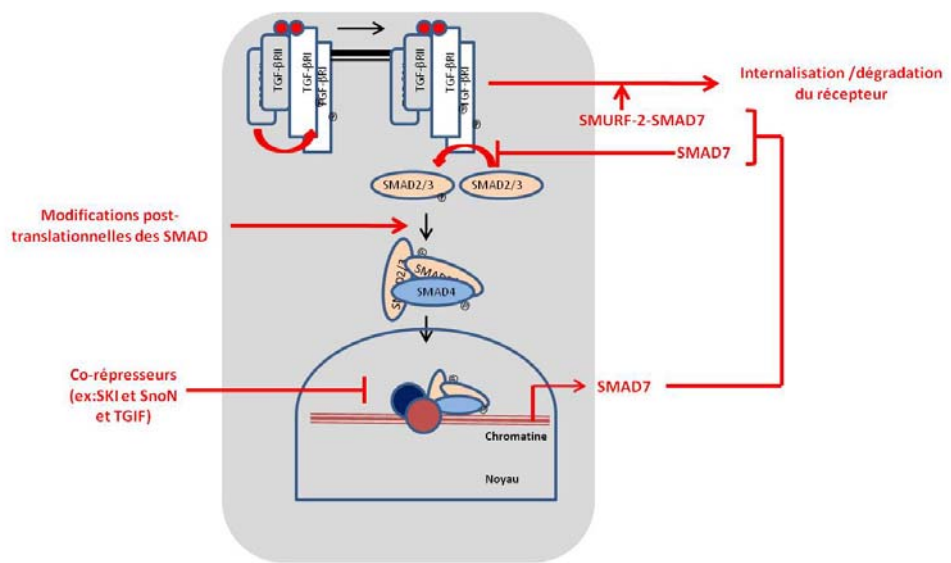


Figure 6. Régulation de la voie TGF- β /SMAD. Illustration des principaux mécanismes de régulation de la voie TGF- β /SMAD.

De manière globale, nous pouvons ré-insister sur l'importance des co-activateurs et co-répresseurs transcriptionnels dans la transcription médiée par les SMAD²³⁶. Selon les tissus et les contextes, les effets du TGF- β se montrent très variables et plastiques. La voie TGF- β entretient des relations étroites avec d'autres voies de grande importance dont celles des MAP kinases et d'AKT^{238,239}. Ce qui est moins connu est l'intégration de ces voies menant à une expression génique synchronisée et cohérente (synexpression). Cet aspect sera étudié plus bas, alors que la signalisation par le TGF- β sera abordée dans des contextes physiologiques.

La voie SMAD n'est pas la seule voie activée par le complexe TGF- β R, ajoutant à la pléiotropie du TGF- β . En effet, les voies MAPK, PI3K, PP2A, Rho et Par6 sont aussi directement activées à partir du TGF- β R²⁴⁰. Les effets combinatoires, antagonistes et tissus-spécifiques de l'activation de plusieurs voies à partir du même récepteur sont encore largement incompris.

4.3.2- TGF- β , physiologie et immunité

Le TGF- β est un morphogène important dont les rôles, notamment en biologie du développement et du cancer, sont multiples. Nous nous limiterons cependant aux actions du TGF- β dans des contextes immunitaires^{231,240}. Le TGF- β est un immunosuppresseur puissant dont les effets sur les cellules semblent être d'une grande cohérence. Les souris TGF- β ou TGF- β R déficientes meurent d'auto-immunité fulminante en 3 semaines confirmant le rôle essentiel du TGF- β dans le maintien de la tolérance²⁴¹. Plus précisément, les souris TGF- β -déficientes se développent normalement jusqu'au jour 14 après la naissance, mais perdent rapidement du poids ensuite. La mortalité précoce semble être attribuable à une atteinte inflammatoire pléiomorphe (lymphocytes et macrophages surtout) du cœur et des poumons, bien que de multiples organes soient atteints (organes lymphoïdes, pancréas, glandes salivaires et le tractus gastro-intestinal)^{242,243}. La délétion sélective du TGF- β RII dans les lymphocytes T amène un phénotype semblable dont la létalité est toutefois retardée²⁴⁴. Le TGF- β occupe donc une position centrale dans la tolérance par son action sur les lymphocytes T. Le TGF- β joue un rôle encore mal défini dans l'ontogénèse des différents sous-types de lymphocytes T, mais contribue à l'homéostasie des compartiments T naïfs, notamment en favorisant leur survie²⁴⁰. Les

fonctions du TGF- β sont mieux définies pour ce qui est du contrôle de la réponse des lymphocytes T. Avant même de pouvoir moduler la transcription, le TGF- β inhibe la Tec kinase ITK et conséquemment les flux calciques nécessaires à l'activation via le TCR et les molécules de co-stimulation²⁴⁵. Le TGF- β inhibe ensuite la prolifération et la différenciation des lymphocytes T^{231,246}. Les trois mécanismes effecteurs (sécrétion de perforine/granzyme, expression de FasL et de TNF- α) des lymphocytes T CD8 sont inhibés par le TGF- β ²⁴⁷. La différenciation Th des lymphocytes T CD4 est aussi profondément altérée. Le TGF- β réprime la différenciation Th2^{245,248} et la différenciation Th1²⁴⁰. Cependant, les lymphocytes T CD4 dont le gène TGF- β RII a été inactivé produisent beaucoup d'IFN- γ , expriment fortement T-bet et se différencient exclusivement en effecteurs Th1²⁴⁹. In vivo, le rôle primordial de TGF- β serait donc de supprimer le développement Th1. À la suppression des 2 schèmes de différenciation Th principaux, s'ajoute une contribution de TGF- β à la différenciation TReg et Th17. Cette contribution ne consiste pas seulement à réprimer la différenciation Th1/Th2 afin que d'autres signaux puissent diriger l'acquisition de d'autres phénotypes Th. TGF- β contribue activement à l'expression de FoxP3²⁵⁰ et la neutralisation de TGF- β par anticorps limite la production de Th17²⁵¹⁻²⁵³. Bien que les lymphocytes T CD4 Th17 soient généralement reconnus comme étant pro-inflammatoires²⁵⁴, il semble que le TGF- β (avec l'IL-6) mais sans le facteur de stabilisation IL-23, favorise la génération d'effecteurs Th17 avec des fonctions régulatrices²⁵⁵. Une notion importante est que c'est en majeure partie par un effet autocrine que le TGF- β permet le contrôle la réponse T^{253,256}.

Les fonctions immunorégulatrices du TGF- β dépassent largement le compartiment des lymphocytes T (résumées à la figure 7). Ainsi, il est possible de démontrer des propriétés immunorégulatrices chez tous les acteurs du système immunitaire. Chez les lymphocytes B, la prolifération et la production d'anticorps sont réprimées par le TGF- β , mais par contre, la formation d'anticorps IgA est favorisée par rapport aux autres sous-types²³¹. Cette dernière propriété semble cohérente avec le rôle particulier du TGF- β dans la régulation de l'homéostasie immunitaire de l'intestin sur laquelle nous reviendrons. L'activation des cellules NK, leur fonction cytolytique et la production de cytokines sont inhibées par le TGF- β ²⁵⁷. L'absence d'une signalisation TGF- β chez les cellules NK amène leur accumulation et une augmentation de la

sécrétion d'IFN- γ , ce qui pourrait avoir une répercussion sur le développement de réponses Th1 systémiques²⁵⁸. Le TGF- β inhibe l'expression de récepteurs de ligands de stress sur les cellules NK (notamment NKG2D) diminuant ainsi leur capacité de reconnaissance et de lyse²⁵⁹. Chez les cellules dendritiques, le rôle de TGF- β semble dépendre du type de cellules et du contexte expérimental²³¹. Il serait donc hasardeux de conclure à un rôle unique. Bien que souvent associé aux rôles tolérogènes des cellules dendritiques, le TGF- β est essentiel à la génèse des cellules de Langerhans²⁶⁰, et dépendamment des contextes, le TGF- β pourrait même faciliter la stimulation des cellules T par celles-ci (revu dans²⁶¹). Le TGF- β peut induire un blocage de maturation (échec d'augmentation des complexes MHC de classe II et des molécules de co-stimulation à la surface, inhibition de la sécrétion d'IL-12 et même induction d'IDO)^{262,263}. Les mécanismes TGF- β qui sous-tendent cet échec de maturation chez les cellules dendritiques sont cependant assez mal compris. Cependant nous savons que chez les macrophages stimulés par LPS, le TGF- β amène la dégradation de MyD88²⁶⁴, un carrefour important de la signalisation via les TLR. Ainsi, les fonctions d'APC des macrophages sont aussi diminuées en présence de TGF- β . Il en est de même pour les fonctions phagocytaires et microbicides (production de NO)²⁶⁵. En effet, plusieurs récepteurs captant des débris ou des cellules mortes (*scavenger receptors*) et des récepteurs Fc sont moins exprimés après que la cellule eut été exposée au TGF- β ^{266,267}. Il en est de même pour plusieurs cytokines inflammatoires telles le TNF- α , IL-12 et CCL3/MIP-1 α ²⁶⁸. Il est probable que le TGF- β régule les fonctions des neutrophiles de la même façon, mais les données sont contradictoires, notamment pour ce qui est des fonctions microbicides²³¹. Le TGF- β a néanmoins un rôle important dans le recrutement des monocytes et neutrophiles aux sites d'inflammation. L'importance du TGF- β dans la régulation des cellules myéloïdes est sûrement sous-estimée. En effet, dans plusieurs systèmes où il n'y a pas de réactivité T, l'abrogation de la signalisation TGF- β amène une myéloprolifération et une inflammation diffuse^{269,270}. De plus, on a bien démontré le rôle du TGF- β dans la re-différenciation des macrophages et neutrophiles en cellules immunosuppressives^{77,78}.

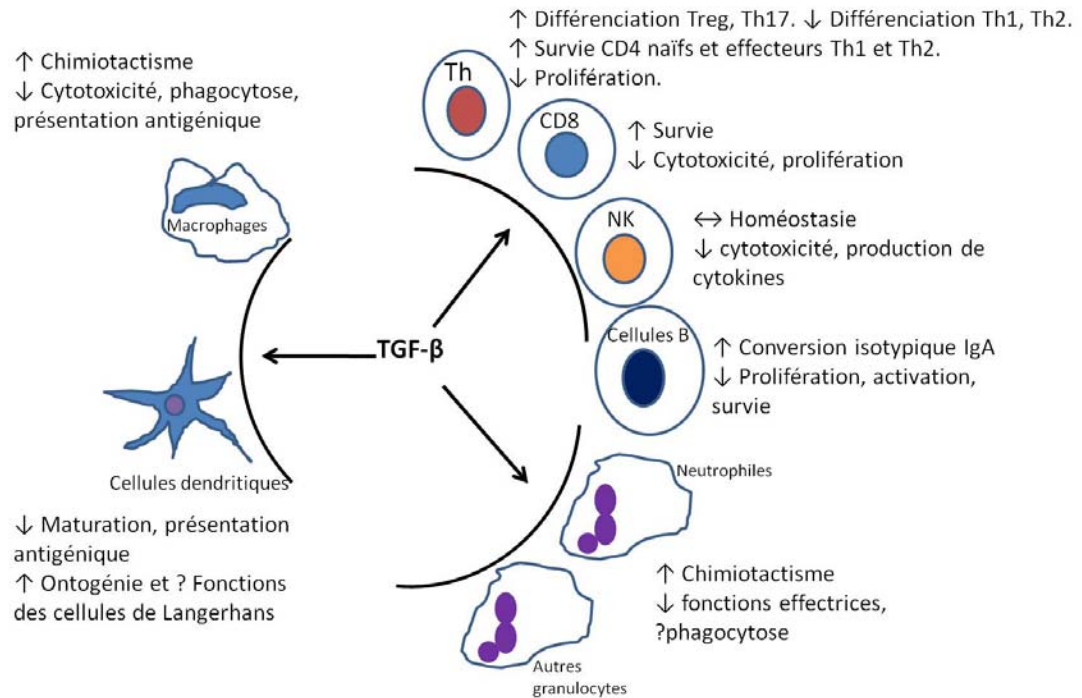


Figure 7. Survol des fonctions principales du TGF- β en immunité. ↑ indique que le TGF- β généralement augmente, ↓ diminue et ↔ maintient. ? indique que le rôle de TGF- β est incertain. Inspiré de²³¹.

Le TGF- β utilise plusieurs voies signalétiques afin de programmer ainsi les cellules du système immunitaire. De façon particulièrement pertinente à cette thèse, plusieurs de ces fonctions sont tributaires en partie ou en totalité de l'action de SMAD3, médiateur canonique de la voie TGF- β . Chez les lymphocytes T, SMAD3 semble même essentiel à l'induction de la tolérance suite à une exposition antigénique en l'absence de co-stimulation²⁷¹. Le tableau II résume le rôle spécifique de SMAD3 dans l'immunité. De façon remarquable, malgré l'importance de SMAD3 dans la signalisation TGF- β en immunité, les souris SMAD3-déficientes ont des phénotypes immunitaires variables²⁷²⁻²⁷⁴, mais aucune ne récapitule la sévérité du phénotype des souris TGF- β R déficientes. En fait, les souris utilisées comme donneuses de cellules hématopoïétiques dans l'article II sont libres de toute auto-immunité lorsque maintenues dans des conditions libres de pathogènes.

Tableau II. Effets de TGF- β connus comme étant SMAD3-dépendants dans les sous-types de cellules immunitaires. Selon ^{231 et 240} ou les références incluses dans le tableau.

	SMAD3 augmente	SMAD3 diminue
Lymphocytes T CD4	L'expression de FoxP3 – l'induction de TReg	La prolifération TCR-dépendante La production d'IL-2 L'activité de ROR- γ t – l'induction de Th17 ²⁷⁵
Lymphocytes T CD8		La production d'IL-2 L'expression de granzyme b
Cellules NK		L'expression de T-bet, d'IFN- γ et de L'ADDC ^{276,277}
Lymphocytes B	Le changement de classe en faveur des IgA (débatu) L'apoptose–via l'accumulation de Bim ²⁷⁸	La prolifération La sécrétion d'IgG
Cellules dendritiques		CIITA – Présentation antigénique via les MHC de classe II
Monocytes/Macrophages	L'expression d'IL-23p19 ²⁷⁹	L'activation – iNOS, MMP12
Granulocytes	Le chimiotactisme	

4.4- Le TGF- β et l'AHCT

De façon surprenante, le TGF- β a été assez peu étudié en GVHD. Pourtant, il semble évident que celui-ci est un modulateur important de l'alloréactivité^{173,280}. On a pu démontrer dans des modèles murins que dans les phases précoces post-AHCT, les lymphocytes T produisaient beaucoup de TGF- β et que l'inhibition de celui-ci augmentait la GVHD. Par contre, dans les phases tardives, les cellules myéloïdes devenaient les principales productrices de TGF- β , et dans ce contexte, le TGF- β avait un effet délétère sur la GVHD²⁸¹. Ces travaux révèlent que l'on peut difficilement catégoriser une cytokine aussi polyvalente que le TGF- β . Le contexte, en termes de milieu (autres cytokines, cellules immunitaires et stromales, etc.) et en fonction du temps (atteinte aiguë ou chronique), déterminent en grande partie le rôle dominant que jouera le TGF- β . Plusieurs manifestations de la GVHD chronique sont associées à la fibrose, susceptible d'être améliorée par la neutralisation du TGF- β ²⁸².

Chez l'humain, certains polymorphismes du TGF- β et de son récepteur sont associés à la GVHD²⁸³. Il est toutefois difficile de savoir quels sont les impacts de ces polymorphismes sur la signalisation du TGF- β . Cependant, la présence de taux

sériques bas de TGF- β et des niveaux faibles de TReg mesurés de 2 à 4 semaines après l'AHCT (avant le développement de la GVHD) semble pouvoir prédire l'apparition de la GVHD aiguë et chronique chez l'humain²⁸⁴. De plus, une étude pilotée par notre laboratoire¹⁷¹ a soulevé un lien plausible entre SMAD3 et la GVHD. En effet, cette étude a révélé que certains patrons d'expression génique évalués par micro-puces de cDNA chez les lymphocytes T de donneurs sains peuvent prédire le développement de GVHD chez le receveur. Notamment, des niveaux de transcrits élevés de gènes régulant positivement la voie TGF- β sont associés à une plus faible incidence de GVHD. Dans cette étude, le gène dont l'expression chez le donneur était la plus susceptible de prédire la GVHD était SMAD3. Ainsi, de bas niveaux de SMAD3 chez les lymphocytes CD4 du donneur prédisaient l'apparition d'une GVHD chronique chez les patients. Cette relation entre les niveaux de SMAD3 et la GVHD se vérifiait aussi à l'inverse, c'est-à-dire lorsque les niveaux de SMAD3 étaient élevés. En fait, dans cette cohorte de 50 paires donneurs/patients, aucun donneur dont les niveaux de SMAD3 étaient élevés chez les lymphocytes T CD4 n'a amené de GVHD chez le receveur. Le deuxième manuscrit inclus dans cette thèse identifie chez la souris les mécanismes immunologiques pertinents à la GVHD qui dépendent de l'expression de SMAD3.

4.5- Deux voies antagonistes ?

L'IFN- γ et le TGF- β sont deux cytokines maîtresses dont les rôles sont souvent diamétralement opposés autant chez les cellules immunitaires que stromales. Nous avons vu ci-haut que l'un et l'autre orientent les cellules du système immunitaire vers des phénotypes opposés, au moins la plupart du temps. Alors, avons-nous des évidences démontrant un antagonisme réciproque aux niveaux cellulaire et moléculaire ? La réponse à cette question est oui. Les antagonismes fonctionnels entre ces deux joueurs s'articulent autour de mécanismes moléculaires pouvant intervenir à plusieurs niveaux, suggérant fortement l'importance pour l'une ou l'autre des voies d'inhiber sa rivale. En voici quelques exemples.

Comme nous l'avons décrit, les deux récepteurs sont ubiquitaires et comme pour les réponses à ces deux cytokines, les mécanismes antagonistes sont susceptibles d'être cellule-spécifiques. Déjà au niveau des récepteurs, il a été démontré que le TGF- β RI

peut phosphoryler la chaîne IFN- γ RI de telle façon que le complexe IFN- γ récepteur devient moins apte à phosphoryler STAT1²⁸⁵. La voie IFN- γ /STAT1 induit le SMAD inhibiteur SMAD7, qui lui inhibe l'activation des R-SMAD et accentue la dégradation du TGF- β R²⁸⁶. Aussi, la séquestration de STAT1 par PIAS1 (*protein inhibitor of activated STAT1*) se trouve augmentée après une stimulation par le TGF- β ²⁸⁷. L'interférence entre les deux voies est aussi très bien décrite au niveau transcriptionnel. En effet, on a montré que les SMAD et STAT1 compétitionnent pour le co-facteur p300/CBP²⁸⁸ et que l'IFN- γ amène la translocation nucléaire de YB-1, un inhibiteur de SMAD3²⁸⁹. Aussi, l'induction de la phosphatase PTP-Shp-1 par TGF- β inhibe l'induction de T-bet par IFN- γ chez les lymphocytes T, en agissant sur phospho-STAT1²⁹⁰. Nous devons aussi rappeler que SMAD3 agit comme répresseur direct du gène de l'IFN- γ chez les cellules NK²⁷⁷.

Physiologiquement, nous pouvons aussi relever quelques uns de ces antagonismes. Les rôles diamétralement opposés de l'une et l'autre des cytokines sur la présentation antigénique et la maturation des APC peuvent vraisemblablement contrôler toute la réponse immunitaire. La différenciation des lymphocytes T CD4 est aussi un exemple utile. En effet, une déficience en SOCS1 (médiateur qui inhibe entre autres la voie IFN- γ) limite la différenciation, entre autre TGF- β -dépendante, des CD4 Th17²⁹¹. Nous pouvons alors croire que la différenciation des Th17 requiert à la fois une activation de la voie du TGF- β et une inhibition de celle de l'IFN- γ . La survie des lymphocytes effecteurs est négativement régulée par l'IFN- γ et positivement par le TGF- β ²⁴⁰. Bien que les mécanismes qui sous-tendent ces observations soient incomplètement compris, la régulation différentielle de FasL par les deux cytokines pourrait offrir une explication^{292,293}. Une exception à cette règle générale semble toucher la sous-population des effecteurs CD8 de courte durée – *short-lived CD8 effectors*, où le TGF- β amène une apoptose via la diminution de la molécule anti-apoptotique Bcl-2²⁹⁴.

Enfin, la relation entre l'IFN- γ et le TGF- β peut aussi être vue comme un rapport de type Ying-Yang. En effet, nous devons introduire une notion de complémentarité à celle d'opposition. Ainsi, il est utile de mentionner quelques exemples où les actions simultanées ou séquentielles des deux cytokines sont collaboratrices. Un exemple

éclairant à ce sujet concerne la régulation de la réponse immunitaire dans le temps. En effet, bien que les deux cytokines régissent les fonctions des macrophages différemment, elles collaborent harmonieusement. L'IFN- γ stimule la phagocytose, la présentation antigénique, l'induction d'iNOS et la production d'IL-12, des mécanismes importants au début de la réponse immunitaire. Toutes ces fonctions sont inhibées par le TGF- β ^{179,231}, qui lui favorise les fonctions macrophagiennes utiles à la résolution de l'inflammation et à la réparation des tissus. Il appert cependant, que l'organisme profite de cet antagonisme dans le maintien de l'homéostasie²⁹⁵. Le cas de la répression de l'IL-12 chez les macrophages pourrait même être particulièrement intéressant et révélateur quant au dialogue moléculaire qu'entretiennent les deux voies. En effet, le gène de l'IL-12 est réprimé par l'axe TGF- β /SMAD mais requiert pour cela un site intact de liaison pour IRF-1 au niveau du promoteur du gène de l'IL-12²⁹⁶. Ceci suggère qu'une induction d'IRF-1 par IFN- γ est un préalable pour potentialiser l'effet répresseur des SMAD dans ce cas. La notion d'antagonisme entre les deux cytokines doit donc encore être interprétée dans un contexte plus large d'homéostasie. Rappelons que certaines fonctions sont aussi contrôlées de la même façon par l'IFN- γ et le TGF- β , notamment l'inhibition de la prolifération cellulaire. En terminant, les frontières sont parfois difficiles à déterminer (peut-être parce qu'artificielles ?) dans les phénotypes qu'induisent les deux cytokines. Un bon exemple est la différenciation des lymphocytes T CD4 où la co-expression de T-bet et FoxP3 peut être observée²⁹⁷, tout comme la co-sécrétion d'IL-17 et d'IFN- γ ^{32,298}.

5- Hypothèse globale et nouvelles connaissances sur le rôle de l'IFN- γ et de l'axe TGF- β /SMAD3 dans la régulation de la GVHD.

Notre hypothèse était que les cytokines maîtresses IFN- γ et TGF- β (par le biais de son médiateur canonique SMAD3) contrôlent la GVHD en modulant la reconstitution hématopoïétique et la différenciation des cellules greffées. Plus précisément, nous voulions savoir comment s'articulent les propriétés pléiotropiques et largement opposées de l'une et l'autre dans un contexte physiologique précis, l'AHCT.

5.1- Les niveaux d'IFN- γ programment la reconstitution hémato-lymphoïde et la signalisation par l'IFN- γ R module la GVHD pulmonaire et intestinale.

Nous mettons en évidence dans le premier article que l'IFN- γ exerce de façon dose-dépendante un rôle prépondérant dans l'homéostasie des cellules du donneur post-AHCT. Nous montrons qu'il y a une relation entre l'exposition à de forts niveaux d'IFN- γ et un échec de reconstitution hémato-lymphoïde. Nous avons pu démontrer que l'apoptose médiée par Fas et un défaut de prolifération sous-tendent ce phénomène. De plus, nos travaux évoquent une notion de programmation, car l'exposition à des doses élevées d'IFN- γ ne survient que tôt après la greffe, alors que le phénotype d'échec de reconstitution atteint son apogée près de deux semaines plus tard. Il est commun d'observer des cytopénies durant la GVHD chez l'humain dont les causes sont obscures. Nos travaux jettent donc un éclairage nouveau sur l'homéostasie des cellules du donneur en GVHD. L'article comprend aussi des données importantes sur le rôle d'une signalisation par l'IFN- γ dans les tissus cibles de la GVHD chez le receveur tels le poumon, le foie et l'intestin, notamment pour ce qui est de l'induction des MHC sur les tissus cibles de la GVHD.

5.2- L'absence de SMAD3 chez les cellules du donneur accentue la GVHD

Tel que décrit dans Baron et al.¹⁷¹, la présence de hauts niveaux de transcrits de SMAD3 dans les cellules de donneurs sains protège contre le développement d'une GVHD chez les patients. Cette étude faite chez l'humain suggérait que SMAD3, un facteur de transcription déterminant de la voie canonique du TGF- β , limitait l'alloréactivité. Nous avons développé un modèle murin de GVHD, où les donneurs sont déficients ou non pour le gène SMAD3. Bien que l'absence de SMAD3 n'altère pas les compartiments hématopoïétiques et immunologiques des souris donneuses maintenues dans des conditions libres de pathogènes, les greffons déficients pour le gène SMAD3 causent une GVHD beaucoup plus sévère. Ce modèle murin nous a permis de directement investiguer les mécanismes par lesquels SMAD3 pourrait exercer un effet protecteur en GVHD. Nos résultats indiquent que SMAD3 a un rôle important dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation Th1 des lymphocytes T CD4 et dans l'expansion et la fonction des cellules myéloïdes, particulièrement des granulocytes. La GVHD que nous observions était principalement localisée au niveau du colon, témoignant de la grande importance de l'axe TGF- β /SMAD3 dans l'homéostasie immunitaire de cet organe²⁹⁹. De plus, notre

étude a permis de relever pour la première fois des évidences directes suggérant que les neutrophiles causent des dommages en GVHD, via des processus d'oxydation.

5.3- Une forte stimulation par le TCR inhibe la voie TGF- β /SMAD3

L'absence d'atteinte auto-immune chez nos donneuses SMAD3-déficientes indique que SMAD3 n'est pas essentiel pour relayer les signaux tolérogènes de TGF- β à l'état basal. Cependant, lors d'un contact avec un alloantigène, SMAD3 limite la réponse T. Pourrait-il y avoir une interaction entre la voie TGF- β /SMAD3 et la voie TCR ? En examinant comment des lymphocytes peuvent s'affranchir de l'action inhibitrice tonique du TGF- β par une forte stimulation venant du TCR, nous pouvons dire que oui. En effet, le troisième article inclus ci-après montre que lors d'une stimulation par le TCR, SMAD3 est rapidement déphosphorylé (contrairement à SMAD2). Ainsi, au delà de son objectif premier, c'est-à-dire de démontrer un antagonisme fonctionnel entre les deux voies, cette étude nous suggère que la régulation de la phosphorylation de SMAD3 en est la conséquence principale.

5.4- Le transcriptome dépendant de la voie TGF- β /SMAD3 révèle des mécanismes susceptibles de contrôler la tolérance des lymphocytes T CD4.

Nous avons fait une étude de micro-puces de cDNA afin d'évaluer la réponse transcriptionnelle SMAD3-dépendante chez les lymphocytes T CD4 naïfs. Un résumé de données non-publiées est inclus dans cette thèse (annexe I). Nous y décrivons comment la stimulation de l'axe TGF- β /SMAD3 amène l'induction de nombreux gènes impliqués dans des processus susceptibles d'influencer la réponse immunitaire T CD4.

6-Articles et Annexe

6.1. Article I :

Delisle JS., Gaboury L., Bélanger MP., Tassé É., Yagita H., Perreault C.,

Graft-versus-host disease causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in interferon- γ receptor-deficient hosts, *Blood*. 2008;112:2111-2119

GVHD causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in IFN- γ receptor-deficient hosts

Short Title: IFN- γ in GVHD

Scientific heading: Transplantation

Jean-Sébastien Delisle^{1,2,4}, Louis Gaboury^{1,3}, Marie-Pier Bélanger¹, Éliane Tassé¹,
Hideo Yagita⁵ and Claude Perreault^{1,2,4*}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, and Departments of Medicine²
and Pathology-Cell Biology³, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3C
3J7

⁴ Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC,
Canada H1T 2M4

⁵Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Word counts: 197 in the abstract, 4261 words of text.

*** Correspondence:**

Claude Perreault

Abstract

Graft-versus-host disease (GVHD) immunopathology results from a type I T-cell process. However, a prototypical type I cytokine, interferon- γ (IFN- γ), can protect against several manifestations of GVHD in recipients of major histocompatibility complex (MHC)-mismatched hematopoietic cells. We transplanted hematopoietic cells from C3H.SW donors in wild-type (wt) and IFN- γ -receptor-deficient (IFN- γ RKO) MHC-matched C57BL/6 recipients. In IFN- γ RKO recipients, host cells were unresponsive to IFN- γ , while wt donor cells were exposed to exceptionally high levels of IFN- γ . From an IFN- γ perspective, we could therefore evaluate the impact of a loss-of-function on host cells and gain-of-function on donor cells. We found that lack of IFN- γ R prevented upregulation of MHC proteins on host cells but did not mitigate damage to most target organs. Two salient phenotypes in IFN- γ RKO recipients involved donor cells: lymphoid hypoplasia and hematopoietic failure. Lymphopenia was due to FasL-induced apoptosis and decreased cell proliferation. Bone marrow aplasia resulted from a decreased proliferation of hematopoietic stem/progenitor cells that was associated with downregulation of two genes negatively regulated by IFN- γ : *Ccnd1* and *Myc*. We conclude that IFN- γ produced by alloreactive T cells may entail a severe graft-versus-graft reaction and could be responsible for cytopenias that are frequently observed in subjects with GVHD.

Introduction

IFN- γ is a master regulator of adaptive immune responses.¹ IFN- γ modulates hundreds of genes regulating apoptosis and cell proliferation, antigen processing and presentation, as well as leukocyte trafficking and effector function. Though our comprehension of the molecular bases of IFN- γ signaling in the immune system has evolved rapidly, our understanding as to how IFN- γ signals in various cell types are integrated *in vivo* and impinge on systemic immunopathology is still rudimentary.

GVHD is the most important complication of allogeneic hematopoietic cell transplantation, accounting for most of the treatment-related morbidity and mortality.² It is a systemic disease affecting mostly the liver, intestine, skin and lymphoid organs.³⁻⁵ Studies in mouse models of GVHD have reported increased serum levels of IFN- γ and induction of IFN- γ transcriptional target genes in the skin and liver.^{6,7} However, IFN- γ was reported to have predominantly a protective influence on GVHD lethality in most though not all studies using IFN- γ -deficient donors, antibody mediated depletion or injection of IFN- γ .⁴ Use of IFN- γ receptor 1 chain-deficient (IFN- γ RKO) mice in MHC-mismatched transplants has further shown that the impact of IFN- γ on GVHD lethality resulted from effects on both donor T cells and host non-hematopoietic cells.^{8,9} Thus, alloreactive CD8 T cells from IFN- γ RKO and IFN- γ deficient donors expand more extensively than CD8 T cells from wt donors.⁸ Furthermore, lack of IFN- γ R on host pulmonary parenchyma enhances donor cell migration and expansion within the lung, and thereby causes severe pulmonary immunopathology.⁹

To gain further insights into the effects of IFN- γ and its potential use for GVHD prevention, we addressed two specific questions. First, does IFN- γ have a non-redundant role on MHC upregulation on host cells during GVHD? Second, does IFN- γ affect hematopoiesis and lymphopoiesis in recipients transplanted with allogeneic hematopoietic cells? We found that IFN- γ was indeed responsible for MHC upregulation on host epithelial cells. Though this effect was dramatic it seemed to have no untoward consequences. However, donor cells homeostasis was severely impaired in IFN- γ RKO recipients. Indeed, exposure to high levels of IFN- γ was associated with failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis.

Materials and methods

Mice

We used the following strains of mice: C57BL/6 (B6), B6.SJL-*Ptprc^aPep3^b*/BoyJ (Ly5^a) (B6.SJL), C3H.SW-H2^b (C3H.SW) and B6.129S7-*Ifngr1^{tm1Agt}*/J (IFN- γ RKO). Mice were obtained from the Jackson Laboratory and bred in the animal care facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer. We generated IFN- γ RKO mice homozygous at the *Ptprcap* locus (encoding the CD45 protein tyrosine phosphatase) by crossing B6.SJL (CD45.1) mice with IFN- γ RKO (CD45.2) mice. Mice were housed under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks. All procedures involving mice were approved by the Comité de Déontologie et d'Expérimentation Animale of the Université de Montréal.

Transplantation

C3H.SW female donor mice were immunized intraperitoneally with 20×10^6 male B6 splenocytes 14 days prior to transplant (day -14). One day prior to transplantation, B6, B6.SJL or IFN- γ RKO female recipient mice were irradiated (12Gy). On day 0, 4×10^6 bone marrow (BM) cells along with splenocytes containing 5×10^6 CD8 T cells from immunized C3H.SW donor mice were injected in the recipients' tail vein. Mice were weighed 3 times a week and monitored for signs of GVHD. A weight loss of 20% beyond day 10 post-transplantation, the occurrence of lesions covering more than 20% of skin surface or signs of distress (immobility, arched back, eyes closed) were considered survival end-points entailing euthanasia.

Histology, immunohistochemistry and blood counts

For immunohistochemistry, tissues were snap frozen in isopentane (-80°C). Sections (5 µm) were fixed in acetone before storage at -80°C or used immediately. Liver sections were treated for endogenous biotin blockade (Biotin/avidin kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) before staining. The Fast-Red system (Ventana Medical systems, Tucson, AZ) or HRP-Dab system (BD Biosciences, San Jose, CA) were used according to the manufacturer's instructions along with hematoxylin counter-stain. Biotinylated anti-H2-D^b and anti-I-A^b, were purchased from BD Biosciences. Tissues prepared for histology were fixed in buffered 10% formalin immediately after sampling, embedded in paraffin, cut in 5 µm sections and stained with hematoxylin and eosin according to standard methods. GVHD histological grading was performed by a single pathologist (LG) in a blinded fashion (grading scale in Table S1). Pictures from tissue sections were taken using the Axio-imager microscope and analyzed using the Axio-vision software version 4 (Carl Zeiss, Gena, Germany). Peripheral blood was collected in EDTA coated tubes and analyzed on an ACT diff 2 analyzer from Beckman Coulter (Fullerton, CA).

Flow cytometry and analysis of IFN-γ levels in spleen/BM extracts

We purchased the antibodies targeted to the following antigens and relevant isotype controls from BD Biosciences: CD8-APC, CD8-PE-Cy7, CD4-PerCP, CD4-APC-Cy7, TCR-β-FITC, TCR-β-APC, CD43-PE, CD11b-APC, CD19-FITC, CD19-PerCP-Cy5.5, LFA-1-PE-Cy7, CD107a-FITC, IFN-γ-PE-Cy7, L-PAM-PE, CD45.1-PE,

CD45.2-FITC, CD45.2-PerCP-Cy5.5, Sca-1-PE-Cy5.5, Sca-1-Alexa-700, C-kit-APC, C-kit-PerCP-Cy7, FLT3-PE as well as Lin markers (biotinylated CD11b, Gr-1, CD3 ϵ , B220, Ter119, NK1.1, CD11c, TCR β , TCR $\gamma\delta$) and Annexin V-PE. Anti-VLA-4-FITC was obtained from Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY). CD43-FITC was purchased from BioLegend. Hoechst 33342 was a kind gift from Dr Guy Sauvageau's Laboratory. Annexin V and Hoechst staining was done according to standard protocols. Intracellular staining for IFN- γ was done using the CYTOFIX/CYTOPERM kit from BD Biosciences after cells were stimulated for 4 hours with phorbol myristate acetate and ionomycin. Cell suspensions were analyzed using either an LSR II or Aria flow cytometer (BD Biosciences). Data were further analyzed using the FSC Express version 3 software (DeNovo Softwares, Thornhill, ON, Canada). Hepatic, pulmonary and intestinal leukocytes were obtained as described.¹⁰ IFN- γ levels in spleen extracts were measured using the Cytometric Bead Array (mouse inflammation kit) and those in bone marrow extracts were measured using the mouse IFN- γ Elisa kit, both from BD Biosciences.

Antibody mediated in-vivo neutralization of IFN- γ and FasL blockade

The neutralizing anti-FasL monoclonal antibody MFL4 has been described previously¹¹. MFL4 was injected intra-peritoneally at a dose of 500 μ g on days 0, 3, 6, 8, 10 and 12 post-transplantation. The neutralizing IFN- γ antibody R4-6A2¹² was administered according to the following scheme: 750 μ g on Day 0, 1000 μ g on days 2 and 4 and 500 μ g on days 6, 9 and 12. Control mice received equivalent doses of isotype-matched immunoglobulins (Medicorp, Montréal, Qc, Canada).

Quantitative RT-PCR

Cell subsets were sorted with a FACSAria flow cytometer, RNA was extracted with Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA), and quantitative RT-PCR was performed as previously described using an ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).¹³

Statistics

Survival data were analyzed using the log-rank test. All results shown in histograms represent the mean \pm SD and were analyzed using the unpaired Student *t*-test.

Results

IFN- γ RKO hosts display accelerated mortality

Previous studies on GVHD using IFN- γ RKO mice involved MHC-mismatched donor-recipient pairs. In order to reproduce the most common scenario in human hematopoietic cell transplantation, we elected to study acute GVHD induced by MHC-matched donor T cells. We therefore induced acute GVHD by injecting MHC-matched (but minor histocompatibility antigen disparate) C3H.SW donor cells into B6 recipients that were sensitive (wt) or insensitive to IFN- γ (IFN- γ RKO). As generally observed in recipients of MHC-matched donor cells, this strain combination does not yield a 100% acute GVHD rate.^{14,15} To induce lethal acute GVHD in all wt recipients we primed donors against recipient-type splenocytes prior to transplantation^{15,16}.

The use of wt or IFN- γ RKO recipients expressing the CD45.1 allotype allowed for assessment of C3H.SW donor cell (CD45.2) chimerism post-transplantation. Full donor chimerism, defined as more than 95% donor-derived hematopoietic cells, was reached in BM, spleen and liver by day 4 post-transplantation and in the intestine by day 8 (data not shown). IFN- γ RKO hosts sustained dramatic weight loss and suffered earlier mortality compared to wt hosts (Figure 1A-B). Histopathological evaluation of GVHD target organs on day 15 revealed several differences between wt and IFN- γ RKO recipients (Figure 1C,D). Hepatic pathological scores were similar in the two

host types, while intestinal lesions were less severe in IFN- γ RKO recipients, for both the small intestine (Figure 1C,D) and colon (data not shown). In stark contrast, skin and pulmonary involvement were more severe in IFN- γ RKO than in wt recipients. In particular, IFN- γ RKO lungs showed a massive inflammatory cell infiltrate and edema.

The cell lineage of donor leukocytes (CD45.2⁺) infiltrating host tissues was analyzed by flow cytometry using antibodies specific for the following markers: CD4, CD8, CD11b, CD19 and TCR β . Virtually all CD8⁺ and CD4⁺ cells also stained for TCR β , thus confirming that they were T lymphocytes (data not shown). The donor cell infiltrates contained similar proportions of CD8⁺ and CD11b⁺ cells in the liver, mostly CD8⁺ cells in the intestine and mainly CD11b⁺ cell in the lungs (Figure 1E), irrespective of host type. Overall, our data in an MHC-identical GVHD model confirm and extend two observations made in MHC-mismatched models^{8,9}: i) lack of IFN- γ R on host tissues differentially affects GVHD severity in various organs, and ii) the lethality of acute GVHD is increased in IFN- γ RKO compared to wt recipients.

IFN- γ signaling is necessary for MHC upregulation on host cells

Minor histocompatibility antigens are the target epitopes that trigger GVHD in recipients of MHC-identical hematopoietic cells.¹⁷ Cell surface density of minor histocompatibility antigens is proportional to expression of major histocompatibility complex (MHC) molecules.¹⁸ A quintessential feature of MHC molecules is that they are upregulated by IFN- γ .¹ Furthermore, in models where killing of targets cells is

mediated mainly by the T-cell granzyme-perforin pathway, cell surface density of MHC molecules determines target cell susceptibility to the T-cell attack.¹⁹ In view of evidence that the granzyme-perforin pathway may contribute to GVHD²⁰, one would therefore expect less severe GVHD in IFN- γ RKO than wt hosts. Indeed, IFN- γ RKO recipients should be unable to upregulate MHC expression in the presence of IFN- γ secreted by alloreactive donor T cells. How can we reconcile that line of reasoning with the fact that GVHD is more severe in IFN- γ R-deficient relative to wt recipients? We envisioned two explanations: either the effect of IFN- γ on MHC expression is redundant, or upregulation of MHC expression on host cells is not required for induction of acute GVHD.

To evaluate the merit of our two hypotheses, we examined expression of MHC molecules on host cells and granule exocytosis of donor CD8 T cells. When compared to syngeneic hosts, allogeneic wt recipients showed conspicuous upregulation of MHC molecules in the liver and intestine on day 8 post-transplantation (Figure 2A,B). While upregulation of MHC I was widespread, that of MHC II was limited to bile ducts and the intestinal submucosa. In IFN- γ RKO hosts, we found no upregulation of MHC II and no, or at most marginal, upregulation of MHC I (Figure 2A,B). Thus, the major MHC upregulation in GVHD was virtually IFN- γ -dependent. Of note, we could not assess MHC expression on host cells in the spleen or other lymphoid organs because they had already disappeared by day 4.

Lamp-1 (CD107a) is transiently expressed at the cell surface of CD8 T cells after degranulation¹⁹ and was used here as a surrogate marker of granule exocytosis by infiltrating CD8 T cells. Donor T cells that encounter host MiHAs are initially sequestered in the lymphoid tissues, particularly in the spleen, expand locally, and then re-enter the circulation several days later and infiltrate extra-lymphoid tissues.²¹ When compared with syngeneic hosts, donor CD8 T-cell degranulation in allogeneic recipients was clearly increased in the spleen on day 4 (Figure 2C,D), but not in the liver and intestines on day 8 (Figure 2C). We present data obtained on day 8 for the liver and intestine because almost no CD8 T-cell infiltration was detected in the intestine on day 4. Therefore, though wt hosts showed a dramatic IFN- γ -dependent upregulation of MHC expression in the liver and intestine (Figure 2A,B), the latter had no discernible impact on *in situ* CD8 T-cell granule exocytosis (Figure 2C).

High IFN- γ exposure and rapid T-cell activation in IFN- γ RKO recipients

Since IFN- γ RKO hosts do not provide cellular sinks for the IFN- γ that is produced during alloreactivity, we hypothesized that donor T cells might be exposed to higher amounts of IFN- γ in IFN- γ RKO hosts. We indeed found that the amount of IFN- γ in spleen extracts from day 4 recipients was increased about twofold in IFN- γ RKO relative to wt hosts (Figure 3A). Discrepancy in levels of IFN- γ in the two hosts was not due to differential numbers (data not shown) or proportion (Figure 3B) of IFN- γ -producing T cells. Downregulation of the second chain of the IFN- γ receptor (*Ifngr2*) transcription is a reliable indicator of IFN- γ signaling *in vivo*.²² RT-PCR analyses revealed that early post-transplant, the levels of *Ifngr2* transcripts in donor T cells

were lower in IFN- γ RKO than wt hosts (Figure 3C). Thus, in IFN- γ RKO recipients, high levels of IFN- γ correlated with decreased *Ifngr2* mRNA in donor T cells. These two coherent features were strictly early events. Discrepancies between IFN- γ RKO and wt hosts were found on day 4 but not day 8. Overall, these data support the assumption that donor and host cells compete for IFN- γ released in the extracellular milieu. In IFN- γ RKO hosts, donor T cells do not produce more IFN- γ but are exposed to higher levels of IFN- γ because of lack of IFN- γ binding by host cells.

Exposure to high levels of IFN- γ was associated with a more rapid acquisition of effector status by T cells, as evidenced by staining with 1B11 antibody (Figure 3D). The 1B11 monoclonal antibody recognizes an isoform of CD43 whose expression is induced on activated CD8 and CD4 T cells and correlates with effector function.^{23,24} As for *Ifngr2* transcripts modulation, discrepancies between IFN- γ RKO and wt hosts were found on day 4 but not day 8 (Figure 3D). Effector T cells must upregulate specific integrins to infiltrate nonlymphoid tissues. In line with this, 1B11⁺ T cells strongly expressed Very late antigen-4 (VLA-4), Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and Lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule (L-PAM) compared to their 1B11⁻ counterparts (Figure 3E). Furthermore, almost all liver and intestinal infiltrating CD8 T cells expressed 1B11 in both types of recipients (Figure 3F). Thus, donor T cells acquired more swiftly the ability to infiltrate nonlymphoid tissues in IFN- γ RKO, probably as a consequence of exposure to higher levels of IFN- γ .

Hematolymphoid reconstitution by donor cells is blocked in IFN- γ RKO hosts

Lymphoid atrophy is a most important hallmark and lethal consequence of GVHD.³ We found that IFN- γ RKO hosts developed a particularly severe lymphoid atrophy (Figure 4). Spleen involvement was significantly more severe in IFN- γ RKO compared to wt hosts, both grossly (Figure 4A) and histologically (Figure 4B). On day 8 and 15, splenocyte counts revealed a profound hypocellularity in IFN- γ RKO compared to wt recipients (syngeneic reconstitution is also shown for comparison) (Figure 4C). Spleen hypocellularity reached a nadir on day 15 and involved all cell subsets analyzed: CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ and CD19⁺ (Figure 4D).

Donor hematopoietic cells were exposed to high concentrations of IFN- γ in the spleen (Figure 3A) and BM (Figure 4E) of IFN- γ RKO hosts. Since IFN- γ can induce BM aplasia²⁵, we therefore hypothesized that donor hematopoiesis might be hampered in IFN- γ RKO hosts. On day 15, BM cellularity in IFN- γ RKO recipients was decreased by about 5.6 fold compared with syngeneic and allogeneic wt recipients (Figure 4F). This deficit affected both mature Lin⁺ (CD11b, Gr-1, CD11c, B220, Ter119, CD3 ϵ , TCR β , TCR $\gamma\delta$, NK1.1) cells and the immature LSK (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺) cellular subset (Figure 4G). We conclude that GVHD in IFN- γ RKO dramatically hampered hematolymphoid reconstitution by donor cells.

Failure of hematolymphoid reconstitution in IFN- γ RKO hosts is IFN- γ -dependent

Following hematopoietic cell transplantation, both the spleen and BM contribute to hematopoiesis.^{26,27} To determine whether failure of hematolymphoid reconstitution by wt donor cells in IFN- γ RKO hosts was IFN- γ -dependent, we injected recipients with neutralizing R4-6A2 anti-IFN- γ antibody. One caveat of our approach is that injected IgG reach much higher levels in the liver and spleen than in the BM.^{28,29} Injection of anti-IFN- γ antibody into IFN- γ RKO hosts led to a 30-fold increase in spleen cellularity compared with recipients that were given control-antibodies (Figure 5A). That effect was dose-dependent since increased spleen cellularity was less dramatic in recipients injected with only 70% of the antibody dose (Figure 5A). Neutralization of IFN- γ also increased peripheral blood neutrophils, monocytes and lymphocytes, and spleen LSKs (immature hematopoietic stem/progenitor cells) (Figure 5C-E). Injection of anti-IFN- γ antibody was also associated with a modest increase in BM cellularity that failed to reach statistical significance ($p=0.07$) (Figure 5B). Thus, IFN- γ neutralization corrected peripheral blood leukocyte counts and improved hematolymphoid reconstitution. Differential biodistribution of IgG^{28,29} presumably explains why injection of anti-IFN- γ antibody had a more significant impact on LSK expansion in the spleen than in the BM.

FasL-dependent apoptosis and decreased donor cell proliferation are responsible for spleen hypoplasia

We next explored the mechanisms by which IFN- γ might exert its effects. Substantial evidence suggests that in myeloablated recipients, GVHD-induced atrophy of lymphoid organs is due to apoptosis of donor cells induced mainly, though not

exclusively, by upregulation of FasL on alloreactive CD8 T cells.^{30,31} Since expression of FasL is upregulated by IFN- γ ³², we hypothesized that lymphoid atrophy in IFN- γ RKO could be due to FasL-mediated apoptosis. This hypothesis was supported by two observations. On day 15 all subsets of donor-derived splenocytes (Ly5.2⁺) showed increased proportions of apoptotic cells (Annexin V positive) in IFN- γ RKO compared to wt hosts (Figure 6A). Furthermore, RT quantitative PCR demonstrated that *FasL* transcripts were increased to higher levels in donor CD8 T cells obtained from IFN- γ RKO relative to wt recipients (Figure 6B). No significant *FasL* modulation was found in donor CD4 lymphocytes (data not shown). In order to directly implicate the FasL/Fas pathway in IFN- γ RKO hosts, an *in vivo* neutralization assay was conducted. The anti-FasL monoclonal antibody MFL4 specifically blocks FasL/Fas interactions.³³ We injected MFL4 antibody (or isotype matched control IgG) at a dose of 500 μ g on days 0, 3, 6, 8, 10 and 12 post-transplantation. On day 15, spleen cellularity was assessed. *In vivo* FasL blockade increased spleen cellularity 1.8 fold in wt and 8.8 fold in IFN- γ RKO recipients (Figure 6C-D). FasL induces “bystander killing” of all Fas⁺ cells, and IFN- γ upregulates Fas expression on all leukocyte subsets. In accordance with that, no specific cellular subset (CD8⁺, CD4⁺, CD11b⁺ or CD19⁺) appeared to be disproportionately altered by FasL blockade (data not shown). However, spleen cellularity was still lower in IFN- γ RKO hosts injected with anti-FasL antibody than in wt hosts injected with the isotype control antibody (Figure 6C). We thus conclude that FasL-mediated apoptosis of donor cells was only partly responsible for spleen hypoplasia.

IFN- γ can have pleiotropic effects on cell proliferation.¹ Using Hoechst staining, we found that the percentage of donor-derived splenocytes undergoing cell cycling was lower in IFN- γ RKO than wt hosts (Figure 6E) on day 15 post-transplantation. That was true for all spleen cellular subsets except for the few CD19⁺ cells. This discrepancy in cell cycling was already present on day 8 post-transplantation in CD8 T lymphocytes and CD11b⁺ cells (data not shown). Overall, these data suggest that the marked lymphoid atrophy in IFN- γ RKO hosts involved two processes: FasL-mediated apoptosis and inhibition of cell proliferation.

BM failure in IFN- γ RKO hosts correlates with decreased proliferation of donor hematopoietic stem cells

Donor-derived BM cells (Ly5.2⁺) did not show an increased rate of apoptosis in IFN- γ RKO hosts (Figure 7A). The apoptotic rate of LSK stem/progenitor cells in IFN- γ RKO hosts was even inferior to that of LSK cells in wt recipients. Furthermore, in vivo FasL blockade did not alter day 15 BM cellularity in either host types (Figure 7B). Thus, failure of donor hematopoiesis was not due to increased apoptosis.

After myeloablative conditioning, donor hematopoietic stem/progenitor cells must undergo massive proliferation. In accordance with this, we found that on day 15, the proportion of cycling LSK cells (but not mature Lin⁺ cells) was increased about 3.5-fold in wt recipients relative to untreated mice (Figure 7C). The key finding was that the proportion of cycling LSK cells was significantly lower in IFN- γ RKO than wt hosts (Figure 7 C,D) The LSK compartment contains hierarchically related

subpopulations: FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) negative LSK (LSKF⁻) cells contain long-term and short-term reconstituting HSCs whereas LSKF⁺ cells are multipotent progenitors that have lost self-renewal potential.³⁴ The higher number of cycling cells in wt compared to IFN- γ RKO hosts strictly involved LSKF⁻ cells, that is, the cell subset containing hematopoietic stem cells (Figure 7E). To gain further insight into the mechanisms of BM failure in IFN- γ RKO recipients, we used quantitative RT-PCR to compare expression of 6 cell cycle related genes in three cells subsets (LSKF⁻, LSKF⁺ and Lin⁺ cells) from two groups of recipients (IFN- γ RKO and wt): *Myc*, *Ccnd1*, *Ccnd2*, *Cdkn1a*, *Cdkn1b* and *Cdc25a*. None of the genes were differentially expressed in LSKF⁺ and Lin⁺ cell subsets (data not shown). However, two transcripts were downregulated in LSKF⁻ from IFN- γ RKO relative to wt hosts: *Ccnd1* and *Myc* (Figure 7F). These results suggest that failure of donor hematopoiesis was due decreased proliferation and downregulation of *Ccnd1* and *Myc* specifically in donor LSKF⁻ cells.

Discussion

Upregulation of MHC expression on host epithelial cells is a hallmark of GVHD and it is generally assumed that MHC upregulation plays a critical role in GVHD pathophysiology.³⁵ We report that IFN- γ is responsible for MHC upregulation on host parenchymal cells in acute GVHD. This finding is perfectly consistent with the key role of IFN- γ in regulating expression of cell surface MHC through induction of MHC genes transcription and enhanced generation of MHC-binding peptides.³⁶ If upregulation of MHC on host cells was instrumental in GVHD pathophysiology, its abrogation should mitigate GVHD severity. We found that, except for the intestine, GVHD was equivalent or more severe in IFN- γ R than wt recipients. These findings are consistent with studies in MHC-mismatched strain combinations.^{8,9} Productive interactions between CD8 effector T cells and target cells lead to exocytosis of cytotoxic granules containing perforin and granzymes. While we found clear evidence of donor CD8 T-cell granule exocytosis (as evidenced by cell surface expression of CD107a) in the spleen of both recipient types, we detected no GVHD-related accumulation of CD107a⁺ CD8 T cells in the liver and intestine (Figure 3C). Our data support the concept that the perforin-granzyme cytotoxicity pathway is dispensable for induction of target organs damage in acute GVHD. They also lead us to conclude that, except perhaps for the intestine, upregulation of MHC expression on host epithelial cells has no impact on acute GVHD severity.

Generation of effector phenotype CD8 T cells occurred earlier in IFN- γ RKO than wt recipients (Figure 3). This is consistent with the recent demonstration that IFN- γ

accelerates generation of effector T cells during viral infection.³⁷ However, in our GVHD model, this effect was transient and its biological impact may therefore be limited. By contrast, two dramatic phenotypes affecting donor cells were associated with exposure to high levels of IFN- γ in IFN- γ RKO recipients: lymphoid hypoplasia and failure of donor hematopoiesis. GVHD is the main factor governing the pace of immune reconstitution following allogeneic hematopoietic cell transplantation.³⁸ GVHD damages the thymic microenvironment and inhibits peripheral expansion of postthymic mature T cells.^{3,30,38,39} Only a small percentage of mature T cells express T-cell receptors that recognize host histocompatibility antigens. However, though inhibition of mature T cell peripheral expansion in GVHD is initiated selectively by host-reactive T cells, it affects both host-reactive and non-host-reactive donor T cells, and therefore has a major global impact on the postthymic T-cell compartment.^{3,30} The host environment, and not an intrinsic T-cell defect, is primarily responsible for the lack of T-cell expansion in GVHD. Thus, host-tolerant T cells fail to expand properly when transferred into GVHD mice, but T cells obtained from animals undergoing GVHD expand normally in thymectomized secondary syngeneic hosts.^{3,40} In our model, neutralization of IFN- γ and FasL coupled with cell cycle analyses (Figures 5 and 6) revealed that lack of donor T-cell expansion in IFN- γ RKO recipients was IFN- γ -dependent and involved two mechanisms downstream of IFN- γ : FasL-induced apoptosis and decreased T-cell proliferation. These observations are congruent with the notion that upregulation of FasL and inhibition of T-cell proliferation are typical effects of IFN- γ signaling.^{32,41,42} Furthermore, they suggest that IFN- γ plays a dominant role in hampering T-cell peripheral expansion in GVHD.

Failure of donor hematopoiesis was arguably the most striking phenotype observed in IFN- γ RKO hosts (Figure 4E,F and Figure 5C,D). Antibody mediated IFN- γ neutralization reversed blood cytopenias, restored spleen cellularity and expansion of spleen LSKs but had only a modest effect on BM LSKs. This suggests that complete correction of IFN- γ -induced hematopoietic failure will probably require very high doses of neutralizing anti-IFN- γ antibody or development of pharmacologic IFN- γ inhibitors. Failure of donor hematopoiesis was not associated with increased apoptosis of mature or immature hematopoietic cells. Hematopoietic failure in IFN- γ RKO hosts was associated with decreased proliferation of a specific cell subset: LSKF⁻ stem/progenitor cells (Figure 7 C-E). These LSK cells displayed downregulation of two gene transcripts that promote cell cycling and that are negatively regulated by IFN- γ ⁴³⁻⁴⁵: *Ccnd1* and *Myc*. Why would hematopoietic stem/progenitor cells be particularly susceptible to the anti-proliferative effect of IFN- γ produced by alloreactive CD8 T cells? That might be explained by two factors. First, LSK cells must undergo extensive proliferation in recipients of hematopoietic cell grafts. Second, sites of posttransplantation LSK cell expansion (BM and spleen^{26,27}) are preferential sites of migration and proliferation of effector and memory CD8 T cells.^{21,46} Further studies are needed to understand how IFN- γ may hinder expansion of LSKF⁻ stem/progenitor cells. Nonetheless, substantial evidence suggests that production of IFN- γ by CD8 T cells is responsible for acquired aplastic anemia in humans.⁴⁷ Thus, an IFN- γ signature has been found in CD34 cells of subjects with acquired aplastic anemia.⁴⁸ We therefore propose that IFN- γ produced by alloreactive donor T cells may be responsible for the frequent cytopenias of obscure etiology found in patients with GVHD.⁴⁹ By causing failure of donor

hematopoiesis and lymphopoiesis, we infer that IFN- γ may entail a graft-versus-graft reaction. If this conclusion is validated in human studies, manipulation of IFN- γ signaling might be invaluable for the treatment or prevention of GVHD-associated cytopenias.

Acknowledgements

We are grateful to Danièle Gagné for help with flow cytometry and cell sorting, to Christian Charbonneau for imaging, to Denis Rodrigue and Julie Hinsinger for immunohistochemistry troubleshooting, to Marie-Pierre Hardy and Giovanni D'Angelo for technical help, to Marie-Ève Blais for help in manuscript preparation and to Pierre Chagnon for help with quantitative PCR. We wish to acknowledge the expertise of the personnel of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) animal facility. This work was supported by funds from the Leukemia & Lymphoma Society of Canada, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Katelyn Bedard Bone Marrow Association. JSD is a Canadian Institutes for Health Research Clinician-Scientist (Phase 1). CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology.

Authorship

JSD and CP designed research; HY contributed vital reagents (MFL4 and R4-6A2) and advice; JSD, LG, MPB and ET performed research; JSD, HY, LG and CP analyzed data; JSD and CP drafted the paper; LG and HY edited the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

- (1) Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:375-386.
- (2) Graft-vs.-host disease. Third ed. New York: Marcel Dekker; 2005.
- (3) Dulude G, Roy DC, Perreault C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med.* 1999;189:1329-1342.
- (4) Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:139-170.
- (5) Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:340-352.
- (6) Ichiba T, Teshima T, Kuick R et al. Early changes in gene expression profiles of hepatic GVHD uncovered by oligonucleotide microarrays. *Blood.* 2003;102:763-771.
- (7) Sugerman PB, Faber SB, Willis LM et al. Kinetics of gene expression in murine cutaneous graft-versus-host disease. *Am J Pathol.* 2004;164:2189-2202.

- (8) Asavaroengchai W, Wang H, Wang S et al. An essential role for IFN-g in regulation of alloreactive CD8 T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:46-55.
- (9) Burman AC, Banovic TD, Kuns RD et al. IFN γ differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood.* 2007;110:1072.
- (10) Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science.* 2001;291:2413-2417.
- (11) Kayagaki N, Yamaguchi N, Nagao F et al. Polymorphism of murine Fas ligand that affects the biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:3914-3919.
- (12) Havell EA. Purification and further characterization of an anti-murine interferon-gamma monoclonal neutralizing antibody. *J Interferon Res.* 1986;6:489-497.
- (13) Baron C, Somogyi R, Greller LD et al. Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene expression profiling. *PLoS Med.* 2007;4:e23.
- (14) Fontaine P, Langlais J, Perreault C. Evaluation of in vitro cytotoxic T lymphocyte assays as a predictive test for the occurrence of graft vs host disease. *Immunogenetics.* 1991;34:222-226.

- (15) Korngold R, Sprent J. Variable capacity of L3T4⁺ T cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. *J Exp Med*. 1987;165:1552-1564.
- (16) Perreault C, Jutras J, Roy DC, Filep JG, Brochu S. Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 1996;98:622-628.
- (17) Perreault C, Décary F, Brochu S et al. Minor histocompatibility antigens. *Blood*. 1990;76:1269-1280.
- (18) Griem P, Wallny HJ, Falk K et al. Uneven tissue distribution of minor histocompatibility proteins versus peptides is caused by MHC expression. *Cell*. 1991;65:633-640.
- (19) Meunier MC, Delisle JS, Bergeron J et al. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med*. 2005;11:1222-1229.
- (20) Braun MY, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 1996;183:657-661.
- (21) Korngold R, Sprent J. Selection of cytotoxic T-cell precursors specific for minor histocompatibility determinants. I. Negative selection across H-2

barriers induced with disrupted cells but not with glutaraldehyde-treated cells: evidence for antigen processing. *J Exp Med.* 1980;151:314-327.

- (22) Haring JS, Corbin GA, Harty JT. Dynamic regulation of IFN- γ signaling in antigen-specific CD8⁺ T cells responding to infection. *J Immunol.* 2005;174:6791-6802.
- (23) Harrington LE, Galvan M, Baum LG, Altman JD, Ahmed R. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J Exp Med.* 2000;191:1241-1246.
- (24) Baron C, Meunier MC, Caron E et al. Asynchronous differentiation of CD8 T cells that recognize dominant and cryptic antigens. *J Immunol.* 2006;177:8466-8475.
- (25) Chen J, Lipovsky K, Ellison FM, Calado RT, Young NS. Bystander destruction of hematopoietic progenitor and stem cells in a mouse model of infusion-induced bone marrow failure. *Blood.* 2004;104:1671-1678.
- (26) Antin JH, Weinberg DS, Rapoport JM. Evidence that pluripotential stem cells form splenic colonies in humans after marrow transplantation. *Transplantation.* 1985;39:102-105.
- (27) Maillard I, Schwarz BA, Sambandam A et al. Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood.* 2006;107:3511-3519.

- (28) Johnson TK, Gonzalez R, Kasliwal RK et al. Distribution of a breast-directed I-131-radiolabeled monoclonal antibody in blood and bone marrow: implications for radiation immunotherapy. *Radiology*. 1992;182:107-114.
- (29) Vallabhajosula S, Kuji I, Hamacher KA et al. Pharmacokinetics and biodistribution of ¹¹¹In- and ¹⁷⁷Lu-labeled J591 antibody specific for prostate-specific membrane antigen: prediction of ⁹⁰Y-J591 radiation dosimetry based on ¹¹¹In or ¹⁷⁷Lu? *J Nucl Med*. 2005;46:634-641.
- (30) Brochu S, Rioux-Massé B, Roy J, Roy DC, Perreault C. Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood*. 1999;94:390-400.
- (31) Drobyski WR, Komorowski R, Logan B, Gendelman M. Role of the passive apoptotic pathway in graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2002;169:1626-1633.
- (32) Puliaev R, Nguyen P, Finkelman FD, Via CS. Differential requirement for IFN-g in CTL maturation in acute murine graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2004;173:910-919.
- (33) Kayagaki N, Yamaguchi N, Nagao F et al. Polymorphism of murine Fas ligand that affects the biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:3914-3919.

- (34) Månsson R, Hultquist A, Sidinh L et al. Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity*. 2007;26:407-419.
- (35) Ferrara JLM, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of graft-vs.-host disease. In: Ferrara JLM, Cooke KR, Deeg HJ, eds. *Graft-vs.-host disease*. New York: Marcel Dekker; 2005:1-34.
- (36) Strehl B, Seifert U, Krüger E, Kuckelkom U, Kloetzel PM. Interferon-g, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev*. 2005;207:19-30.
- (37) Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. Interferon-g acts directly on CD8⁺ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med*. 2005;201:1053-1059.
- (38) Mackall CL, Hakim FT, Velardi A. The immune system in graft-vs.host disease: target and effector organ. In: Ferrara JL, Cooke KR, Deeg HJ, eds. *Graft-vs-Host Disease*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2005:195-228.
- (39) Brochu S, Baron C, Hetu F, Roy DC, Perreault C. Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras. *J Immunol*. 1995;155:5104-5114.
- (40) Gorski J, Chen X, Gendelman M et al. Homeostatic expansion and repertoire regeneration of donor T cells during graft versus host disease is constrained by the host environment. *Blood*. 2007;109:5502-5510.

- (41) Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-g: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75:163-189.
- (42) Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-g induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.* 1998;58:2832-2837.
- (43) Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 2004;18:2747-2763.
- (44) Murphy MJ, Wilson A, Trumpp A. More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends Cell Biol.* 2005;15:128-137.
- (45) Topisirovic I, Capili AD, Borden KL. Gamma interferon and cadmium treatments modulate eukaryotic initiation factor 4E-dependent mRNA transport of cyclin D1 in a PML-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 2002;22:6183-6198.
- (46) Di Rosa F, Pabst R. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol.* 2005;26:360-366.
- (47) Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood.* 2006;108:2509-2519.

- (48) Zeng W, Miyazato A, Chen G et al. Interferon-g-induced gene expression in CD34 cells: identification of pathologic cytokine-specific signature profiles. *Blood*. 2006;107:167-175.
- (49) Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*. 2003;54:29-52.

Figure Legends

Figure 1. IFN- γ RKO hosts suffer early GVHD mortality. (A,B) Weight fluctuations and survival for wt syngeneic (blue), wt allogeneic (red) and IFN- γ RKO allogeneic (green) recipients (≥ 12 animals per group). The p value indicates the difference between wt and IFN- γ RKO hosts using the log-rank test. (C) Histological changes associated with GVHD. Infiltration of hepatic portal tracts (pt) (200X magnification) is shown as well as cutaneous dermal (d) and epidermal (e) involvement (200X magnification). Representative sections of intestines and lung are also shown (100X magnification). (D) Histopathological grading using a score of 0 to 4, evaluated blindly on a minimum of 3 mice per group. (E) Proportion of CD8⁺, CD4⁺ and CD11b⁺ cells in donor leukocytes recovered from the liver, intestine and lung tissue of at least 3 mice per group, from 3 independent experiments. In histograms, data represent the mean and SD. * and *** indicate *P* values < 0.05 and < 0.001 , respectively.

Figure 2. IFN- γ signaling is necessary for MHC upregulation. Immunostaining for MHC I (H2-D^b), MHC II (I-A^b) in the liver (A) (magnification 100X) and intestine (B) (magnification 100X for H2-D^b and 200X for I-A^b) of syngeneic (wt) and allogeneic (wt and IFN- γ RKO) recipients on day 8 post-transplantation. Positive staining is red for hepatic and brown for intestinal tissues. Biliary ducts (bd) and intestinal sub-mucosa (sm) are indicated by arrows. Staining with isotype controls was negative and omitted from the figure for clarity. One representative experiment

of three is shown. (C) One representative set of data out of a minimum of 3 showing CD107a expression on donor CD8 T lymphocytes from the spleen, liver and intestine. No CD8-positive population could be detected in syngeneic hosts' intestines on day 8 post-transplantation. (D) Proportion of CD107a⁺ cells among CD8⁺ T cells in the spleen of syngeneic and allogeneic recipients. Histograms represent the mean and SD for at least 3 mice per group, from 3 independent experiments. ** $P < 0.01$.

Figure 3. Exposure to high levels of IFN- γ and rapid generation of effector CD8 T cells in IFN- γ RKO recipients. (A) IFN- γ levels in spleen extracts on day 4 (d4) and 8 (d8) post-transplantation. (B) Proportion of IFN- γ -positive CD4 and CD8 T lymphocytes after short *in vitro* stimulation. (C) Expression of *ifngr2* transcripts in CD8 and CD4 T cells from wt and IFN- γ RKO recipients. Data are normalized relative to *ifngr2* mRNA expression in CD8 and CD4 splenocytes from unmanipulated donor-type (C3H.SW) mice. (A-C) Histograms represent the mean and SD for at least 3 mice per group from experimental triplicates. (D) Percentage of 1B11⁺ CD8 and CD4 donor T cells in the spleen on day 4 and 8 ($n \geq 4$ /group from 4 different experiments, mean and SD). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (A-D). (E) Expression of VLA-4, LFA-1 and L-PAM on 1B11⁺ and 1B11⁻ CD8 T cells on day 4. (F) Proportion of 1B11⁺ cells among hepatic and intestinal infiltrating CD8 T cells on day 8 post-transplantation. (E,F) Results were similar for wt ($n = 4$) and IFN- γ RKO ($n = 4$) recipients. One representative data set out of 4 wt recipients is shown. .

Figure 4. Spleen and BM aplasia in IFN- γ RKO hosts. (A) Picture showing the spleen of a normal B6 mouse and the spleens of wt and IFN- γ RKO recipients on day 15 post-transplantation. (B) Histological scoring (0 to 4) of spleen GVHD based on criteria displayed in Table S1 (3 mice per group). (C) Spleen cellularity at three time points (day 4, 8 and 15), in wt, IFN- γ RKO as well as in syngeneic (C3H.SW) hosts. (D) Numbers of CD8⁺, CD4⁺, CD11b⁺ and CD19⁺ cells in the spleen of wt and IFN- γ RKO recipients on day 15. (B-D) Histograms represent the mean and SD of at least 3 mice per group from 3 distinct experiments. (E) IFN- γ levels in BM supernatants harvested on day 4 (d4) and 8 (d8) post-transplantation. (F) BM cellularity on day 15 post-transplantation in syngeneic and allogeneic recipients. Absolute number of cells per BM sample obtained from 1 tibia and 1 femur. (G) Absolute numbers of donor Lin⁺ and LSK cells in wt and IFN- γ RKO hosts. (E-G) Histograms represent the mean and SD of at least 3 mice per group from one representative experiment out of two. Statistically significant differences between wt and IFN- γ RKO hosts are shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5. IFN- γ neutralization corrects splenic atrophy and cytopenias

(A,B) Spleen and BM cellularity (on day 15) from 3 distinct experiments and comparing 3 groups of mice: wt (n = 5), IFN- γ RKO hosts injected with anti-IFN- γ antibody R4-6A2 (n = 9), and IFN- γ RKO hosts injected with isotype-matched immunoglobulins (IFN- γ RKO without IFN- γ neutralization) (n = 10). In (A) we also show in light gray the spleen cellularity of 3 IFN- γ RKO hosts injected with 70% of the maximal dose of R4-6A2 antibody (n = 3). (C) Peripheral blood leukocyte counts

in wt hosts (n=5), IFN- γ RKO hosts with IFN- γ neutralization (n = 5) and IFN- γ RKO hosts without IFN- γ neutralization (n = 7), compiled from two separate experiments. (D) Differential blood leukocyte counts. PMN stands for polymorphonuclear cells. All biological replicates from (C) are represented by dots and the mean is indicated by the bars. (E) Percentage of c-kit⁺/Sca-1⁺ cells from the Lin⁻ fraction among day 15 splenocytes. On one mouse representative of at least 5 per group. (F) Numbers of LSK cells per spleen in IFN- γ RKO recipients; 3 mice per group, one representative experiment out of two. All histograms represent mean and SD. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

Figure 6. Lymphoid atrophy in IFN- γ RKO hosts is due to FasL-mediated apoptosis and inhibition of cell proliferation. (A) Proportion of apoptotic cells in the spleen on day 15 post-transplantation. Apoptotic cells were defined as Annexin V-positive propidium iodine-negative cells (Ann V⁺/PI⁻). Mean and SD of at least 3 mice per group from one representative experiment out of two. (B) Day 8 *FasL* transcripts in CD8 T cells from wt and IFN- γ RKO hosts. Levels are expressed relative to *FasL* transcripts found in unmanipulated C3H.SW CD8 T cells (arbitrary level of 1). 3 mice per group from 3 independent experiments. Absolute cell numbers (C) and relative increase (D) in spleen cellularity on day 15 post-transplantation after injection of anti-FasL monoclonal antibody MFL4 (FasL neutralization +) or a control antibody (FasL neutralization -) (7-9 mice per group). (E) Percentage of donor cells in S/G2-M phases of the cell cycle on day 15 post-transplantation. Data represent the mean and SD of at least 3 mice per group from one representative experiment out of two. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001.

Figure 7. Decreased proliferation of hematopoietic stem/progenitor cells in IFN- γ RKO hosts. (A) Proportion of apoptotic elements among donor-derived Lin⁺ and LSK BM cells on day 15 post-transplantation. Three mice per group from one representative experiment out of two. (B) BM cellularity in recipients injected with anti-FasL MFL4 antibody (FasL neutralization +) or a control antibody (FasL neutralization -) (≥ 6 mice per group). (C) Representative Hoechst staining pattern of donor Lin⁺ and LSK cells in wt versus IFN- γ RKO hosts on day 15 post-transplantation. The Hoechst staining pattern of unmanipulated donor type (C3H.SW) cells is shown as a control. Percentages represent the proportion of cycling cells (phases S, G2-M). (D, E) Proportion of cycling Lin⁺, LSK, LSKF⁻ and LSKF⁺ cells on day 15 post-transplantation (3 mice per group, from one representative experiment out of two). (F) Levels of *Ccnd1* and *Myc* transcripts in donor-derived LSKF⁻ cells sorted from the BM of wt and IFN- γ RKO hosts on day 15. Levels are expressed relative to the amount of transcripts in BM LSKF⁻ cells from untreated C3H.SW mice (arbitrary level of 1), using HPRT as an endogenous control. Histograms represent the mean and SD for 3 mice per group from experimental triplicates. * and ** correspond to *P* values <0.05 and <0.01 , respectively.

Figure 1

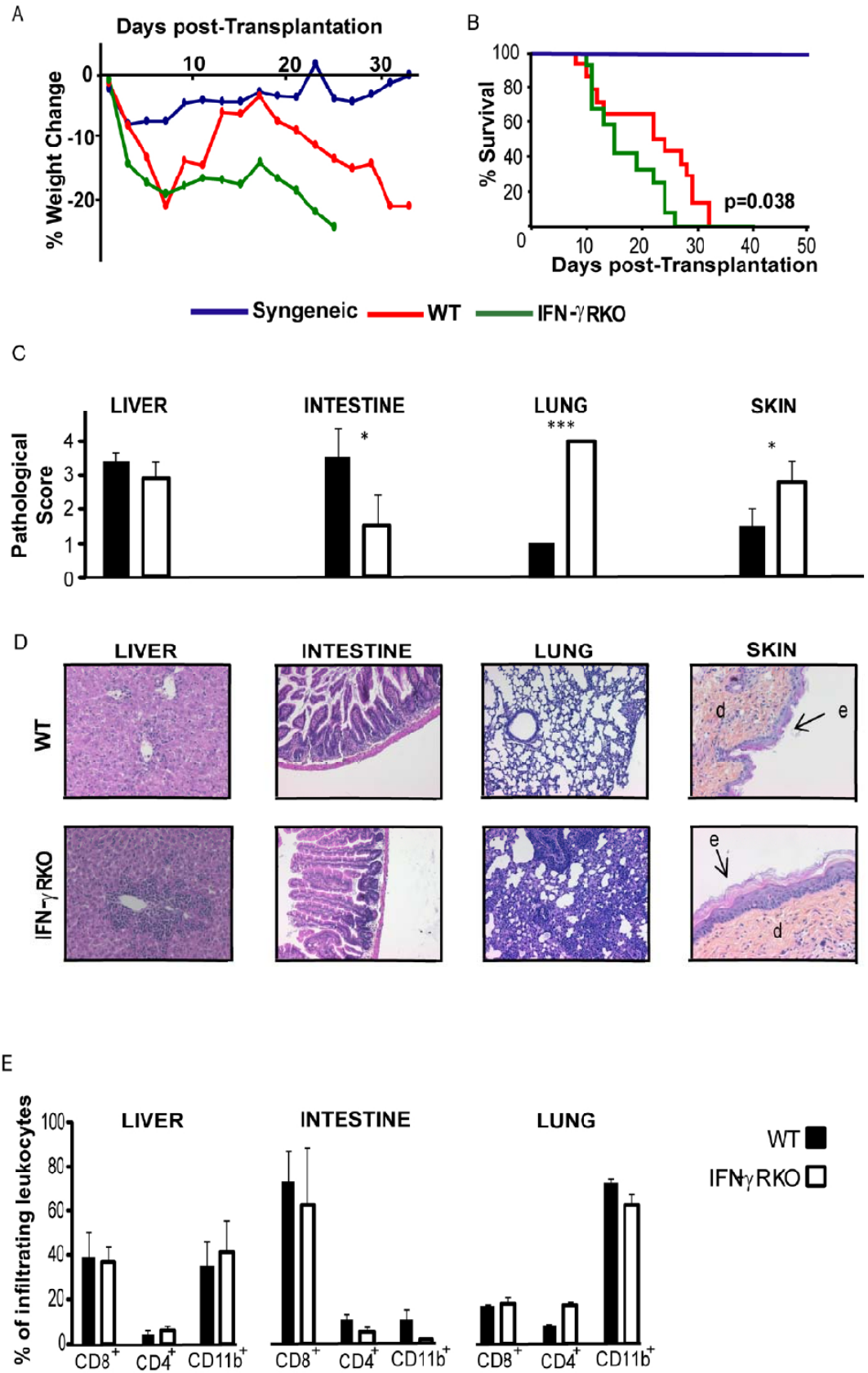


Figure 2

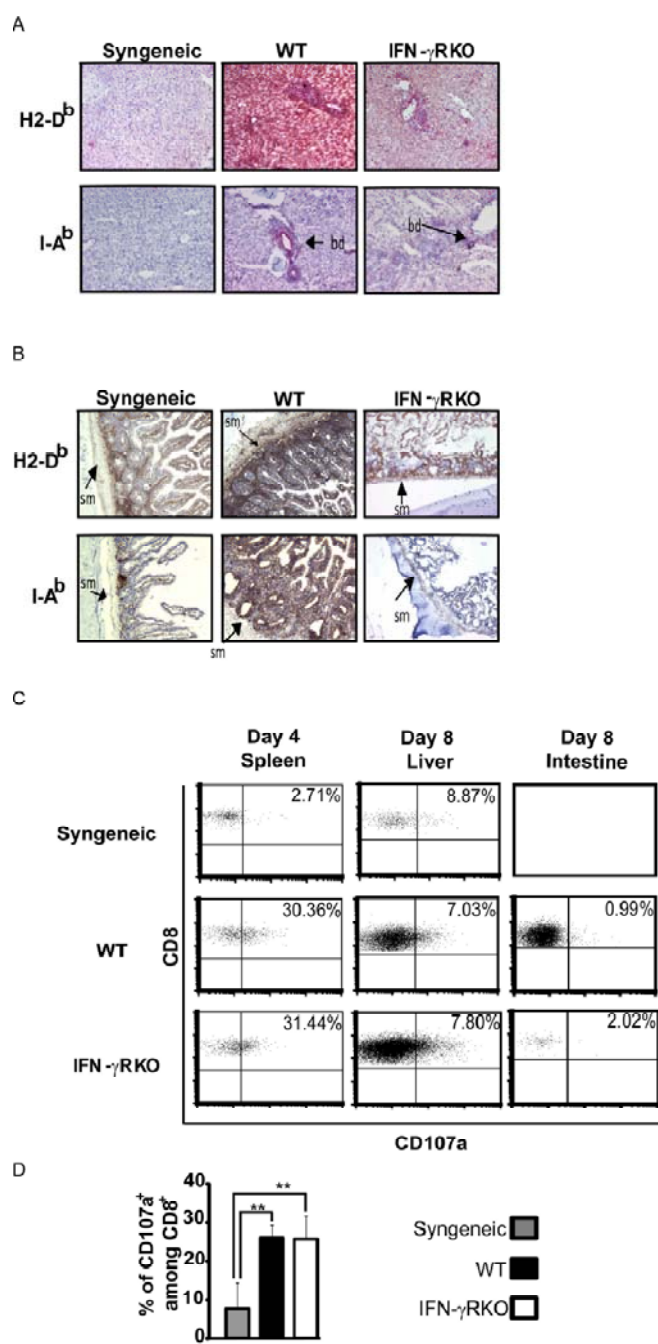


Figure 3

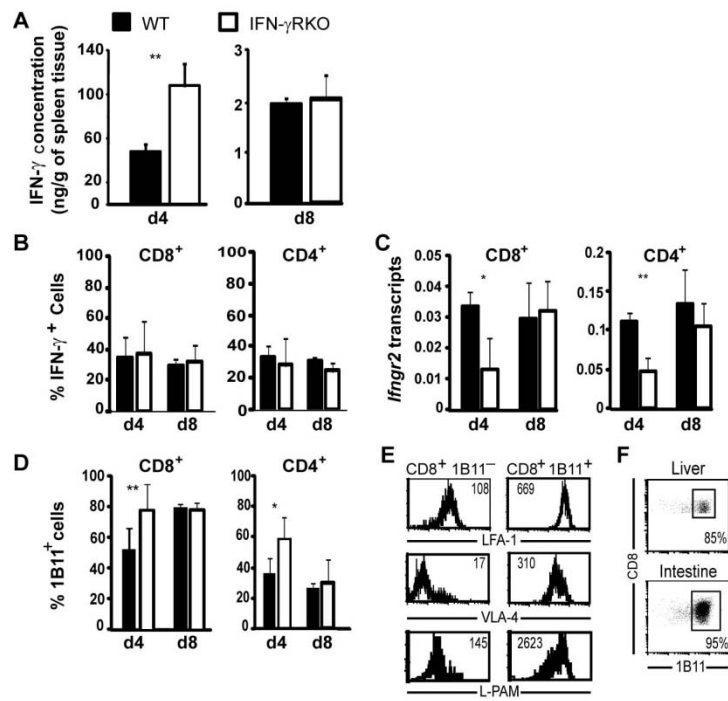


Figure 4

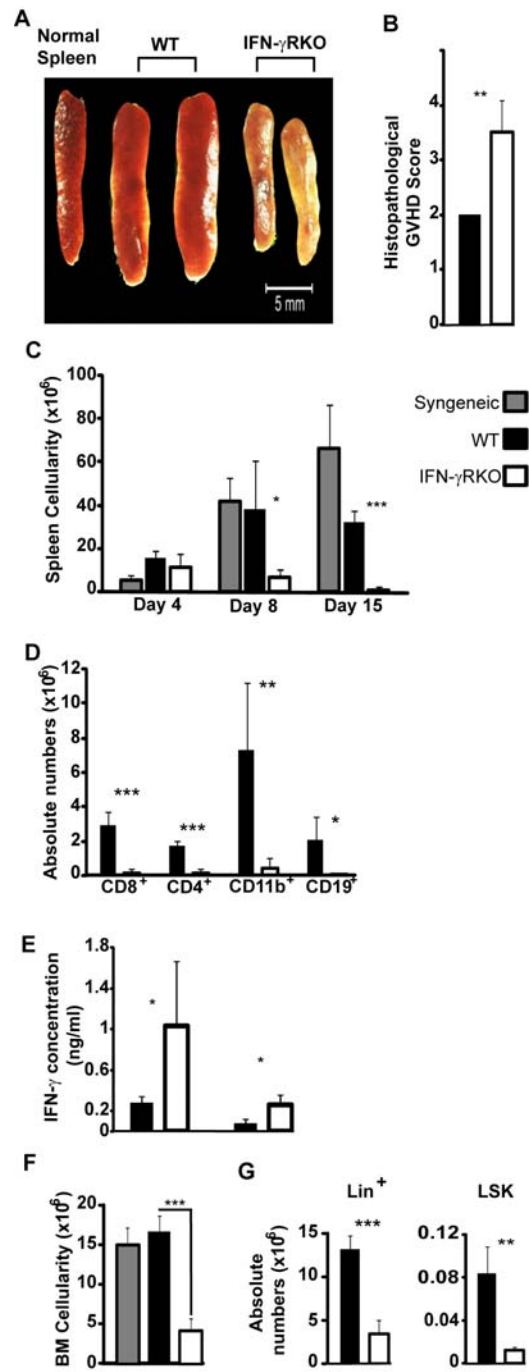


Figure 5

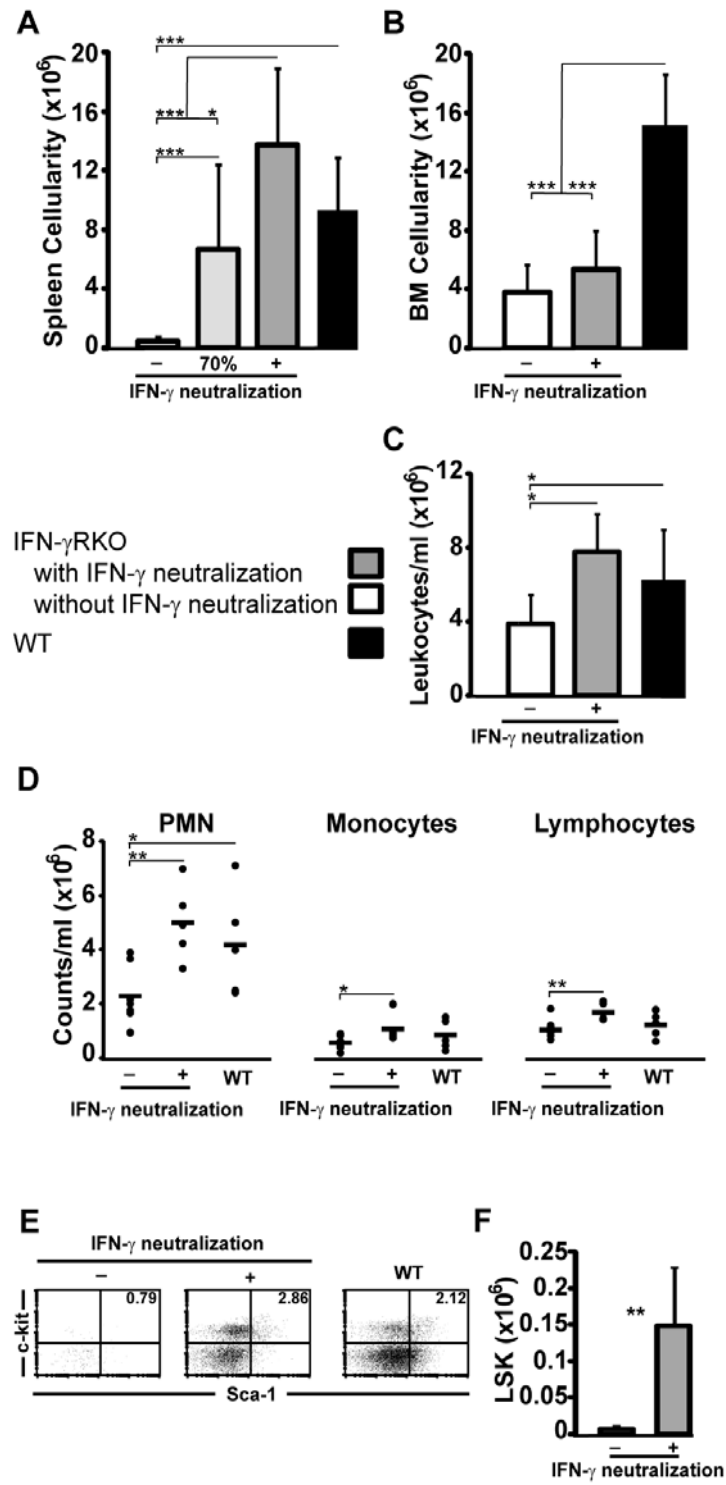


Figure 6

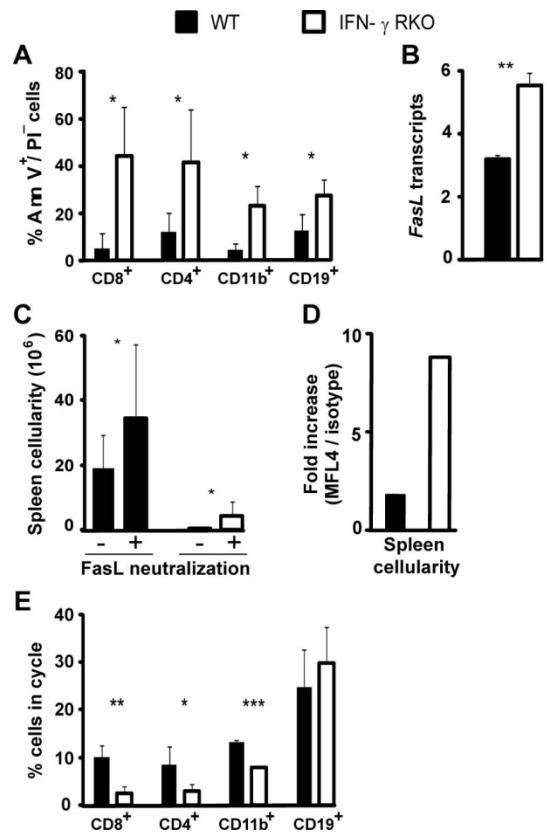
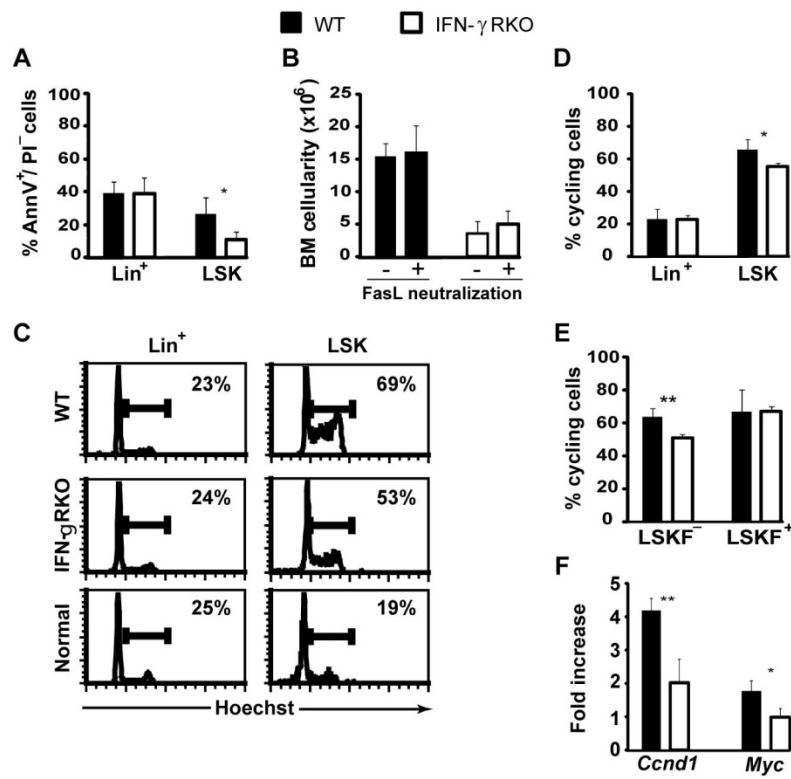


Figure 7



Supplemental Table 1

Supplementary Table 1. Histopathological Scoring

Organs	Features	Scale	Notes
Skin	Epidermis Thickening	Mild (0.5) Moderate (1) Significant (1.5)	1-2 layers most of the field (40X) 2-3 layers most of the field (40X) 3 layers or more most of the field
	Epidermal cell apoptosis	Rare (0.5) Occasional (1) Frequent (1.5)	At least 1 per 3 contiguous fields (40X) At least 1 per 40X field 2 or more per field (40X)
	Dermal infiltrate	(0.5)	
	Vascular congestion	(0.5)	
Liver	Portal triad infiltration	Mild (0.5) Moderate (1) Severe (1.5)	
	Sinusoidal infiltration	Rare-Patchy (0.5) Frequent-Diffuse (1)	
	Parenchymal damage (Hepatocyte or biliary duct apoptosis, sinusoidal dysarray)	Occasional (0.5) Diffuse (1) Widespread (1.5)	
Small Intestine	Villous blunting	Rare (0.5) Frequent (1)	
	Inflammatory infiltrate	Mild (0.5) Severe (1)	
	Crypt	Infiltration (0.5) Apoptosis (1)	
	Crypt cell hyperplasia	Mild (0.5) Severe (1)	
Lung	Perivascular inflammatory infiltrate	Mild (0.5) Moderate (1) Severe (1.5)	
	Peribronchiolar inflammatory infiltrate	Mild (0.5) Moderate (1) Severe (1.5)	
	Bronchial and alveolar obliteration/edema	Rare (0.5) Frequent (1)	
Spleen		Focal white pulp infiltrates (1)	Progressive scale
		More than 50% of white or red pulp infiltration (2)	
		Effacement of splenic architecture (3)	
		Fibrotic replacement (4)	

6.2- Article II:

Giroux M.*, **Delisle JS.***, Gauthier SD., Heinonen KM., Hinsinger J., Houde B., Gaboury L., Brochu S., Wu J., Hébert MJ., Perreault C.,

SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocyte-mediated tissue damage, *En cours de revision, Blood.*

*Contribution égale en tant que premiers auteurs.

SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocyte-mediated tissue damage

Running title: Donor SMAD3 deficiency causes lethal GVHD

Scientific category: Transplantation

Martin Giroux,^{1,2*} Jean-Sébastien Delisle,^{1,2,3*} Simon-David Gauthier,¹ Krista M. Heinonen,¹ Julie Hinsinger,¹ Billy Houde,¹ Louis Gaboury,¹ Sylvie Brochu,¹ Jiangping Wu,^{2,4} Marie-Josée Hébert,^{2,4} and Claude Perreault^{1,2,3}

* M. G. and J.S.D. contributed equally to this work.

Institute for Research in Immunology and Cancer¹ and Department of Medicine², Université de Montréal, Montreal, QC, Canada. Division of Hematology, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montreal³. Centre de Recherche du CHUM, Montreal⁴.

Word counts: 193 in the abstract, 4983 words of text.

7 Figures, 0 Table, 50 references

Address correspondence to: Jean-Sébastien Delisle or Claude Perreault

Abstract

Gene expression profiling of human donor T cells prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT) revealed that expression of selected genes correlated with the occurrence of graft versus-host disease (GVHD) in recipients. The gene with the best GVHD predictive accuracy was *SMAD3*, a core component of the TGF- β signaling pathway, whose expression levels vary over a 6-fold range in humans. The putative role of SMAD3 in establishment of graft-host tolerance remained elusive. We report that SMAD3-KO mice present ostensibly normal lymphoid and myeloid cell subsets. However, lack of SMAD3 dramatically increased the frequency and severity of GVHD following AHCT into MHC-identical recipients. Lethal GVHD induced by SMAD3-KO donors affected mainly the intestine and resulted from massive tissue infiltration by T-bet⁺ CD4 T cells and granulocytes that caused tissue damage by *in situ* release of Th1 cytokines and oxidative-nitrosative mediators, respectively. Our report reveals the non-redundant roles of SMAD3 in development of tolerance to the host, and the heretofore unrecognized contribution of granulocytes to GVHD immunopathology. Furthermore, our data support the concept that SMAD3 levels in donor cells dictate the risk of GVHD and that SMAD3 agonists would be attractive for prevention of GVHD.

Introduction

After decades of intensive research, graft versus-host disease (GVHD) remains the unrelenting nemesis of patients and physicians involved in allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT).¹⁻³ A better understanding of GVHD pathophysiology could lead to a more widespread use of AHCT, an otherwise potent treatment for hematologic malignancies and other less common diseases. GVHD is a complex immunopathology that hinges on recognition of host alloantigens by donor T cells.⁴⁻⁶ Importantly, although histoincompatibility between donor and recipient is necessary, it is not sufficient to elicit GVHD. Of particular relevance, some donors are more dangerous than others. Indeed, a comprehensive study of CD4 and CD8 T cells from 50 human donor-recipient pairs revealed that pre-AHCT gene expression profiling segregates donors whose recipient suffered from GVHD or not.⁷ The gene with the best GVHD predictive accuracy was *SMAD3*. No AHCT recipients suffered from GVHD when their donor cells expressed high levels of *SMAD3* transcripts.⁷ *SMAD3* mRNA levels are stable over time in a given individual but present substantial interindividual differences as they were found to vary over a 6-fold range in a cohort of 397 subjects.⁸

Proteins of the SMAD family are homologous to proteins encoded by the *C. elegans* gene *Sma* and the *Drosophila* gene *Mad*. SMAD3 is one of the two “receptor-SMADs” that transduce TGF- β signals. TGF- β binds to two ubiquitously expressed cell-surface receptors, TGF- β RI and TGF- β RII, both of which contain a serine/threonine protein kinase in their intracellular domains. Once bound to TGF- β , TGF- β RII recruits, binds, and transphosphorylates TGF- β RI, thereby stimulating its

protein kinase activity.⁹ In the canonical TGF- β pathway, the activated TGF- β RI then recruits and phosphorylates the receptor-SMADs, SMAD2 and SMAD3, which then bind to the common SMAD4 or to TIF1 γ , accumulate in the nucleus and regulate the transcription of TGF- β -responsive genes.¹⁰ Non canonical (SMAD-independent) TGF- β pathways include various branches of MAP kinase, Rho-like GTPase and phosphatidylinositol-3-kinase/AKT pathways¹¹.

Constitutive TGF- β signaling is vital for maintenance of self tolerance in animals with an adaptive immune system. Interruption of TGF- β signaling by TGF- β or TGF- β R gene inactivation in mice rapidly leads to fatal autoimmunity.^{12,13} Given the key role of SMAD3 in TGF- β signaling, it is logical to assume that differential expression of SMAD3 should regulate responsiveness to TGF- β . Evidence suggests that prompt response to TGF- β leads to immune tolerance whereas poor response leads to chronic inflammation accompanied by over-secretion of TGF- β .¹⁴ In this context, the notion that T cells from *SMAD3*^{hi} donors easily become tolerant to their host (do not induce GVHD) could have considerable clinical relevance. It would allow selection of “low risk donors” for AHCT and adjustment of the immunosuppressive regimens given to the recipient according to the predicted risk of GVHD. Furthermore, given the pervasive role of TGF- β signaling in autoimmune, neoplastic and infectious diseases, the major inter-individual differences in SMAD3 expression could also be of more general medical relevance.^{15,16}

However, although the importance of TGF- β signaling in self tolerance is well established, the mechanistic link(s) between SMAD3 and the development of

tolerance to the host following AHCT are not inherently obvious. Firstly, because TGF- β has a multitude of effects on all subsets of immune cells.¹⁶ Secondly, because TGF- β signals can be transduced in the absence of SMAD3: they can be relayed by the other receptor-SMAD (SMAD2) in the canonical pathway and by SMAD-independent pathways.¹¹ Finally, although SMAD3 has been implicated in the regulation of T-cell activation,^{17,18} SMAD3-KO mice show no overt disease or immune dysfunction when maintained in a *Helicobacter*-free environment.¹⁹ We studied the role of SMAD3 in a mouse model of AHCT in which BALB.B hosts are transplanted with hematopoietic cells from 129-strain donors. Similar to the most common situation in human AHCT, BALB.B and 129 mice are MHC-identical (H2^b) but present multiple minor histocompatibility antigen differences. We report that SMAD3 is dispensable for maintenance of self tolerance in mice maintained in a pathogen-free environment, but is necessary for development of tolerance to the host following AHCT. Thus, in a model where recipients of wild-type (WT) 129 cells presented almost no GVHD, mice receiving grafts from SMAD3-KO littermate donors developed a lethal intestinal GVHD. The protective role of SMAD3 depended on cell intrinsic effects in both lymphoid and myeloid donor cells. In particular, SMAD3 suppressed Th1 skewing of donor CD4 T cells and maintained colon integrity by preventing neutrophil granulocyte infiltration and degranulation *in situ*.

Methods

Mice

The following H2^b mice were purchased from the Jackson Laboratory and housed under specific pathogen-free conditions: C.B10-*H2^b*LiMcdJ (BALB.B), 129P3/J (WT) and 129-*Smad3^{tm1Par}*/J (SMAD3-KO). WT and SMAD3-KO donors were littermates obtained through breeding of heterozygous parents. All work involving mice was conducted under protocols approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur des Animaux from the Université de Montréal.

Flow Cytometry

Flow cytometry analyses were performed using antibodies from BD Biosciences or eBioscience, as previously reported.^{20,21}

T-cell proliferation and differentiation assays

Splenocytes were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD62L and anti-TCR β (BD Biosciences). Naive T-cells, sorted using a FACS Aria apparatus (BD Biosciences), were defined as TCR β ⁺, CD4⁺ or CD8⁺, CD62L⁺ and CD44^{lo}. TCR β ⁻CD8⁻CD4⁻ cells were also sorted, irradiated, and served as stimulators. In 96-well plates, 40,000 CFSE-labelled (Invitrogen) naive T-cells were mixed with 250,000 stimulators and the specified amount of anti-CD3 ϵ (eBioscience), anti-CD28 (eBioscience) and TGF- β . For Th differentiation assays, the same initial steps were performed but sorted cells were not CFSE-labelled. The following concentration of Ab and cytokines were used for Th1 skewing: IL-2 (5 ng/ml), IL-12 (10 ng/ml), anti-IL-4 (10 μ g/ml), anti-CD3 ϵ (3 μ g/ml), anti-CD28 (3 μ g/ml) and TGF- β at the

indicated doses; for TReg skewing: IL-2 (20 ng/ml), TGF- β (2.5 ng/ml), anti-CD3 ϵ (4 μ g/ml) and anti-CD28 (2 μ g/ml); for Th17 skewing: IL-6 (30 ng/ml), IL-23 (20 ng/ml), TGF- β (2.5 ng/ml), anti-CD3 ϵ (4 μ g/ml), anti-CD28 (2 μ g/ml), anti-IL-4 (10 μ g/ml) and anti-IFN- γ (10 μ g/ml). All cytokines were from Peprotec.

Methylcellulose assays and DHR detection

Mixed colony assays we performed in M3434 complete methylcellulose medium (Stem Cell Technologies) as recommended by the manufacturer. Oxidative cytotoxic potential of granulocytes was evaluated on freshly harvested whole BM. Cells were stained with an anti-Gr-1 Ab and then incubated in PBS with 1 μ M DHR (Invitrogen) and 1000 U/ml of catalase (Sigma-Aldrich) for 5 min at 37 °C. Cells were then washed and incubated with 250 ng/ml PMA for 15 minutes at 37 °C. After a final wash, Gr-1⁺ cells were analysed for DHR fluorescence by flow cytometry.

Transplantation procedure

Recipient BALB.B mice were lethally irradiated (850 rads) and transplantation of BM and spleen cells was performed as previously described.²¹ Mice weight and general condition was surveyed every 2 days. In experiments requiring T-cell depletion of BM cell suspension, anti-CD90 beads were used according to the manufacturer recommendations (EasySep).

Histology and immunohistochemistry

Tissues were fixed with 10% formalin and paraffin-embedded using standard methods. Bone samples were fixed in the same conditions and decalcified in nitric acid 5% with 1% urea for 3 days before paraffin embedding. Grading of colon GVHD was performed according to Asavaroengchai et al.²² Immunohistochemistry was performed according to manufacturer recommendations on an immunostainer (Discovery XT system, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Anti-CD3 ϵ (1/50, AbD Serotec), anti-Gr-1 (1/50, AbD Serotec), anti-F4/80 (1/50, AbD Serotec) or anti-nitro-tyrosine (1/50, Abcam) antibodies were applied on 5 μ m tissue sections. Sections were then incubated with a specific secondary biotinylated antibody. Streptavidin horseradish peroxidase, and 3,3-diaminobenzidine were used according to the manufacturer's instructions (Ventana Medical Systems) and sections were counterstained with hematoxylin.

For the quantitative assessment of granulocyte infiltration and nitro-tyrosine⁺ cells, stained sections were scanned using the Hamamatsu Photonics's NanoZoomer® Digital Pathology system and virtual slides were imported in Visiopharm Integrator System (3.4.1.0) MicroImager™ (Visiopharm). An automated sampling using a meander X/Y stepping method with a 10X magnification was performed on every scan in order to generate whole organ sections. Quantitative analysis using a Bayesian classification method was then applied on all the samples to calculate the number of positive cells and the total number of cells per image. A batch processing mode was assessed on all X10 segmented images. Results were then exported in an Excel (Microsoft Corporation) sheet report. To overlay the different stainings done on consecutive sections, we used Adobe Photoshop CS3 software to photomerge

individual sections into a whole organ image, and consecutive images were overlaid and aligned to allow colocalization analyses.

Cytokine measurements

T helper cytokine signatures were assessed using the Cytokine Bead Array (BD Biosciences) and analyzed with the FCAP Array software (Soft Flow Inc.). Raw cytokine levels were normalized to the weight of the tissue of origin and are expressed as pg/g of tissue. Levels of TGF- β , IL-10 and markers of inflammation (TNFR1, TNFR2 and L-Selectin) were evaluated using a custom made cytokine detection array (Raybiotec) according to the manufacturer's instructions.

Statistics

Survival curves were analyzed with the log rank test using GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software). Other data were analyzed with the Student's *t* test, with significance determined at $P < 0.05$.

Results

SMAD3-KO mice have normal hematopoietic and immune compartments

Relative to *Smad3*^{+/+} (WT) littermates, SMAD3-KO 129-strain mice maintained in our specific pathogen-free facility have a slightly smaller size but have a normal lifespan and show no overt signs of inflammation or autoimmunity, as previously reported.¹⁹ WT and SMAD3-KO littermates presented no differences in spleen or bone marrow (BM) cellularity (Supplemental Figure 1). The numbers of CD4 and CD8 T-cells, NK cells, $\gamma\delta$ T cells and B cells were similar in spleen and mesenteric lymph nodes of WT and SMAD3-KO mice. Also, the proportions of naive and memory CD4 and CD8 T cells (defined by staining with Abs to CD44 and CD62L) as well as mature monocytes and granulocytes were not affected by the lack of SMAD3. We conclude that under steady state conditions, SMAD3 deficiency has no conspicuous effect on myeloid and lymphoid cell subsets.

SMAD3 regulates proliferation and T-bet expression in CD4 T cells

GVHD is initiated by donor T cells^{5,23} and TGF- β regulates T-cell activation.¹⁶ Therefore, we first sought to evaluate the impact of SMAD3 on naive (CD44^{lo}CD62L^{hi}) T-cell subsets activated under standardized *in vitro* conditions. We focused on naive T cells because they are much more potent inducers of GVHD than memory T cells.⁵ By analyzing FACS-sorted cells from WT and SMAD3-KO mice, we were in a position to evaluate whether SMAD3 had cell intrinsic effects on CD4 and CD8 T cell subsets. We first assessed proliferation of FACS-sorted and CFSE-labeled CD4 or CD8 T cells stimulated with anti-CD3 ϵ and anti-CD28 Abs in the absence or presence of TGF- β . Using the method of Gudmundsdottir *et al.*²⁴, we

estimated the fraction of cells that actually responded to the proliferative stimulus, the number of daughter cell generated per responding cell (the burst size) and their doubling time. SMAD3 had no effect on proliferation of CD8 T cells (Supplemental Figure 2A-B). However, as expected²⁵, SMAD3 decreased proliferation of activated CD4 T cells, but only in the presence of TGF- β (Figure 1A-B). TGF- β decreased the fraction of responding cells as well as their burst size and increased their doubling time. However, the sole effect of TGF- β that was SMAD3-dependent was the decrease in the proportion of responding CD4 T cells (Figure 1B). Similar findings were obtained using a lower dose of soluble anti-CD3 ϵ (Supplemental Figure 2C). The above data indicate that, in the presence of TGF- β , SMAD3 is instrumental in limiting the fraction of responding naive CD4 T cells, but does not have any non-redundant effect on the proliferation kinetics of responding cells.

We next asked whether SMAD3 influenced CD4 T-cell differentiation. We sorted naive CD4 T cells from WT and SMAD3-KO mice and cultured them under Th1 skewing conditions. In the absence of TGF- β , lack of SMAD3 did not influence T-bet expression (Figure 1C). Addition of TGF- β to the Th1 culture mix abrogated T-bet upregulation in a dose- and SMAD3-dependent manner, and induced the expression of FOXP3 (Figure 1D-F). This effect was more important in WT than SMAD3-KO cells (Figure 1D-F). Furthermore, when naïve CD4 T cells were cultured under Treg skewing conditions, the proportion of FOXP3⁺ elements was greater for WT than SMAD3-KO cells (Figure 1G). However, SMAD3 was dispensable for the expression of ROR γ t in Th17 skewing conditions (Figure 1G). Collectively, these data show that under standardized culture conditions, SMAD3 had a cell autonomous influence in

relaying TGF- β signals to Th1 and Treg master transcription factors. More specifically, SMAD3 repressed the expression of T-bet and favored that of FOXP3. These initial observations suggest that SMAD3 deficiency can bias CD4 T-cell differentiation toward a pro-GVHD state since Th1 skewing is a cardinal feature of acute GVHD whereas Treg cells suppress GVHD.^{26,27}

SMAD3 limits polymorphonuclear neutrophil production and function in vitro

The BM of WT and SMAD3-KO mice contained similar numbers and proportion of myeloid progenitors (Figure 2A and Supplemental Figure 1). However after culture for 10 days in methylcellulose-based medium, BM cells from SMAD3-KO mice yielded slightly more granulocytes and monocytes than WT cells (Figure 2B-C). Addition of TGF- β to the cultures repressed by a factor of three to four the generation of granulocytes and monocytes by WT hematopoietic progenitors, but had no effect on SMAD3-KO progenitors (Figure 2B-C). Thus, in the presence of TGF- β , SMAD3-KO progenitors yielded about 5 times more monocytes and neutrophil granulocytes than WT progenitors. These data show that SMAD3 regulates granulocyte expansion and is instrumental in TGF- β -dependent inhibition of myeloid cell colony growth. To determine whether SMAD3 might impinge on the function of myeloid cells, BM cells were stimulated with PMA and stained with dihydrorhodamine 123 (DHR). Dihydrorhodamine oxidation to rhodamine by ROS is a reliable marker of the neutrophil respiratory burst.²⁸ We found that SMAD3-KO Gr-1⁺ cells produced more ROS than WT cells (Figure 2D). In summary, lack of SMAD3 increases the generation of monocytes and neutrophils and the production of ROS by neutrophils.

SMAD3-KO hematopoietic grafts cause lethal GVHD in an otherwise tolerant model of AHCT

In order to measure the impact of SMAD3 deficiency on GVHD, we initially injected 10^7 BM cells along with 5×10^6 splenocytes from WT or SMAD3-KO littermate 129-strain donors into lethally irradiated BALB.B recipients. Whereas 40 % of recipients of WT cells were alive on day 150, all recipients of SMAD3-KO cells were dead by day 30 post-transplantation (Figure 3A). The difference between WT and SMAD3-KO cells was even more dramatic when the grafted inoculums contained only 5×10^5 splenocytes along with the BM cells. While WT grafts failed to induce clinically discernible GVHD, SMAD3-KO cells led to lethal GVHD in all recipients (Figure 3B). In all cases, death was attributable to wasting (Figure 3C) associated with diarrhea. These results unequivocally show that SMAD3 has a critical influence on the rate of GVHD. In further experiments we used grafts containing 5×10^5 splenocytes, mainly for two reasons: i) the kinetics of GVHD development in this model better reflected human GVHD and, ii) we deemed the dichotomous outcome (presence or absence of GVHD) to be more suitable to uncover the non-redundant effects of SMAD3 on GVHD.

Histological analyses were performed on day 40, when 75% of recipients of SMAD3-KO grafts were still alive but presented significant weight loss relative to other groups (Figure 3C). We found no lesions in the skin and lungs, and only mild changes in the liver (portal infiltrates) and spleen (disrupted architecture) (Supplemental Figure 3). However, a severe colitis was present in recipients of SMAD3-KO grafts, with inflammation involving the mucosa, submucosa, the wall

and even the pericolonic fat (Figure 3D-E). Hence, in recipients of SMAD3-KO grafts, GVHD affected mainly the colon. Recipients of WT grafts displayed mild histologic signs of colitis that did not cause diarrhea, weight loss, and did not impinge on survival (3B-E). The pattern of organ involvement did not change at later time points (Supplemental Figure 3B). To better evaluate the inflammatory state of the colon, we collected colon extracts from recipients at day 40 and assessed the levels of pro-inflammatory markers and immunosuppressive cytokines. In recipients of SMAD3-KO cells, the colon contained high quantities of TNFR1, TNFR2 and L-selectin compared to recipients of WT grafts, further supporting the presence of an ongoing inflammatory process in the colon (Figure 3F). However, immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF- β were found in similar amounts in the two groups of AHCT recipients.

SMAD3 deficiency in both lymphoid and myeloid donor cells contributes to lethal GVHD

To elucidate the mechanisms of colon GVHD induced by SMAD3-KO donor cells, we first characterized colonic leukocyte infiltrates. Tissue slides prepared from colons at day 40 post-transplantation were stained for CD3 ϵ , F4/80 and Gr-1 in order to identify T-cells, macrophages and granulocytes, respectively. All three cell types were more abundant in recipients of SMAD3-KO than WT grafts (Figure 4A). Further characterization of the T-cell infiltrates using flow cytometry after enzymatic digestion of the large intestine revealed that they consisted essentially of CD4 T cells. We found no differences in numbers of CD8 T cells, which were nearly absent, in the colon of recipients of WT or SMAD3-KO grafts. However, we observed a 12-fold

increase in the number of colon CD4 T cells in recipients of SMAD3-KO vs. WT grafts (Figure 4B-C). Monocytic (CD11b⁺/Gr-1⁻) and granulocytic (CD11b⁺/Gr-1⁺) myeloid cells were more abundant in the colon of recipients of SMAD3-KO grafts. The relative difference in granulocyte numbers between WT and SMAD3-KO transplant recipients was almost 8-fold, whereas it was only 2-fold for monocytic infiltrating cells (Figure 4B-D). Taken together, these results demonstrate that the severe colon GVHD observed in recipients of SMAD3-KO grafts is associated with abundant leukocyte infiltrates containing mainly CD4 T cells and granulocytes.

In humans, the presence of neutrophils in gastrointestinal tract cellular infiltrates correlates with severe GVHD.²⁹ However, we ignore whether neutrophil infiltrates simply correlate with or contribute to severe intestinal GVHD. To address this question we carried out another set of transplantations using mixed WT and SMAD3-KO grafts. Splenocytes from either WT or SMAD3-KO mice were admixed to T-cell depleted BM from WT or SMAD3-KO donors. As expected, almost all mice transplanted with WT BM and splenocytes survived while recipients of SMAD3-KO BM and splenocytes suffered lethal GVHD (Figure 4E). The notable finding is that mice that received mixed grafts (in which only the BM or the spleen cells were from SMAD3-KO donors) had an intermediate outcome with around 50% of hosts living beyond day 125 post-transplantation. These results demonstrate that some cells present in T-cell depleted BM (non-T cells) contributed to GVHD. Lack of SMAD3 in either T-cell replete splenocytes or T-cell depleted BM cells of 129-strain donors was sufficient to induce GVHD of intermediate severity in allogeneic BALB.B hosts.

However, absence of SMAD3 in both T and non-T cells was necessary to elicit the most severe form of GVHD.

T-cell activation and Th1 bias in recipients of SMAD3-KO grafts

Our *in vitro* studies suggested that SMAD3-KO CD4 T cells were intrinsically biased toward generation of Th1 responses (Figure 1D-E). We therefore asked whether a Th1 bias would emerge in our GVHD model. Using a Th1/Th2/Th17 Cytokine Bead Array, we measured 7 cytokines in supernatants of colon extracts harvested on day 40 post-AHCT. No significant differences were found between recipients of WT or SMAD3-KO grafts regarding the levels of IL-2, IL17A and IL-10 (Figure 5A). However the colon of recipients of SMAD3-KO grafts contained more IFN- γ (2.7-fold), less IL-4 (1.6-fold) and more TNF α (5.8-fold). They also contained more IL-6 (4.8-fold), though the difference failed to reach statistical significance ($P = 0.06$) (Figure 5A). This cytokine signature, and in particular the presence of a higher concentrations of the Th1 cytokines IFN- γ and TNF α , correlated with an increased number of T-bet⁺ CD4 T cells in the colon of recipients grafted with SMAD3-KO cells (Figure 5B-C). Also, CD43i, an isoform of CD43 that is specifically expressed on effector T cells,^{30,31} was present on a large proportion of SMAD3-KO CD4 T cells in colonic infiltrates on day 40 (Figure 5D). Th1 skewing in the colon was an early event. Indeed, accumulation of T-bet⁺ CD4 T cells was detectable as early as day 20 post-transplantation (Figure 5E-F), before most hosts developed signs of disease. Notably, in contrast to what our *in vitro* assays suggested, (Figure 1E-F), the increase in T-bet expression in SMAD3-KO cells was not associated with a decreased proportion of FOXP3⁺ CD4 T cells (Figure 5G). Together, these results show that colon GVHD in recipients of SMAD3-KO grafts was initiated as early as day 20 post-transplantation and correlated with *in situ* accumulation of Th1-biased CD4 T cells.

We next sought to determine whether accumulation, activation and Th1 skewing of SMAD3-KO CD4 T cells in the colon resulted from a localized or systemic process. On day 40, we detected in the spleen and lymph nodes a higher proportion of activated (CD43i⁺) CD4 T cells when donors were SMAD3-KO than WT (Supplemental Figure 4A). However, this was not accompanied by an increased frequency of T-bet⁺ CD4 T cells nor by increased levels of IFN- γ (Supplemental Figure 4B-C). We conclude that the Th1 response of SMAD3-KO CD4 T cells infiltrating the colon is a local phenomenon that would have been missed by studies limited to lymphoid organs.

SMAD3 deficiency leads to enhanced myelopoiesis and systemic accumulation of granulocytes that undergo granule exocytosis in the colon

Three findings prompted us to evaluate the role of SMAD3-KO myeloid cells in GVHD: i) the cell intrinsic effect of SMAD3 on granulocyte production and function (Figure 2), ii) the dependence of GVHD on donor cells that were not mature T cells (T-cell depleted SMAD3-KO BM) (Figure 4E), and iii) the conspicuous infiltration of the colon by SMAD3-KO granulocytes during GVHD (Figure 4A-D). On day 40 post-AHCT, the BM of mice grafted with SMAD3-KO cells was more cellular than that of WT graft recipients (Figure 6A). Higher magnification revealed accumulation of myeloid cells, and particularly mature neutrophils. Accumulation of neutrophils was also conspicuous in the spleen and the mesenteric lymph nodes of SMAD3-KO graft recipients (Figure 6B-C). Granulocytic infiltration in secondary lymphoid organs was also discernible on day 20 post-transplantation, before it became

conspicuous in the colon (Figure 6D-E). This suggests that granulocytic infiltration is a widespread early event rather than a consequence of severe colon inflammation.

Is infiltration of the colon by SMAD3-KO granulocytes an innocent bystander or a causative mechanism in GVHD-induced tissue damage? On one hand accumulation of granulocytes in recipients of SMAD3-KO grafts was widespread and not limited to the colon. On the other hand, Th1 differentiation of CD4 T cells was localized to the colon (Figure 5) and the prototypical Th1 cytokine, IFN- γ , promotes neutrophil production of ROS that results in tissue damage³² Granule exocytosis increases cell surface expression of CD11b.³³ Therefore, the more intense CD11b staining on SMAD3-KO relative to WT granulocytes in the colon of AHCT recipients, argued in favor of *in situ* degranulation (Figure 7A-B). Granulocytes release NO and nitro-tyrosine, an end-product of the NO-mediated cascade, can serve as a marker of oxidative damage.³⁴ Nitro-tyrosine staining of colon tissue sections revealed more numerous nitro-tyrosine-positive cells in recipients of SMAD3-KO vs. WT grafts (Figure 7C-D). In order to evaluate more precisely the relationship between infiltrating granulocytes and nitro-tyrosine positive events, we performed stereological analyses of digital tissue sections using the Visiopharm Integrator System Microimager™. Consecutive tissue sections were stained for Gr-1 and nitro-tyrosine (Figure 7C-D), and co-localization was assessed using the Visiopharm and Photoshop softwares. Remarkably, most nitro-tyrosine positive cells were in the close vicinity of Gr-1⁺ cells (≤ 30 pixels) in recipients of SMAD3-KO but not WT grafts (Figure 7E). Collectively, these data strongly suggest that, in recipients of SMAD3-

KO grafts, tissue damage is caused at least in part by neutrophil-mediated oxidative and nitrosative stress.

Discussion

Continuous TGF- β signals transduced mainly by receptor SMADs (SMAD2 and SMAD3) are essential for maintenance of self-tolerance.^{16,35} We confirmed that SMAD3-KO mice do not present spontaneous inflammation or immunopathology, at least when housed in a specific pathogen-free environment.¹⁹ This suggests that under steady-state, SMAD3 is dispensable. However, we found that when used as AHCT donors, SMAD3-KO mice elicit much more severe GVHD than WT donors. Thus, under conditions of immune stress, SMAD3 is necessary (and therefore SMAD2 is not sufficient) for development of tolerance to host. This observation is consistent with evidence that SMAD2 and SMAD3 have non-redundant effects and are regulated differently.³⁶ For instance, insulin-like growth factor-I downregulates TGF- β signaling by suppressing phosphorylation of SMAD3 but not SMAD2. Furthermore, evidence suggests that SMAD3 has a predominant role in regulation of T-cell activation versus tolerance.^{17,18} Accordingly, we have recently shown (MG *et al.*, unpublished observation) that upon TCR stimulation, SMAD3 (but not SMAD2) phosphorylation rapidly decreases, suggesting that SMAD3 inhibition is functionally related to the earliest steps of T-cell activation.

SMAD3-KO mice did not exhibit the severe phenotype associated with absence of TGF- β or TGF- β RII since lack of SMAD3 in donor cells did not perturb all processes regulated by TGF- β in immune cells. Thus, although TGF- β regulates activation and differentiation of all T-cell subsets,¹⁶ lack of SMAD3 impinged on CD4 but not CD8 T cells. This finding is coherent with the constitutive phosphorylation (activation) of SMAD3 in CD4 but not CD8 T cells.³⁵ We found no difference in IL-17 levels in the

colon of mice that received SMAD3-KO or WT allogeneic cells. This suggests that Th17 cells are not responsible for the severity of GVHD induced by SMAD3-KO cells. Also, the proportion of colon infiltrating CD4 T cells that expressed FOXP3 was similar in recipients of SMAD3-KO and WT grafts, showing that SMAD3 deficiency does not hinder induction or recruitment of FOXP3⁺ cells. However, we cannot rule out the existence of functional differences in FOXP3⁺ cells from WT vs. SMAD3-KO donors. A key conclusion is that GVHD immunopathology in recipients of SMAD3-KO grafts was orchestrated by both CD4 Th1 cells and myeloid effectors, mostly granulocytes. Our *in vitro* studies revealed that SMAD3 had cell autonomous effects on CD4 T cells and myeloid cells, especially granulocytes. Nonetheless, Th1 CD4 responses and granulocyte-induced tissue damage may synergize *in vivo*: Th1 cytokines promote neutrophil infiltration and degranulation, and neutrophils induce T-cell extravasation and activation in inflamed sites.³⁷

Substantial evidence suggests that Th1, Th2 and Th17 CD4 T cells preferentially affect different tissues and organs in GVHD, and that intestinal damage is mediated primarily by Th1 cells.^{38,39} Indeed, the two prototypical Th1 cytokines, IFN- γ and TNF- α , directly perturb epithelial homeostasis during intestinal mucosal inflammation, by modulating β -catenin signaling.⁴⁰ Of direct relevance to our report, two different murine GVHD models have shown that IFN- γ -receptor deficient recipients are protected from intestinal disease.^{21,41} Furthermore, since IFN- γ interferes with TGF- β signaling, its production by Th1 cells infiltrating the colon may further hinder TGF- β signaling in SMAD3-deficient cells. Hence, the Th1 bias of SMAD3-KO CD4 cells may explain why SMAD3-KO grafts induced mainly

intestinal GVHD. In a more general perspective, our data dovetail well with the notion that the TGF- β pathway is ancestrally related to the regulation of mucosal immunity in the gut and that several models of autoimmune colitis hinge on TGF- β signaling and Th1 skewing.⁴²

GVHD is seen primarily as a T-cell mediated immunopathology in which neutrophils have rarely been considered as important effectors, even though their presence correlates with severity of gastro-intestinal GVHD in humans.²⁹ Evidence reported herein that SMAD3-KO granulocytes had a prominent role in mediating tissue damage in the intestines is therefore of particular interest. We found that SMAD3 deficiency led to massive infiltration of the colon by granulocytes that caused tissue damage following *in situ* degranulation. Moreover, AHCT with mixed graft revealed that SMAD3 deficiency in donor myeloid cells contributed to GVHD lethality. In our model, GVHD was initiated by CD4 Th1 cells. CD4-mediated GVHD is not dependent on cognate interactions between CD4 T cells and host epithelial cells.^{43,44} CD4-mediated GVHD is therefore presumed to depend on cytokines and perhaps on innate immune cells whose nature and precise interplay remained ill-defined.^{1,2,5} Our data suggest that, in concert with Th1 cells, granulocytes may play an important role in GVHD immunopathology. This concept is consistent with growing evidence that in jawed vertebrates, granulocytes have acquired molecules that allow interactions with T cells (reviewed in ³⁷). For instance, neutrophils attract and activate T cells by secreting chemokines and IL-12. In turn, Th1 cytokines enhance the antigen-presenting and effector functions of neutrophils via several mechanisms including upregulation of MHC II molecules, acquisition of dendritic cell features, and release

of oxidative/nitrosative mediators. Relatedly, a recent study in RAG-deficient mice showed that together with monocytes, neutrophils could mount a T-cell-independent response to allogeneic nonself.⁴⁵ In accordance with the current surge of interest in interactions between granulocytes and other innate and adaptive immune cells,⁴⁶ we therefore propose that the role of granulocytes in GVHD should be the subject of future experimental studies. Notably, studies investigating the role of neutrophils in immunity would benefit greatly from the generation of mouse mutants allowing neutrophil-specific conditional gene deletion.

In conclusion, several points can be made from the data presented herein. First, they support the concept that interindividual differences in SMAD3 expression are clinically significant and more specifically that SMAD3 levels in donor cells regulate the risk of GVHD.^{7,8} Second, they show that in situations of intense immune stress (AHCT), SMAD3 has a non-redundant role in the functional regulation of Th1 cells and granulocytes. Third, they provide strong evidence that granulocytes can play a pivotal role in GVHD immunopathology. Finally, our work suggests that SMAD3 agonists could be very effective in prevention of GVHD, and in particular intestinal GVHD, the most dreadful form of the disease in humans.^{47,48} We speculate that one attractive strategy for GVHD prophylaxis might hinge on modulation of the commensal gut microbiota of AHCT recipients through oral administration of probiotics. Indeed, administration of probiotics such as *Bifidobacterium breve* upregulates SMAD3 expression in humans, and upregulation of SMAD3 in the gut was found to have a protective effect in other models of enteritis.^{49,50} Oral

formulations of probiotics are relatively innocuous and might therefore hamper intestinal GVHD without causing systemic immunosuppression.

Acknowledgments

The study was supported by grants from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Groupe de recherche transdisciplinaire sur l'étude des prédicteurs du rejet), The Katelyn Bedard Bone Marrow Association and the Leukemia & Lymphoma Society of Canada. M.G. is supported by the Cole Foundation and J.S.D. holds a Clinician-Scientist award (phase 1) from the Canadian Institutes for Health Research. C.P. holds a Canada Research Chair in Immunobiology. M.J.H. is the holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration of the Université de Montréal. The Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canada Foundation for Innovation, and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We acknowledge IRIC's animal care facility and histology core facility personnel as well as Danièle Gagné (cell sorting) for their assistance.

Authorship Contributions

M.G. and J.S.D. designed the research, performed experiments, analyzed results and wrote the manuscript; S.D.G., K.M.H., J.H., B.H., and L.G. performed experiments, analyzed results and reviewed the manuscript. S.B., J.W. and M.J.H. analyzed results and reviewed the manuscript. C.P. designed the research, analyzed the results and wrote the manuscript

Conflict of Interest disclosure

None

References

1. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-1561.
2. Socie G, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease; from the bench to the bedside. *Blood* 2009;114:4327-4336.
3. Jenq RR, van den Brink MR. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev.Cancer* 2010;10:213-221.
4. Negrin RS, Contag CH. In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft-versus-host disease. *Nat Rev.Immunol.* 2006;6:484-490.
5. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat.Rev.Immunol.* 2007;7:340-352.
6. Sykes M, Woods K, Sachs DH. Transplantation Immunology. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:1426-1488.
7. Baron C, Somogyi R, Greller LD et al. Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene expression profiling. *PLoS Med.* 2007;4:e23.
8. Busque L, Belisle C, Provost S, Giroux M, Perreault C. Differential expression of *SMAD3* transcripts is not regulated by *cis*-acting genetic elements but has a gender specificity. *Genes Immun.* 2009;10:192-196.

9. Taylor IW, Wrana JL. SnapShot: The TGFb pathway interactome. *Cell* 2008;133:378.
10. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-b signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
11. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-b family signalling. *Nature* 2003;425:577-584.
12. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-b regulation of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 2006;24:99-146.
13. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-b receptor. *Immunity.* 2006;25:441-454.
14. Banovic T, MacDonald KP, Morris ES et al. TGFb in allogeneic stem cell transplantation: Friend or foe? *Blood* 2005;106:2206-2214.
15. Massagué J. TGFb in cancer. *Cell* 2008;134:215-230.
16. Li MO, Flavell RA. TGF-b: a master of all T cell trades. *Cell* 2008;134:392-404.
17. McKarns SC, Schwartz RH, Kaminski NE. Smad3 is essential for TGF-b 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J.Immunol.* 2004;172:4275-4284.

18. Li L, Iwamoto Y, Berezovskaya A, Boussiotis VA. A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27^{Kip1} and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance. *Nat.Immunol.* 2006;7:1157-1165.
19. Maggio-Price L, Treuting P, Zeng W et al. Helicobacter infection is required for inflammation and colon cancer in SMAD3-deficient mice. *Cancer Res.* 2006;66:828-838.
20. Giroux M, Yurchenko E, St-Pierre J, Piccirillo CA, Perreault C. T regulatory cells control numbers of NK cells and immature dendritic CD8a⁺ cells in the lymph node paracortex. *J.Immunol.* 2007;179:4492-4502.
21. Delisle JS, Gaboury L, Bélanger MP et al. GVHD causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in IFN- α receptor-deficient hosts. *Blood* 2008;112:2111-2119.
22. Asavaroengchai W, Wang H, Wang S et al. An essential role for IFN-g in regulation of alloreactive CD8 T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2007;13:46-55.
23. Brochu S, Baron C, Hetu F, Roy DC, Perreault C. Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras. *J.Immunol.* 1995;155:5104-5114.
24. Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion *in vivo* at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J.Immunol.* 1999;162:5212-5223.

25. McKarns SC, Schwartz RH. Distinct effects of TGF- β 1 on CD4⁺ and CD8⁺ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3. *J.Immunol.* 2005;174:2071-2083.
26. Fowler DH, Gress RE. Graft-vs.-host disease as a Th1-type process: regulation by Th2-type cells. In: Ferrara JLM, Cooke KR, Deeg HJ, eds. *Graft-vs.-host disease*. New York: Marcel Dekker; 2005:59-82.
27. Trenado A, Charlotte F, Fisson S et al. Recipient-type specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J.Clin.Invest.* 2003;112:1688-1696.
28. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J.Immunol.Methods* 1998;219:187-193.
29. Socie G, Mary JY, Lemann M et al. Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and Fas expression. *Blood* 2004;103:50-57.
30. Harrington LE, Galvan M, Baum LG, Altman JD, Ahmed R. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J.Exp.Med.* 2000;191:1241-1246.

31. Baron C, Meunier MC, Caron E et al. Asynchronous differentiation of CD8 T cells that recognize dominant and cryptic antigens. *J.Immunol.* 2006;177:8466-8475.
32. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-g: an overview of signals, mechanisms and functions. *J.Leukoc.Biol.* 2004;75:163-189.
33. Soehnlein O, Oehmcke S, Ma X et al. Neutrophil degranulation mediates severe lung damage triggered by streptococcal M1 protein. *Eur.Respir.J.* 2008;32:405-412.
34. Forlenza M, Scharsack JP, Kachamakova NM et al. Differential contribution of neutrophilic granulocytes and macrophages to nitrosative stress in a host-parasite animal model. *Mol.Immunol.* 2008;45:3178-3189.
35. Classen S, Zander T, Eggle D et al. Human resting CD4⁺ T cells are constitutively inhibited by TGFb under steady-state conditions. *J.Immunol.* 2007;178:6931-6940.
36. Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-b signaling. *J.Cell Biochem.* 2007;101:9-33.
37. Muller I, Munder M, Kropf P, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol.* 2009;30:522-530.

38. Nikolic B, Lee S, Bronson RT, Grusby MJ, Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J.Clin.Invest.* 2000;105:1289-1298.
39. Yi T, Chen Y, Wang L et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood* 2009;114:3101-3112.
40. Nava P, Koch S, Laukoetter MG et al. Interferon-g regulates intestinal epithelial homeostasis through converging b-catenin signaling pathways. *Immunity* 2010;32:392-402.
41. Burman AC, Banovic TD, Kuns RD et al. IFN γ differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood* 2007;110:1072.
42. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J.Exp.Med.* 2002;195:1129-1143.
43. Teshima T, Ordemann R, Reddy P et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat.Med.* 2002;8:575-581.
44. Matte-Martone C, Liu J, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. CD8⁺ but not CD4⁺ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens whereas both CD4⁺ and CD8⁺ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL. *Blood* 2008;111:3884-3892.

45. Zecher D, van RN, Rothstein DM, Shlomchik WD, Lakkis FG. An innate response to allogeneic nonself mediated by monocytes. *J.Immunol.* 2009;183:7810-7816.
46. Soehnlein O. An elegant defense: how neutrophils shape the immune response. *Trends Immunol.* 2009;30:511-512.
47. Martin PJ, McDonald GB, Sanders JE et al. Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2004;10:320-327.
48. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Cancer Cell* 2000;95:2754-2759.
49. Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. *Eur.J.Immunol.* 2004;34:1059-1067.
50. Fujii T, Ohtsuka Y, Lee T et al. *Bifidobacterium breve* enhances transforming growth factor b1 signaling by regulating Smad7 expression in preterm infants. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2006;43:83-88.

Figure Legends

Figure 1. SMAD3 modulates CD4 T-cell proliferation and T-bet expression. (A) One representative histogram showing the CFSE profile of CD4 T cells from WT or SMAD3-KO mice. FACS-sorted naive CD4 T cells ($CD44^{lo}CD62L^{hi}$) were left unstimulated (Ctrl) or were stimulated with anti-CD3 ϵ (1 μ g/ml) and anti-CD28 (5 μ g/ml) in the absence or presence of TGF- β (2.5 ng/ml) for 72 h. (B) Based on the number of cells in each division peak (as determined by CFSE-labeling intensity), we calculated the number of responding cells, their doubling time and the number of daughter cell generated per responding cell (4 independent experiments). (C-F) Naïve CD4 T cells were cultured under Th1 skewing conditions. (C) The percentage of T-bet⁺ cells was evaluated by intracellular staining and flow cytometry analysis (3 to 9 independent experiments). (D) One representative staining for T-bet and FOXP3 in CD4 T cultured for 72 h in the presence or absence of TGF- β . (E-F) Mean percentage of CD4⁺ cells expressing T-bet or FOXP3 after culture for 72 h in the presence of various concentration of TGF- β (3 to 5 independent experiments). (G) Percentage of CD4 T cells expressing FOXP3 or ROR γ t following culture for 72 h under Treg or Th17 skewing conditions, respectively (4 independent experiments). All histograms represent the mean and SEM. For all comparisons, differences were assessed using a 2-tailed paired Student's *t* test). * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$.

Figure 2. SMAD3 limits polymorphonuclear neutrophil production and function. (A) Phenotypic analysis of BM cells harvested from WT and SMAD3-KO littermates (n = 5). LSK are Sca-1⁺ and c-kit⁺ but negative for the following lineage markers: CD3 ϵ , B220, Gr-1, CD11b, Ter119, CD11c, NK1.1 and TCR γ δ). Common myeloid progenitors (CMP) are Lin⁻Sca-1⁻c-Kit^{hi}CD34⁺CD16/32⁻. Granulocyte-monocyte progenitors (GMP) have the same phenotypic profile as CMP but express high levels of CD16/32. (B) Granulocyte (CD11b⁺/Gr-1⁺) and (C) Monocyte (CD11b⁺/Gr-1⁻) counts harvested after culture for 10 days in methylcellulose-based medium in the absence or presence of exogenous TGF- β (10 ng/ml) (n = 5 independent experiments) (D) DHR mean fluorescence intensity (MFI) of Gr-1⁺ cells

after brief PMA stimulation ($n = 4$). All histograms represent the mean and SEM. Statistical differences according to the 2-tailed paired t test are shown by asterisks; * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$.

Figure 3. SMAD3 deficiency leads to lethal colonic GVHD. (A) Survival curve of BALB.B recipients after injection of 10^7 BM cells and 5×10^6 splenocytes from syngeneic (BALB.B) or allogeneic WT or SMAD3-KO 129-strain donors. (B-F) Same as in (A) except that the number of splenocytes was 5×10^5 . (B) Survival curve and (C) average weight (with SEM) for surviving mice (at least 10 mice per group). (D) Representative photographs of colon involvement at day 40 in recipients of WT or SMAD3-KO AHCT (0.25 mm scale unit). Virtual slides were scanned with the NanoZoomer 2.0 series system and acquisition software NDP.scan 2.2.17 (Hamamatsu Photonics) using a 40X objective lens. (E) Pathological grading of large bowel GVHD ($n=8$). (F) Relative quantity (compared to internal positive control) of cytokine/marker in colon extracts at day 40. Data are expressed as relative chemiluminescence as described in the method section ($n = 3$). All histograms represent means with SEM. Student's t test was used to compare differences between recipients of WT and SMAD3-KO donors; * = $P < 0.05$.

Figure 4. SMAD3 deficiency in both T and non-T cells contributes to lethal GVHD. (A) Representative photographs of colon sections stained with anti-CD3 ϵ , anti-F4/80 and anti-Gr-1 (100 μm scale unit). Virtual slides were scanned with the NanoZoomer 2.0 series system and acquisition software NDP.scan 2.2.17 (Hamamatsu Photonics) using a 40X objective lens. (B) One representative plots of CD8/CD4 and Gr-1/CD11b staining of colon cells and (C) mean percentages of CD4 $^+$ and CD8 $^+$ cells and (D) of granulocytes (CD11b $^+$ /Gr-1 $^+$) and monocytes (CD11b $^+$ /Gr-1 $^-$) among the live gate. All histograms represent means with error bars representing SEM. Statistical analyses were performed with Student's t test * = $P < 0.05$. (E) Splenocytes from either WT or SMAD3-KO mice were admixed to T-cell depleted BM from WT or SMAD3-KO 129-strain donors and injected into BALB.B

recipients. Survival curves were analyzed using the log rank test. Survival of mice that received mixed grafts (in which only the BM or the spleen cells were from SMAD3-KO donors) was better than for recipients of SMAD3-KO graft ($P < 0.05$), but worse than for recipients of WT graft ($P < 0.05$).

Figure 5. T-cell activation and Th1 bias in recipients of SMAD3-KO grafts. (A) Cytokine Bead Array analysis of colon extracts on day 40 post-AHCT (n = 5). (B,C) Percentage of T-bet⁺ CD4 T cells among live cells on day 40. (B) One representative contour plot; (C) mean percentage and SEM for 5 mice per group. (D) Mean percentage of CD43i⁺ CD4⁺ T cells among live cells from colon extracts on day 40 post AHCT (n = 7). (E) One representative contour plot showing co-staining for CD4 and T-bet on day 20. (F) Percentage of CD4⁺ cells and of CD4⁺T-bet⁺ cells among live cells extracted from the colon on day 20 (n = 8). (G) Percentage of colon CD4 T cells expressing FOXP3 on day 20 and 40 post-AHCT. Statistical analyses were performed with Student's *t* test (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$).

Figure 6. SMAD3 deficiency leads to systemic accumulation of granulocytes in AHCT recipients. (A) Representative images of day 40 BM at 2 magnifications (2.5X: 0.25 mm scale unit and 40X: 20 μ m scale unit. Virtual slides were scanned with the NanoZoomer 2.0 series system and acquisition software NDP.scan 2.2.17 (Hamamatsu Photonics) using a 40X objective lens. (B) Representative contour plots (spleen) and (C-E) overall percentages (mean and SEM) of granulocytes (CD11b⁺/Gr-1⁺) in the spleen and mesenteric lymph nodes (C) on day 40 (n= 12 and 5, respectively) and (D) on day 20 (n= 8 and 5, respectively) post-AHCT. (E) Mean percentage of granulocytes (CD11b⁺/Gr-1⁺) in the colon on day 20 post-AHCT (n= 6). Statistical analyses were performed with Student's *t* test (* = $P < 0.05$).

Figure 7. SMAD3-KO granulocytes cause tissue damage in the colon. (A) Representative CD11b staining and (B) average CD11b geometric mean fluorescence

intensity of granulocytes extracted from the colon of AHCT recipients on day 40 (mean and SEM, $n = 9$). (C) Representative images were taken from virtual slides that were scanned with the NanoZoomer 2.0 series system and acquisition software NDP.scan 2.2.17 (*Hamamatsu Photonics*) using a 40X objective lens. Analysis of positively stained cells (green) was done using Visiopharm Integrator System (3.4.1.0) MicroImager (Visiopharm) software. Overlay analysis of consecutive tissue sections stained for Gr-1 or nitro-tyrosine were photomerged and analyzed using the Adobe Photoshop CS3 software. (D) Percentage of Gr-1⁺ and nitro-tyrosine⁺ cells (mean and SEM $n = 3$, 10 fields at a 20x magnification) (E) Percentage of nitro-tyrosine positive cells that are adjacent to granulocytes (≤ 30 pixels). Statistical analyses were performed with Student's *t* test (* = $P < 0.05$, *** = $P < 0.001$).

Figure 1

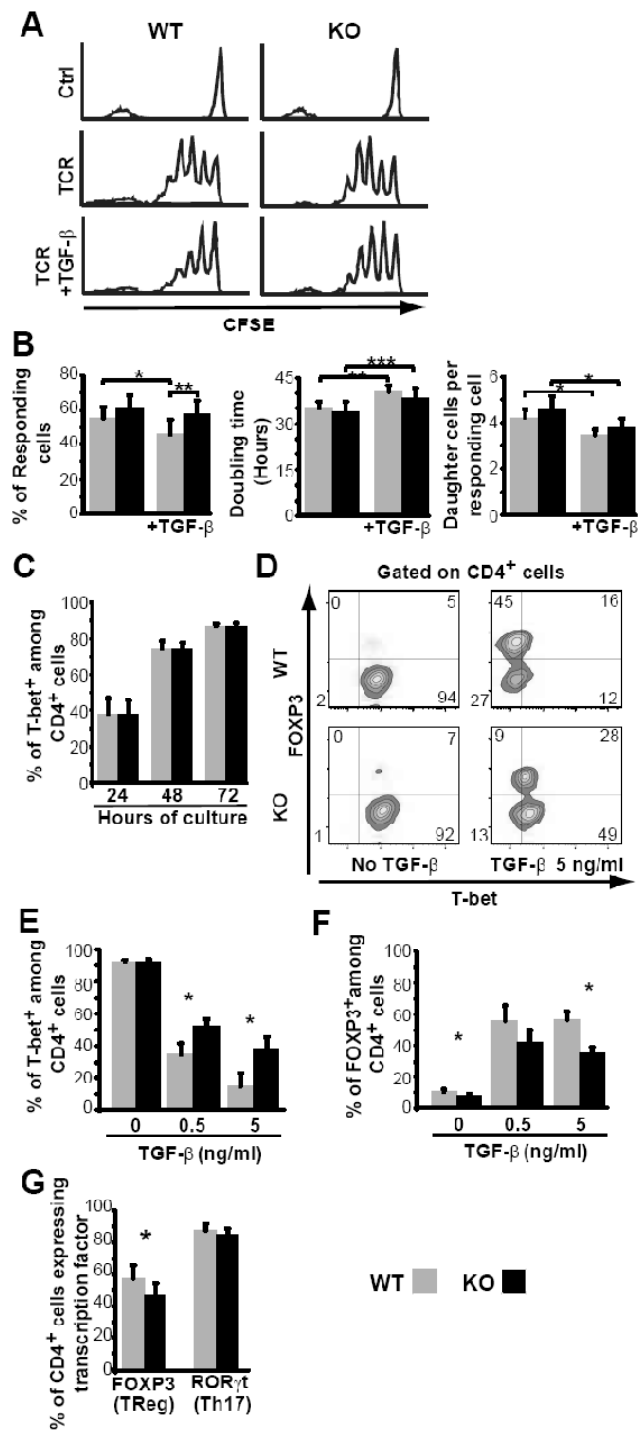


Figure 2

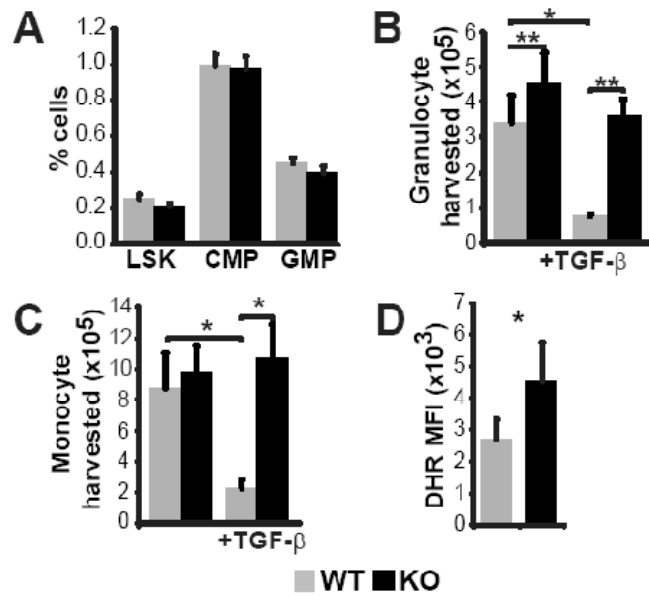


Figure 3

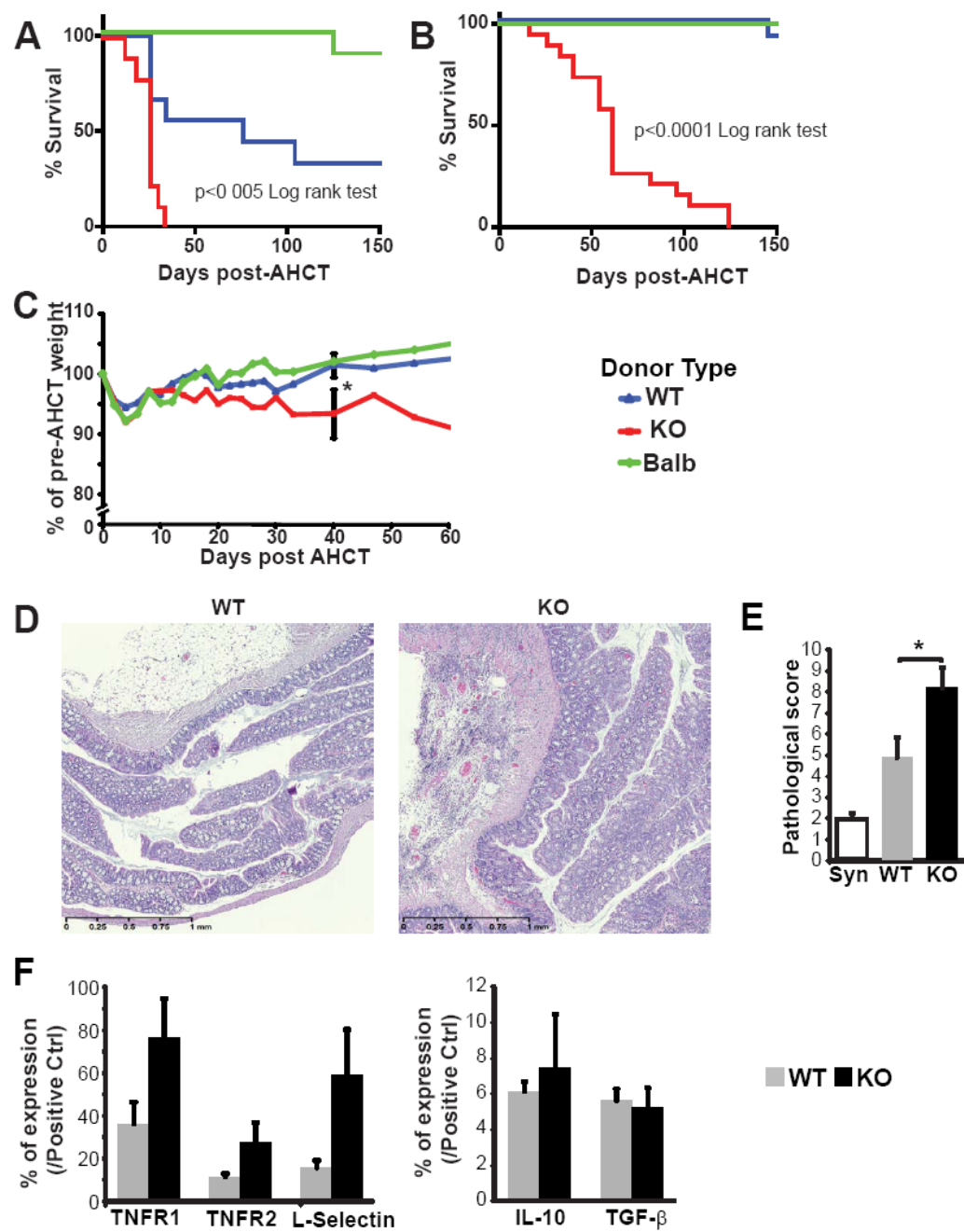


Figure 4

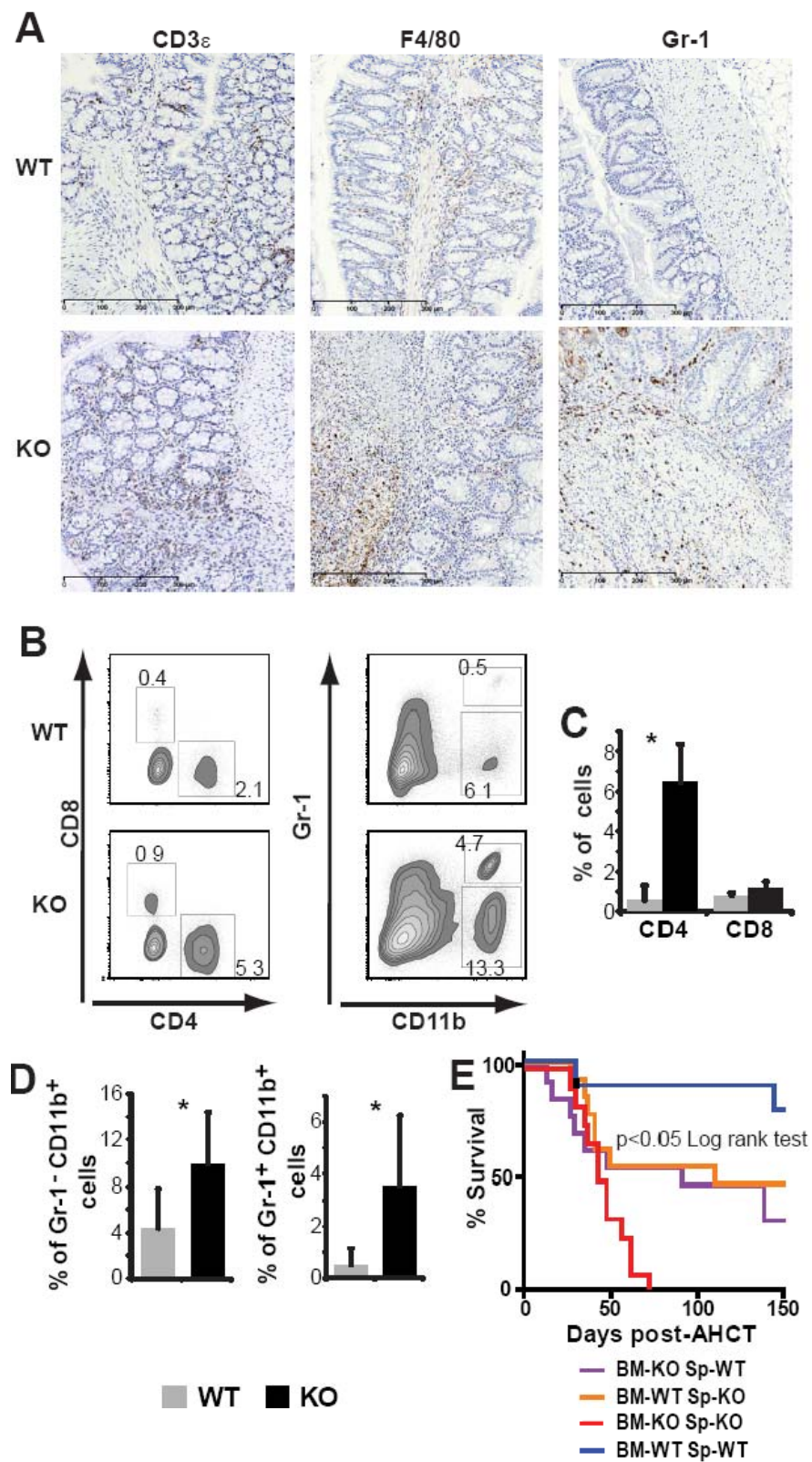


Figure 5

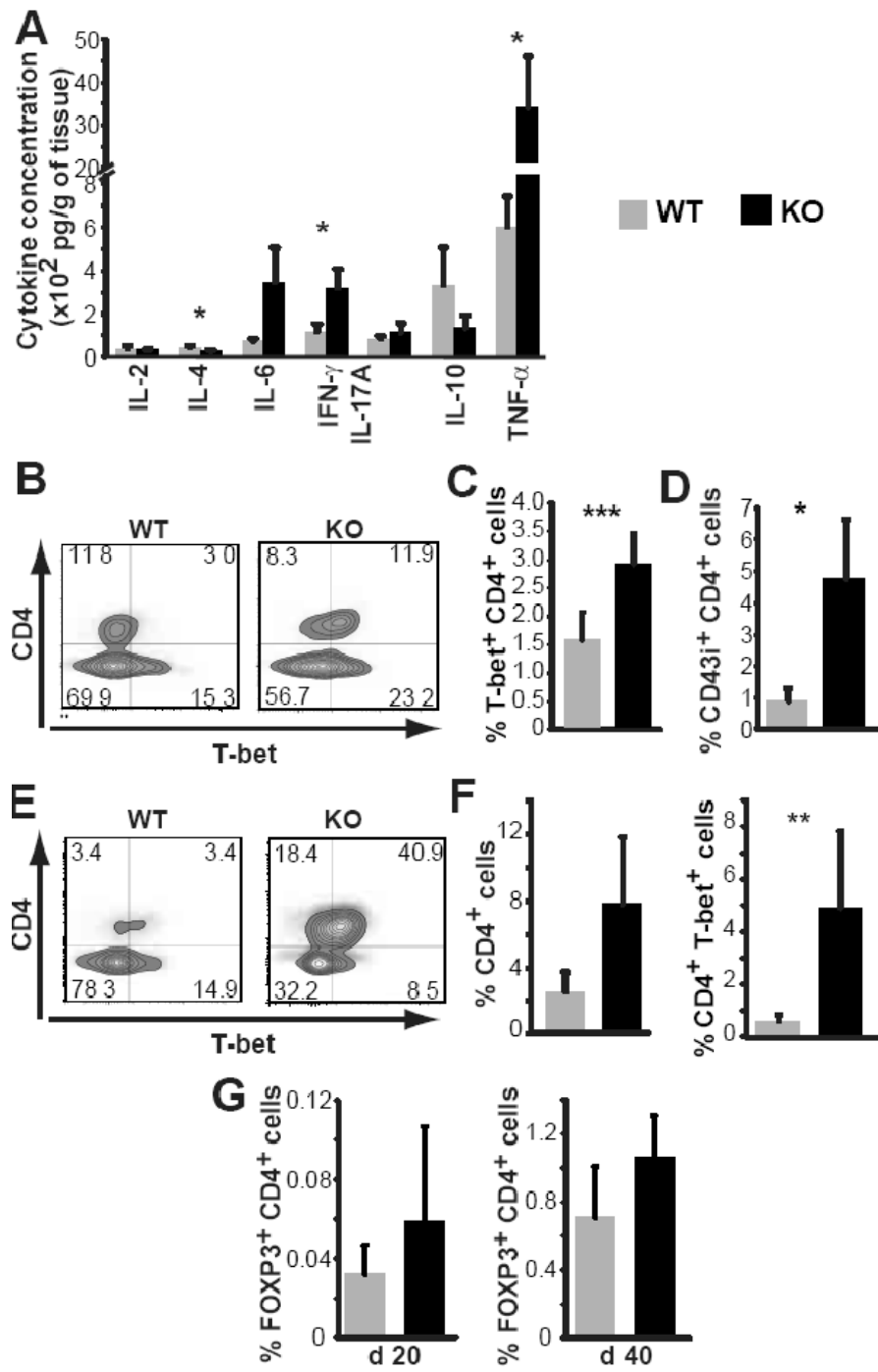


Figure 6

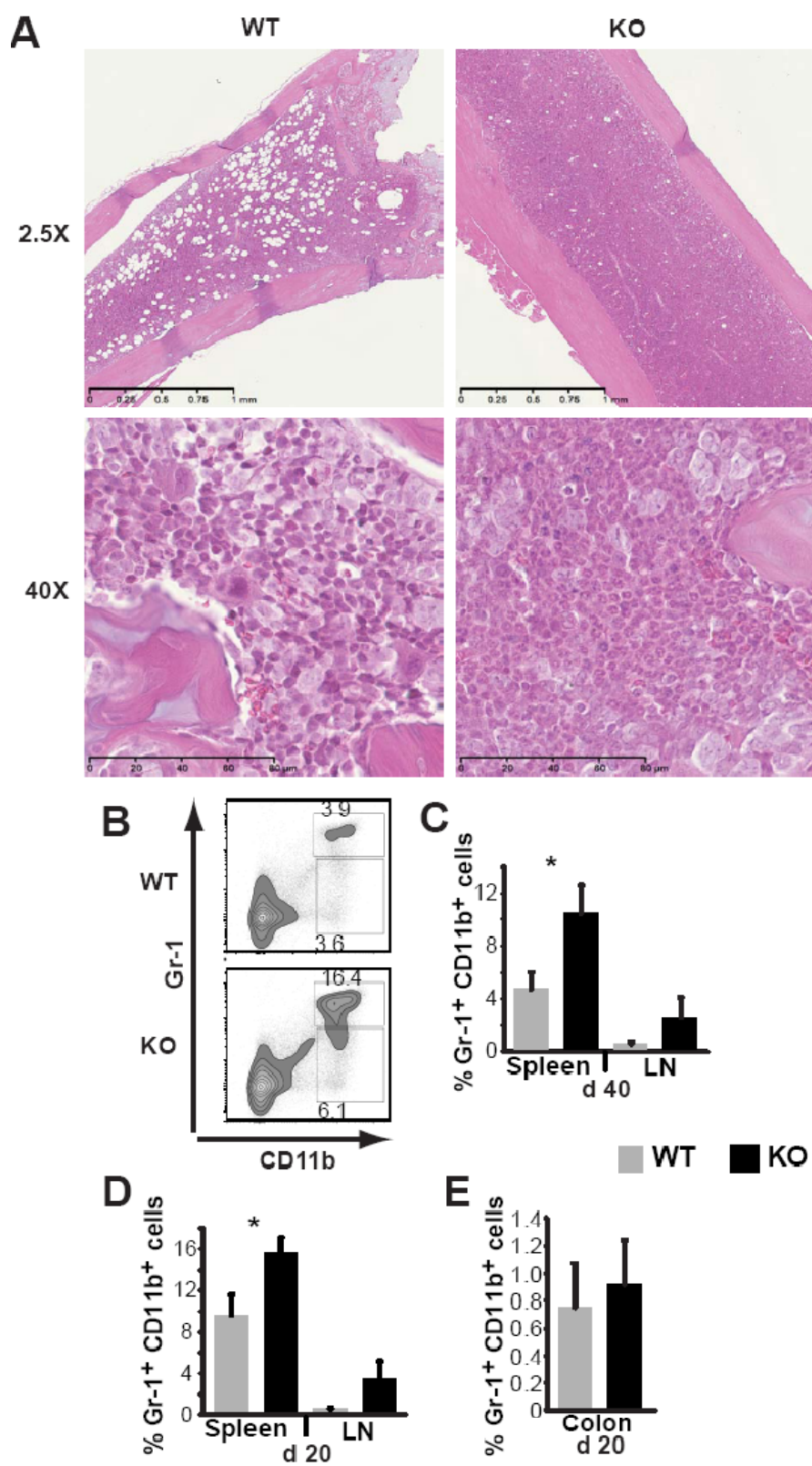
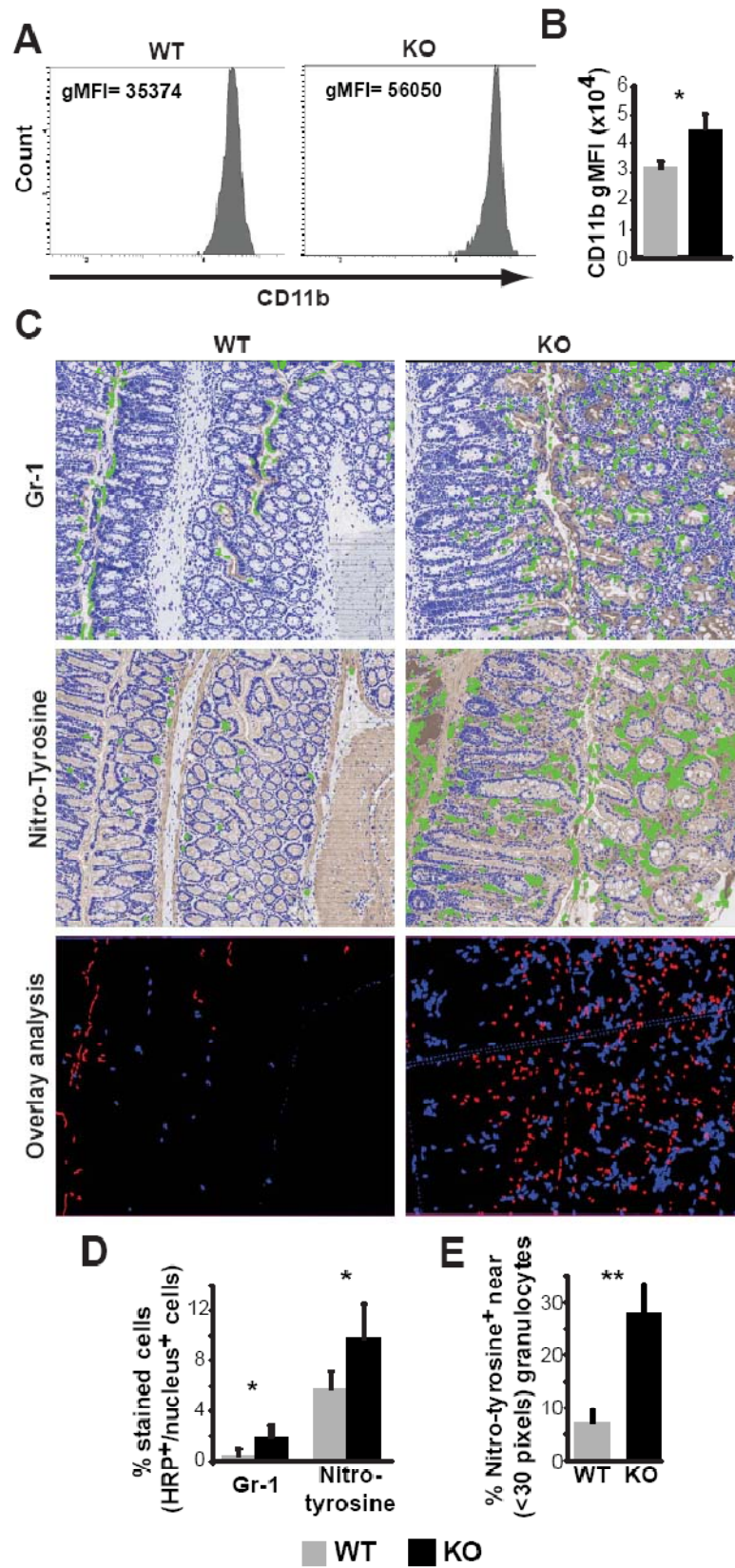
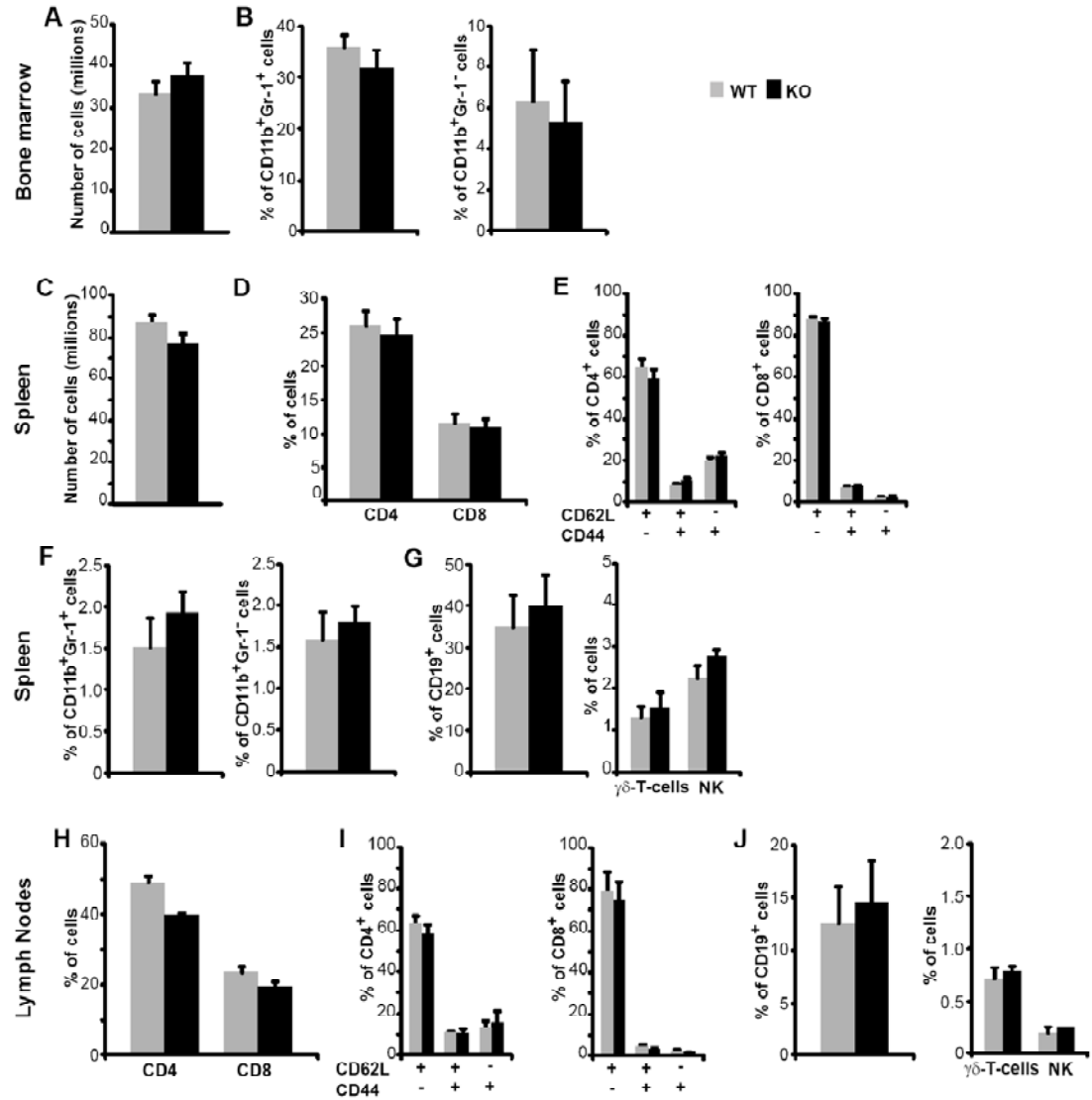


Figure 7

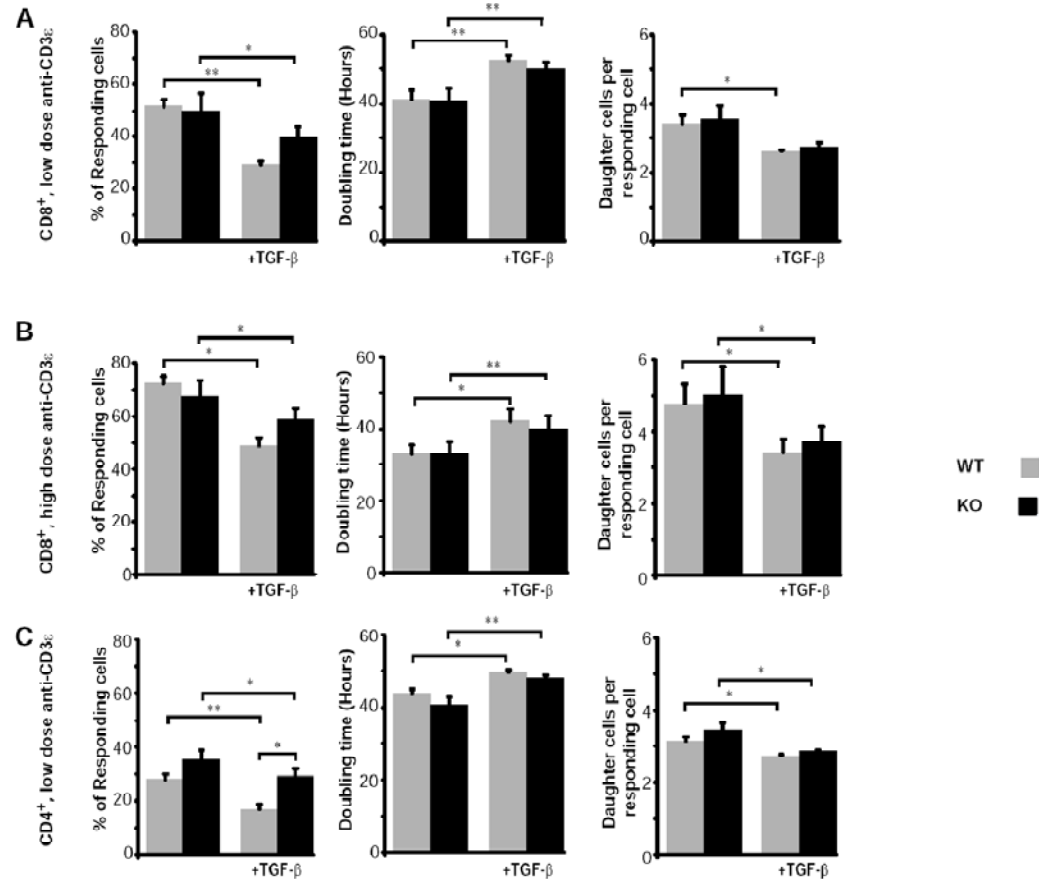


Supplemental Figure 1



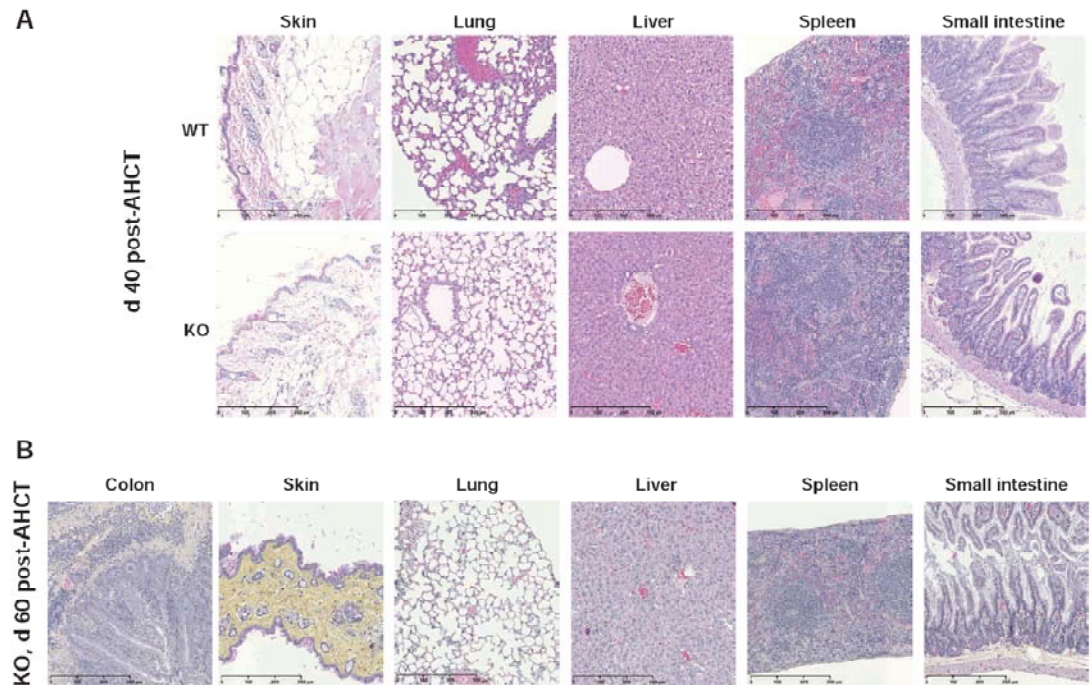
Supplemental Figure 1. SMAD3-KO and WT mice present no differences in hematopoietic and lymphoid cell subsets. (A) Mean BM cellularity (2 tibiae and 2 femurs). (B) Percentage of granulocytes (CD11b⁺/Gr-1⁺) and monocytes (CD11b⁺/Gr-1⁻) in the BM. (C) Spleen cellularity. (D) Percentage of CD4 and CD8 cells in the spleen and (E) proportion of naive (CD62L⁺/CD44⁻), central memory (CD62L⁺/CD44⁺) and effector memory (CD62L⁻/CD44⁺) subsets. (F) Percentage of granulocytes and monocytes in the spleen. (G) Percentage of CD19⁺ (B lymphocytes), TCR $\gamma\delta$ ⁺ and NK (DX5⁺/TCR β ⁻) cells in the spleen. (H-J) Proportion of lymphoid cell subsets in mesenteric lymph nodes. All histograms represent the mean and SEM for 4 to 9 mice per genotype.

Supplemental Figure 2



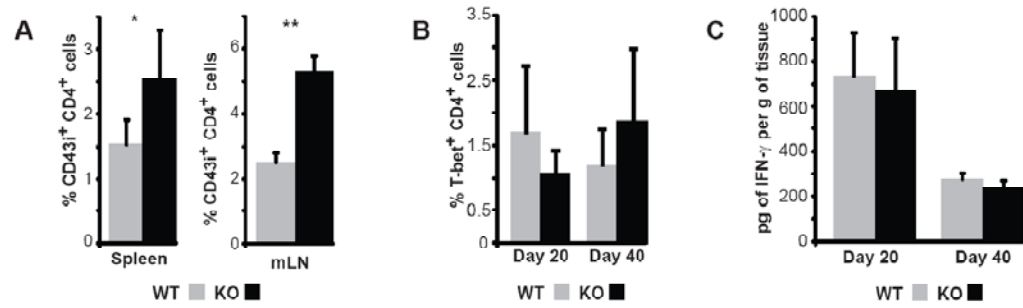
Supplemental Figure 2. Effect of SMAD3 genotype and TGF- β on T-cell proliferation. (A) Effect of low dose (0.1 μ g/ml) and (B) high dose (1 μ g/ml) of soluble anti-CD3 ϵ and anti-CD28 (5 μ g/ml) on sorted naive CD8 T cells from either WT or SMAD3-KO mice. (C) Effect of low dose soluble anti-CD3 ϵ (0.1 μ g/ml) with anti-CD20 (5 μ g/ml) on proliferation of naive CD4 T cells from either WT or SMAD3-KO mice. TGF- β was added to cell cultures at a concentration of 2.5 ng/ml where indicated. Histograms represent the mean of 4 independent experiments and error bars represent the SEM. Intra-genotype and inter-genotype differences were evaluated by the Student's t test. All significant differences are shown (*= $P < 0.05$ and **= $P < 0.01$).

Supplemental Figure 3



Supplementary Figure 3. Histological examination of mouse organs. (A) Representative photographs of skin, lung, liver, spleen and small intestine at day 40 post-AHCT obtained from recipients of either WT or SMAD3-KO grafts (at least 3 animals per condition) and (B) representative photographs of the same organs plus colon in recipient of SMAD3-KO grafts at day 60 (at least 3 animals). (20X objective, 100 μ m scale unit).

Supplementary Figure 4



Supplementary figure 4. Evidence of systemic T-cell activation without Th1 bias. (A) Percentages of CD43i⁺ CD4⁺ T-cells in the spleen (n=8) and mesenteric lymph nodes (n = 5) on d 40 post-AHCT. **(B)** Percentages of T-bet⁺ CD4⁺ T cells in the spleen on d 20 and d 40 post-AHCT (n = 5). **(C)** IFN-γ concentration in spleen extracts on d 20 and d 40 post-AHCT (n = 5). Histograms represent the mean and SEM. Statistics performed with Student's t test (*=P < 0.05, **=P < 0.01).

6.3- Article III

Giroux M., **Delisle JS.**, O'Brien A., Hébert MJ., Perreault C.,

T cell activation leads to protein kinase C θ -dependent inhibition of TGF- β signaling, *Journal of Immunology*, 2010. 185(3):1568-76.

Contributions de Delisle JS. : Participation à l'élaboration des devis, l'interprétation des données et la rédaction.

T cell activation leads to PKC θ -dependent inhibition of TGF- β signaling¹

Running title: PKC θ inhibits TGF- β signaling

Martin Giroux*[†], Jean-Sébastien Delisle*[†], Alan O'Brien*[†], Marie-Josée Hébert[†][‡]
and Claude Perreault*[†][§]

* Institute for Research in Immunology and Cancer and

[†] Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

[‡] Centre de Recherche du CHUM, Montreal, QC, Canada H2X 1P1

[§] Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC,
Canada H1T 2M4

Address of correspondence and reprint requests to Claude Perreault

Keywords: Cell Activation; Cytokines; T Cells; Tolerance/Suppression/Anergy;
Signal Transduction

Abstract

TGF- β is a ubiquitous cytokine that plays a pivotal role in the maintenance of self-tolerance and prevention of immunopathologies. Under steady-state conditions, TGF- β keeps naive T cells in a resting state and inhibits Th1 and Th2 cell differentiation. Since rapid generation of Th1 and Th2 effector cells is needed in response to pathogen invasion, how do naïve T cells escape from the quiescent state maintained by TGF- β ? We hypothesized that stimulation by strong TCR agonists might interfere with TGF- β signaling. Using both primary mouse CD4⁺ T-cells and human Jurkat cells, we observed that strong TCR agonists swiftly suppress TGF- β signaling. TCR engagement leads to a rapid increase in SMAD7 levels and decreased SMAD3 phosphorylation. We present evidence that TCR signaling hinders SMAD3 activation by inducing recruitment of TGF- β receptors in lipid rafts together with inhibitory SMAD7. This effect is dependent on PKC- θ , a downstream TCR signaling intermediary, as revealed by both pharmacological inhibition and expression of dominant-negative and constitutively-active PKC- θ mutants. This work broadens our understanding of the cross-talk occurring between the TCR and TGF- β signaling pathways and reveals that strong TCR agonists can release CD4 T cells from constitutive TGF- β signaling. We propose that this process may be of vital importance upon confrontation with microbial pathogens.

Introduction

TGF- β is the cytokine expressed constitutively at highest levels in lymphoid and nonlymphoid organs where it regulates T cell development, homeostasis and differentiation (1,2). TGF- β exists in 3 isoforms in mammals: TGF- β 1, - β 2, and - β 3. TGF- β 1 is the most abundant, universally expressed, and widely studied isoform. TGF- β is secreted as a latent protein complex that requires activation for biologic activity (3). Once activated, TGF- β stimulates cellular responses by inducing the assembly of heteromeric complexes containing two ubiquitously expressed cell-surface receptors, the type I and type II TGF- β receptors (TGF- β R)², both of which contain a serine/threonine protein kinase in their intracellular domains. Once bound to TGF- β , TGF- β R_{II} recruits, binds, and transphosphorylates TGF- β R_I, thereby stimulating its protein kinase activity. The activated TGF- β R_I then recruits and phosphorylates the transcription factors, SMAD2 and SMAD3 (SMAD2/3), which then bind to the common SMAD4, translocate into the nucleus, and interact in a cell-specific manner with transcription factors, coactivators and corepressors to regulate the transcription of TGF- β -responsive genes (4-10). Even though the TGF- β pathway can transduce signals via noncanonical SMAD-independent mechanisms (6), TGF- β signaling in T cells is mediated mainly if not exclusively via the canonical SMAD2/3-dependent pathway (11,12).

The TGF- β pathway is very complex and is regulated at many levels (6). For instance, SMAD7 is a competitive inhibitor of SMAD2/3. SMAD7 can also induce the degradation of internalized TGF- β R complexes by recruiting SMURF2 (13).

TGF- β R complexes can be internalized either through clathrin-dependent or lipid raft/caveolae-dependent endocytosis pathways. The former promotes signaling whereas the latter leads to the rapid SMAD7-mediated degradation and reduced signaling (14). TGF- β signaling can also be inhibited in the cytosol by phosphatases that reduce the amount of active SMAD2/3 (15), and in the nucleus by co-repressors that interfere with association of co-activators and recruitment of histone deacetylase to the transcription site (15).

TGF- β plays a pivotal role in maintaining self-tolerance and preventing the development of immunopathology (2,16,17). TGF- β signaling in T cells is also essential for establishment of tolerance to allografts (18,19). Mice deficient in TGF- β rapidly develop a lethal multi-focal CD4⁺ T cell-dependent autoimmune disease (20,21). Furthermore, expression of a dominant negative TGF- β RII or deletion of TGF- β RII specifically in T lymphocytes leads to autoimmunity with loss of naïve T cells and accumulation of effector/memory T cells (22,23). The pleiotropic effects of TGF- β on various T cell subsets are complex and context-dependent (2,16,24). Under steady-state conditions, TGF- β promotes the survival of naïve CD4⁺ T cells and keeps them in a resting state (2,25). Accordingly, freshly isolated naïve CD4⁺ T cells contain significant amounts of phosphorylated SMAD2 and SMAD3 proteins and express several TGF- β -dependent transcripts (25). TGF- β signaling prevents T cell proliferation and production of IL-2 (26,27). Moreover, TGF- β inhibits Th1 and Th2 cell differentiation whereas it contributes to differentiation of Th17 cells and maintenance of induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (2).

The fact that TGF- β is abundant in lymphoid and extralymphoid tissues and that constitutively active TGF- β signaling keeps naïve T cells in a resting state brings a fundamental question. Since brisk generation of Th1 and Th2 effector T cells is needed in response to pathogen invasion, how do naïve T cells escape from the quiescent state maintained by TGF- β ? A parsimonious explanation would be that stimulation by strong TCR agonists interferes with TGF- β signaling. Using both primary murine CD4⁺ T cells and Jurkat cells, we demonstrate herein that TGF- β /SMAD-dependent signaling and transcription are rapidly inhibited following activation with mAbs to CD3 and CD28. Most notably, the amount of phosphorylated SMAD3 decreases and several TGF- β transcriptional targets are down-regulated. Mechanistically, we identified PKC- θ as a key TCR signaling intermediary that actively inhibits TGF- β signaling, probably by associating with TGF- β R complexes that are then recruited in lipid rafts.

Material and Methods

Mice and cell lines

B6(SJL)-Tg(SBE/Tk-luc)^{7Twc}/J mice, obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), were housed under specific pathogen-free conditions in the animal care facilities of the Institute of Research on Immunology and Cancer, and used between 7 and 15 wk of age. These transgenic mice, referred to as SBE-Luc mice, express luciferase in response to activation of the Smad2/3-dependent signaling pathway. All work involving mice was conducted under protocols approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur des Animaux de l'Université de Montréal. Human T lymphocyte Jurkat cell lines E6-1 (ATCC TIB-152), J.CaM1.6 (Lck kinase activity deficient Jurkat cells, ATCC **CRL-2063**) and Jp116 (ZAP70-deficient Jurkat cells provided by Dr. André Veillette, Montréal, QC, Canada) were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum, penicillin, streptomycin and glutamine (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA).

Abs and reagents

Recombinant human TGF- β 1 was obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ). Mowiol 4-88 reagent was from Calbiochem (Gibbstown, NJ). Trizol reagent and Tris were from Invitrogen. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD), triton X100, glycerol, KH₂PO₄, acetyl CoA, ATP, MgCl₂, Brij-58, DTT, EDTA, sucrose, NaCl and dynasore were from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). D-Luciferin was from Xenogen (Hopkinton, MA). DAPI and G-sepharose beads were from Roche Diagnostics (Indiannapolis,

IN). SDS and tween-20 were from Biorad (Hercules, CA). The source, specificity and usage of pharmacological inhibitors are shown in Table I.

For T cell stimulation we used mAbs specific for mouse (from BD Biosciences, San Jose, CA) or human (eBioscience, San Diego, CA) CD3 and mouse or human CD28 (both from eBioscience). Stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs was performed as described (28,29). Immunoprecipitation was done using the mouse anti-TGF- β RII (clone E-6) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). For immunofluorescence studies, we used Abs against the following molecules: mouse-SMAD2/3 from Abcam (Cambridge, MA); TCR β -APC, CD4-APCCy7, CD8-PECy7 and CD44-FITC from BD Biosciences; CD62L-PECy5 from eBioscience and rabbit IgG-Alexa488, mouse IgG-Alexa647 and mouse IgG-Alexa555 from Invitrogen-Molecular Probes. For immunoblotting studies we used Abs against goat Ig-HRP, mouse Ig-HRP, actin, PKC α (clone Y124), SMAD3, SMAD7, SMAD2, SMAD2-Ser465/Ser467, PPM1A (clone p6c7), SMURF2, TGF- β R1 and SnoN from Abcam; PKC θ , clathrin heavy chain, Lck, Akt, rabbit Ig-HRP from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Ab against SMAD3-Ser423/Ser425 was from Novus Biologicals (Littleton, CO) and Ab to TGIF (clone H-1) from Santa Cruz Biotechnology.

Vectors and transfection of Jurkat cells

PKC vectors (CA-PKC α , DN-PKC α , CA-PKC θ and DN-PKC θ) were a kind gift from Dr. Jean-Guy Lehoux (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada) (30). SBE-FLuc vector was provided by Dr. Tony Wyss-Coray (Stanford University,

Palo Alto, CA) (31), and pCDNA3.1-PTEN-eGFP (Addgene plasmid 13039) by Dr. Alonzo Ross (University of Massachusetts, Worcester, MA). pCDNA3.1-RLuc and pCDNA3.1-FLuc vectors were gifts from Dr. Daniel Lamarre and Dr. Sylvain Meloche (Université de Montréal), respectively. Transfection of Jurkat cells was done using TransIT-Jurkat transfection reagent (Mirus Bio LLC, Madison, WI) according to the manufacturer's protocol. Cells were used 24-48 h later. Double and triple vector co-transfections were done using the Ingenio Electroporation solution (Mirus Bio LLC) and 0.4 cm cuvettes (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol. Cells were used 48-72 h later.

Firefly luciferase activity detection

Cells were incubated (or not) with TGF- β (10 ng/ml) for 1 h, then stimulated (or not) with mAbs to CD3 and CD28 (1 and 0.5 μ g/ml, respectively) and cultured for 5 h before cell lysis (Lysis Buffer: 1 %(v/v) triton-X100, 10 %(v/v) glycerol, 5 mM Tris, 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT). Luminescence activity was evaluated on a LUMIstar plate-reader from BMG Labtech (Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) following incubation of cell lysates with a Luciferin Mix (1:2) (4 mM KH₂PO₄, 80 mM Tris, 15 mM MgCl₂, 120 μ M Acetyl-CoA, 24 mM DTT, 1 mM ATP and 0.5 mM luciferin mixed (1:1) with lysis buffer) for 1 min. In experiments with primary T cells from SBE-Luc transgenic mice, luciferase activity was expressed as a ratio of treated relative to untreated cells. In experiments with Jurkat cells, cells transiently transfected with either SBE-FLuc or pCDNA3.1-Fluc vector were treated and analyzed in parallel. Luciferase activity driven by SBE-Fluc was then normalized to that of luciferase activity in cells transfected with the pCDNA3.1-Fluc vector.

pCDNA3.1 vectors contain the human cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer, that permits efficient, high-level expression of recombinant proteins. Results obtained with that experimental protocol were validated using a dual-luciferase reporter assay (SBE-FLuc/pCDNA3.1-RLuc) performed as suggested by the manufacturer (Promega) (supplemental Fig. 1).

Lipid rafts –sucrose gradient

About $1-4 \times 10^8$ cells treated for 30 min were washed twice in PBS and then lysed on ice with 1 ml of lysis buffer containing 1 %(w/v) Brij-58 in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM NaF and 2 mM NaVO_4 , plus a cocktail of protease inhibitors (Complete cocktail, EDTA-free; Roche Diagnostics). Cell lysate was added 1:1 volume to 80 %(w/v) sucrose and then a 5-30% discontinuous sucrose gradient was layered on top. Typically, 3-6 ml of 35 % sucrose and 1-2 ml of 5% sucrose were layered on a 2 ml sample in 80% sucrose in a 10 ml centrifuge tube (Beckman Coulter, Brea, CA). Samples were centrifuged at 100,000 g at 4°C for 20 h using a SW41 swinging bucket rotor (Beckman Coulter). Fractions of 0.5 to 1 ml (typically 10-11 fractions in total) were collected from the top of gradient tubes and used for SDS-PAGE analysis. Immunoblot analysis with cholera toxin subunit B-HRP was performed to identify lipid raft rich fractions (GM1 ganglioside positive). The relative proportion of each protein in the lipid raft rich fractions was done by quantifying band intensity in each fraction, using the Fujifilm MultiGauge 3.0 software (Fujifilm, Tokyo, Japan), and dividing the intensity of bands found in ganglioside-rich regions by the sum of intensities of the bands found in all fractions. Fold enrichment was

calculated by dividing the relative proportion of each protein in the LRR fractions from treated vs. untreated cells.

Quantitative PCR (qPCR)

qPCR analyses were performed on Jurkat cells and sorted naïve-phenotype CD4⁺ T cells (CD4⁺CD62L⁺CD44⁻) as previously described (29,32). In brief, total RNA of purified cells was extracted and reverse-transcribed. Gene expression level was determined by qPCR using Taqman primer and probe sets. Mouse hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) was used as endogenous control gene.

Immunofluorescence confocal microscopy

For intracellular staining, cells were allowed to adhere to glass slides coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After culture for 1 h in the presence of TGF-β1 (10 ng/ml), mAbs to CD3 and CD28 (1 and 0.5 μg/ml, respectively) were added and cells were incubated for 30 min. Cells were washed twice with PBS and fixed in cold methanol (-20 °C) for 15 min. After PBS wash, cells were stained with Ab to SMAD2/3 (mouse, 1:100) for 1 h, then labeled with goat Ab to mouse IgG-Alexa647 and DAPI (1 μM). Slides were covered with Mowiol solution and coverslip and kept at 4°C for microscope analysis.

For surface staining, cells were treated with TGF-β1 (10 ng/ml) and stained with Ab to TGF-βRI (rabbit, 1:50) and αβTCR (mouse, 1:100) at 4°C for 30 min, washed with PBS, then incubated with TGF-β1 and secondary Abs to rabbit IgG-Alexa488 and mouse IgG-Alexa555 for 1 h at 4°C. Cells were finally treated with TGF-β1 and Abs to CD3 and CD28 for 30 min, fixed with 2% paraformaldehyde, washed with PBS

and stained with DAPI. Cell suspensions were then laid in glass bottom petri dishes (MatTek Cultureware, Ashland, MA) with an overlaid coverslip. Immunofluorescence confocal microscopy was performed with a LSM 510 Meta inverted microscope with 40x, 63x and 100x objectives and analysis was done with the LSM510 v3.2 software (Carl Zeiss, Jena, Germany) and Metamorph v7.5 software (Molecular Devices, Downingtown, PA). Colocalisation coefficient and weighted colocalisation coefficient were calculated with the LSM510 software.

Immunoblotting and immunoprecipitation

Jurkat cells were lysed in SDS lysis buffer (50 mM tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% triton X100, 5 mM NaF and 2 mM NaVO₄, plus a cocktail of protease inhibitors) and lysates were cleared by centrifugation at 13000 RPM for 15 min at 4°C. Protein concentrations were determined using Biorad protein assay (Biorad). Equal amounts of total protein (20-200 µg) were separated on 8% SDS-PAGE followed by transfer to PVDF membranes (GE Healthcare, Piscataway, NJ). After 30 min blocking in 2% milk in TBST (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), Western blotting was done by overnight incubation at 4°C in the presence of indicated Abs (33). Protein staining of membrane was revealed by incubation with specific secondary Abs for 3 h at room temperature, and then with ECL Advance Western Blotting Detection kit (GE Healthcare). The relative level of each protein was quantified using the Fujifilm MultiGauge 3.0 software and normalized against the actin or calnexin band.

For immunoprecipitation studies, cells were lysed in IP buffer (50 mM tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% triton X100) and 400 µg of protein lysates were pre-washed with 25 µl of protein G-sepharose beads for 1 h. Then, 5 µg of the immunoprecipitation specific Ab to TGF-βRII was added to the cell lysates. After 1 h, 25 µl of protein G-sepharose beads was added for overnight incubation. Protein-Ab-bead complexes were centrifuged, washed in IP buffer and diluted in SDS lysis buffer before heating at 95 °C for 5 min. After removal of beads by centrifugation, half of the volume left was used for SDS-PAGE.

Statistical analysis

The Mann-Whitney rank test was used for analysis of qPCR results. For other data, the means of normally distributed data were compared using the Student's *t* test, with a *p* value of < 0.05 considered significant (*). Data are presented as mean ± SD.

Results

T cell activation inhibits TGF- β signaling

Translocation of activated SMAD2 and SMAD3 from the cytoplasm to the nucleus is a hallmark of ongoing TGF- β signaling (6,34). We therefore used confocal microscopy to evaluate the impact of TCR stimulation on TGF- β driven SMAD2/3 accumulation in the nucleus. Primary mouse CD4⁺ T cells were stained with DAPI (nuclear staining) and anti-SMAD2/3 Ab. T cell stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs abrogated TGF- β -induced accumulation of SMAD2/3 in the nucleus (Fig. 1A-B). In order to assess whether the decreased nuclear accumulation of SMAD2/3 would translate into a decrease in SMAD-dependent transcriptional output, we used cells from transgenic mice expressing a reporter gene containing 12 SMAD binding element (SBE) repeats fused to the firefly luciferase (SBE-Fluc mice). Treatment of spleen derived T cells with TGF- β led to a 5-fold increase in the luciferase activity, as described previously in astrocytes (31). Stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs led to a 60% decrease in the luminescence output (Fig. 1C). These data show that TCR signaling in primary mouse T lymphocytes exposed to TGF- β suppresses translocation of SMAD2/3 in the nucleus and SMAD-mediated transcription.

To define more precisely the impact of TCR signaling on TGF- β -regulated transcription, we performed qPCR analyses of 11 components and transcriptional targets of the TGF- β pathway (4,31). We compared transcript levels in sorted primary naïve-phenotype CD4⁺ T cells (CD4⁺CD62L⁺CD44⁻) cultured for 6 h or 24 h in the presence of TGF- β with or without anti-CD3/CD28 stimulation. Ten out of eleven

TGF- β related genes were differentially expressed at one or both time points (Fig. 1D-E), the sole exception being *Tgif1*. Downregulation of *Smad3* and *Smad7* was most obvious at 6 h while that of *Smad2*, *Ski* and *Cxcr4* was more pronounced at 24 h. Upregulation of *Myc* and *Myb* was significant after 6 h and 24 h, respectively. Downregulation of *Smurf2*, *Tob1* and *Smad4* was of similar magnitude at both time points. We conclude that TCR signaling rapidly downregulates expression of core components and targets of the canonical TGF- β pathway.

TCR activation inhibits SMAD3 phosphorylation

To define more precisely the chain of events linking TCR stimulation with inhibition of TGF- β signaling, we used the Jurkat human T cell line whose TCR signaling pathway has been extensively characterized (35). Jurkat cells were transfected with the *SBE-Fluc* vector or a control pCDNA3.1-Fluc vector and SBE-mediated activity was calculated as a ratio of SBE-Fluc over pCDNA3.1-Fluc luminescence. Again, using this in vitro model we observed that anti-CD3/CD28 stimulation suppressed TGF- β signaling (Fig. 2). This inhibition was dose- and time-dependent (Fig. 2B-C). Furthermore, it was quite brisk and extensive, reaching about 65% after 2 h and 80% after 5 h (Fig. 2B-C).

Shuttling of phosphorylated SMAD2/3 from the cytosol to the nucleus is the cornerstone of TGF- β signaling. To investigate how TCR signaling could hamper accumulation of nuclear SMAD2/3 (Fig. 1A-B), we assessed by Western blot analysis the expression of core components of the TGF- β pathway and the phosphorylation state of SMAD2 and SMAD3 under three conditions: in the presence of TGF- β , anti-

CD3/CD28 or both (Fig. 3). When compared to protein levels found in the presence of TGF- β alone, concurrent anti-CD3/CD28 stimulation had two conspicuous effects. First, though the amount of SMAD3 was unchanged, that of phospho-SMAD3 was drastically decreased. In contrast, TCR signaling did not impinge on the levels of phospho-SMAD2. Second, anti-CD3/CD28 stimulation upregulated expression of SMAD7. Notably, upregulation of SMAD7 protein expression by anti-CD3/CD28 stimulation was observed in the presence or absence of TGF- β . Of note, similar to what was seen with primary cells (Fig. 1D-E), anti-CD3/CD28 stimulation reduced *Smad7* mRNA expression in TGF- β -treated Jurkat cells (Fig. 3C). SMAD7 is known to promote degradation of TGF- β R complexes and to inhibit SMAD2/3 phosphorylation (13). These results indicate that TCR signaling hinders a proximal event in TGF- β signaling: the accumulation of phospho-SMAD3.

CD3-CD28 mediated TGF- β inhibition is PKC-dependent

In order to identify components of the TCR signaling cascade that might be responsible for inhibition of the TGF- β pathway, we tested various pharmacological inhibitors on Jurkat cells transfected with the *SBE-Fluc* construct. Cells treated with TGF- β alone produced high amounts of luciferase but concurrent CD3/CD28 stimulation inhibits TGF- β -induced luciferase expression (Fig. 2 and Fig. 4A). We asked whether specific inhibitors could block the effect of CD3/CD28 stimulation and thereby “rescue luciferase expression”. Inhibition of the proximal kinase Lck (by herbimycin A or Lck-i) rescued SBE-mediated luminescence output (Fig. 4A-B). We took advantage of the availability of Jurkat cell lines deficient in Lck activity (J.CaM1.6) or Zap70 protein (Jp116) to validate our pharmacological inhibition data.

In these two cell lines, CD3/CD28 stimulation did not inhibit TGF- β signaling (Fig. 4C), thus confirming that both Lck and Zap70 proximal kinases were necessary for inhibition of TGF- β signaling. We tested inhibitors of numerous downstream targets of Lck and Zap70. Inhibition of AKT, Calcineurin, G α i, Jnk, MAPK, mTOR, NF κ B, PI3K, and Ras had no effect (Fig. 4 A-B). However, inhibition of PKC (by bimIV and Go6976) rescued SBE-mediated luminescence output (Fig. 4A-B). These results suggest that PKC is the downstream target of Lck and Zap70 that is responsible for blocking TGF- β signaling upon TCR stimulation.

PKC θ -dependent inhibition of TGF- β signaling

Two out of eight PKC isotypes expressed in T lymphocytes are involved in TCR signaling: PKC α and PKC θ (36,37). In order to better ascertain a role for PKC and to identify the specific isotype responsible for inhibition of TGF- β signaling, we proceeded with co-immunoprecipitation studies. Our Western blot analyses revealed that TCR signaling hindered a proximal event in TGF- β signaling: the accumulation of phospho-SMAD3 (Fig. 3). Since SMAD3 is phosphorylated by TGF- β R complexes, we precipitated these complexes using an anti-TGF- β RII Ab. As expected, Western blot analysis of co-immunoprecipitated proteins revealed the presence of TGF- β RI and SMAD7 (Fig. 5A), two proteins known to be associated to TGF- β RII. The salient finding was that PKC θ but not PKC α co-immunoprecipitated with TGF- β R complexes. Of note, Lck, also highlighted by our pharmacological inhibitor screen as a potential TGF- β pathway inhibitor (Fig. 4), was not recovered with TGF- β R complexes. Thus only PKC θ was found to be associated to TGF- β R complexes.

We next transfected Jurkat cells with *SBE-Fluc* and one of the following constructs: i) constitutively active (*CA*)-*PKC α* , ii) *CA-PKC θ* , iii) dominant negative (*DN*)-*PKC α* or iv) *DN-PKC θ* . Double-transfected cells were then treated with TGF- β with or without anti-CD3/CD28 stimulation. Induction (*CA*) or inhibition (*DN*) of *PKC α* had no or minimal effects (Fig. 5B). However, in the presence of TGF- β alone, *CA-PKC θ* expression mimicked the effect of CD3/CD28 stimulation and reduced TGF- β signaling (luciferase production) (Fig. 5B). Furthermore, transfection with *DN-PKC θ* abrogated the effect of TCR activation on TGF- β signaling. We conclude that *PKC θ* activation is necessary and sufficient to explain the inhibition of TGF- β signaling upon TCR activation.

CD3-CD28 treatment increases co-localisation of TGF- β Rs with TCRs in lipid rafts

What is the mechanism of action of *PKC θ* ? *PKC θ* has a direct role in NF- κ B and NFAT activation (38,39). However, we reasoned that this effect should not be instrumental in inhibition of TGF- β signaling because inhibition of NF- κ B activity or of calcineurin (the co-activator of NFAT) could not rescue TGF- β signaling in TCR-stimulated Jurkat cells (Fig. 4). Another important role of *PKC θ* is in the internalization and recycling of TCR complexes (40,41). Alike TCR signaling, TGF- β signaling is regulated by receptor internalization (42). We therefore hypothesized that TGF- β R complexes could be internalized along with, or by the same mechanism as, TCRs. We first sought to characterize the plasma membrane distribution of TGF- β Rs treated with TGF- β in the presence or absence of anti-CD3/CD28 stimulation. TCR binding to agonists induces capping of the TCRs that accumulate at one pole of

the cell together with other receptors such as IFN γ R (43,44). Using confocal microscopy we found that following TCR and TGF- β stimulation, TCRs and TGF- β RI accumulated at the same pole of the cell (Fig. 6A). This resulted in a significantly increased co-localisation coefficient between TGF- β RI and TCRs (Fig. 6B). Hence, TCR engagement led to co-polarization of TCRs and TGF- β Rs.

TCRs recruited at one pole of the cell during formation of immunological synapses localize in lipid rich raft (LRR) regions (45). TGF- β R complexes can be found both outside and inside LRR regions and this distribution has been shown to influence TGF- β -mediated signaling (14). Using sucrose gradient fractionation of cell lysates, we compared the content of LRR regions (ganglioside positive) and clathrin positive fractions from Jurkat cells treated with TGF- β with or without CD3/CD28 stimulation. We found that SMAD3 was equally distributed among the two regions, and its distribution did not change upon addition of TCR signaling (Fig. 6C). On the other hand, TCR signaling enriched by 2- to 3-fold the abundance of SMAD7 and TGF- β RI in LRR regions (Fig. 6C-D). Hence, TCR activation led to accumulation of TGF- β RI and the inhibitory SMAD7, but not of SMAD3, in LRR regions. Localisation of TGF- β R complexes in LRR is known to cause degradation of TGF- β Rs and to downregulate TGF- β -mediated signaling (14). Increased physical proximity of TCRs and TGF- β Rs may be instrumental in enhancing interaction between the two signaling pathways, and their localization in lipid rafts might confer similar membrane and internalization dynamics.

TGF- β pathway inhibition by PKC θ depends on lipid raft formation

To directly test the importance of LRR regions in the TCR-mediated inhibition of TGF- β signaling, we used inhibitors of lipid raft and clathrin vesicle formation. Methyl-B-cyclodextrin disrupts lipid rafts while dynasore inhibits dynamin which is essential for clathrin-dependent coated vesicle formation (46). Since lipid raft destabilisation hampers response to TCR agonists, we could not use CD3/CD28 stimulation in the following experiments. Because the effect of TCR signaling on the TGF- β pathway is mediated by PKC θ (Fig. 5), we used CA-PKC θ vector transfection to circumvent the need for surface TCR stimulation. Jurkat cells transfected with *SBE-Fluc* and *CA-PKC θ* constructs were stimulated with TGF- β in the presence of dynasore or methyl-B-cyclodextrin and then assessed for luciferase expression. While dynamin inhibition had no effect, lipid raft disruption totally abrogated the effect of PKC θ on TGF- β signaling (Fig. 6E). These data show that lipid rafts integrity is crucial for the PKC θ -dependent inhibition of TGF- β signaling.

Discussion

The copious amount of TGF- β present in lymphoid organs promotes constitutive TGF- β signaling and keeps naïve T cells in a resting state. This constitutive inhibition of T cell activation could hamper compulsory responses to foreign antigens. Our work shows that strong TCR agonists rapidly suppressed TGF- β signaling in human and mouse CD4⁺ T cells. Stimulation with mAbs to CD3 and CD28 led to a decrease in levels of phospho-SMAD3 with concomitant increase in SMAD7 after 30 min (Fig. 3A), downregulation of TGF- β -induced translation after 1-2 h (Fig. 2C), and decreased expression of TGF- β target genes after 6 to 24 h (Fig. 1D-E). Downregulation of TGF- β signaling was dependent on lipid raft integrity and correlated with co-polarization of TGF- β R and TCR complexes and accumulation of TGF- β RI and inhibitory SMAD7 in LRR regions (Fig. 6). Activation of PKC θ by TCR agonists was necessary and sufficient to explain the inhibition of TGF- β signaling upon TCR activation. Indeed, the inhibition was abrogated by PKC inhibitors (BimIV and Gö6976) and by a dominant negative PKC θ construct and was reproduced by a constitutively active form of PKC θ (Fig. 4 and 5). Our findings are consistent with the fact that PKC θ is a key molecule in modulating T cell activation versus anergy (47) and that PKC θ effects are opposite to those of TGF- β . As PKC θ relays a subset of CD28 signals during T cell activation, absence of PKC θ raises the threshold for T cell activation and facilitates tolerance induction (47-49).

Phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 by activated TGF- β Rs is a pivotal event in the initiation of TGF- β signal transduction (6). We found that TCR activation caused

a rapid and selective decrease in levels of phospho-SMAD3 (Fig. 3). Further studies are needed to understand why levels of phospho-SMAD2 were not affected. Our favorite hypothesis hinges on the differential effect of SARA (Smad anchor for receptor activation) on SMAD2 and SMAD3 (14). SARA anchors SMAD2 but not SMAD3 in clathrin vesicles that do not contain SMAD7 (14,50,51). We therefore postulate that in this way, SARA selectively hinders interactions between SMAD2 and the inhibitory SMAD7 upon TCR activation. Nevertheless, it is clear that SMAD2 and SMAD3 have non-redundant effects and are regulated differently (52). For instance, insulin-like growth factor-I downregulates TGF- β signaling by suppressing phosphorylation of SMAD3 but not SMAD2 (53,54). Furthermore, evidence suggests that regulation of T cell activation versus tolerance is mediated primarily by SMAD3 (12,55). Our data support an emerging model in which TCR signaling hinders SMAD3 activation by inducing recruitment of TGF- β R_s in LRR regions together with inhibitory SMAD7 (Fig. 6). In addition, TCR activation led to a brisk upregulation of SMAD7 protein level (Fig. 3). At later time points after TCR activation, levels of *Smad7* transcripts were decreased both in primary mouse lymphocytes (Fig. 1D-E) and human Jurkat cells, probably because of auto-inhibitory feedback mechanisms. SMAD7 is both a TGF- β inhibitor and a TGF- β transcriptional target. While the SMAD7 protein inhibits TGF- β signaling, decreased TGF- β activity downregulates *Smad7* transcription (56,57). Our hypothesis that SMAD7 is instrumental in inhibition of the TGF- β pathway by TCR agonists is coherent with studies showing that high T cell levels of SMAD7 correlate with inflammation and autoimmunity while downregulation of SMAD7 is associated with tolerance and induction of regulatory T cells (58-61). Furthermore, our model dovetails well with

evidence that internalization of TGF- β Rs located in LRR vesicles leads to SMAD7-dependent degradation of TGF- β Rs and inhibition of SMAD3 phosphorylation (14).

Our work broadens our understanding of the cross-talk occurring between the TCR and TGF- β signaling pathways. TGF- β regulates TCR signaling at many levels. Thus, TGF- β blocks TCR-induced activation of the Tec kinase ITK, calcium ion influx in T cells, and the activation of the transcription factor NFAT (2). The present work shows that strong TCR agonists can free CD4⁺ T cells from constitutive TGF- β signaling. We propose that this process may be of vital importance upon confrontation with microbial pathogens.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. André Veillette for sound advice. We are grateful to the staff of the following core facilities at the Institute for Research in Immunology and Cancer for their outstanding support: animal facility, bio-imaging, flow cytometry, and genomics.

References

1. Kalies, K., M. Blessenohl, J. Nietsch, and J. Westermann. 2006. T cell zones of lymphoid organs constitutively express Th1 cytokine mRNA: specific changes during the early phase of an immune response. *J. Immunol.* 176: 741-749.
2. Li, M. O., and R. A. Flavell. 2008. TGF- β : a master of all T cell trades. *Cell* 134: 392-404.
3. Ge, G., and D. S. Greenspan. 2006. BMP1 controls TGF β 1 activation via cleavage of latent TGF β -binding protein. *J. Cell Biol.* 175: 111-120.
4. Yang, Y. C., E. Piek, J. Zavadil, D. Liang, D. Xie, J. Heyer, P. Pavlidis, R. Kucherlapati, A. B. Roberts, and E. P. Bottinger. 2003. Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 10269-10274.
5. Massagué, J. 2000. How cells read TGF- β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 169-178.
6. Shi, Y., and J. Massague. 2003. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.
7. Massagué, J., J. Seoane, and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19: 2783-2810.
8. Feng, X. H., and R. Derynck. 2005. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 659-693.
9. Dong, M., and G. C. Blobe. 2006. Role of transforming growth factor- β in hematological malignancies. *Blood* 107: 4589-4596.
10. Taylor, I. W., and J. L. Wrana. 2008. SnapShot: The TGF β pathway interactome. *Cell* 133: 378.

11. Letterio, J. J. 2005. TGF- β signaling in T cells: roles in lymphoid and epithelial neoplasia. *Oncogene* 24: 5701-5712.
12. Li, L., Y. Iwamoto, A. Berezovskaya, and V. A. Boussiotis. 2006. A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27^{Kip1} and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance. *Nat. Immunol.* 7: 1157-1165.
13. Kang, J. S., C. Liu, and R. Derynck. 2009. New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function. *Trends Cell Biol.* 19: 385-394.
14. Di Guglielmo, G. M., R. C. Le, A. F. Goodfellow, and J. L. Wrana. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* 5: 410-421.
15. Itoh, S., and D. P. ten. 2007. Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 176-184.
16. Rubtsov, Y. P., and A. Y. Rudensky. 2007. TGF β signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 443-453.
17. Saxena, V., D. W. Lienesch, M. Zhou, R. Bommireddy, M. Azhar, T. Doetschman, and R. R. Singh. 2008. Dual roles of immunoregulatory cytokine TGF- β in the pathogenesis of autoimmunity-mediated organ damage. *J. Immunol.* 180: 1903-1912.
18. Daley, S. R., J. Ma, E. Adams, S. P. Cobbold, and H. Waldmann. 2007. A key role for TGF- β signaling to T cells in the long-term acceptance of allografts. *J. Immunol.* 179: 3648-3654.
19. Baron, C., R. Somogyi, L. D. Greller, V. Rineau, P. Wilkinson, C. R. Cho, M. J. Cameron, D. J. Kelvin, P. Chagnon, D. C. Roy, L. Busque, R. P. Sékaly, and C. Perreault. 2007. Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene expression profiling. *PLoS Med.* 4: e23.
20. Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and . 1992. Targeted disruption of

the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-699.

21. Letterio, J. J., A. G. Geiser, A. B. Kulkarni, H. Dang, L. Kong, T. Nakabayashi, C. L. Mackall, R. E. Gress, and A. B. Roberts. 1996. Autoimmunity associated with TGF- β 1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J. Clin. Invest* 98: 2109-2119.
22. Gorelik, L., and R. A. Flavell. 2000. Abrogation of TGF β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12: 171-181.
23. Li, M. O., S. Sanjabi, and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25: 455-471.
24. Locke, N. R., S. J. Patterson, M. J. Hamilton, L. M. Sly, G. Krystal, and M. K. Levings. 2009. SHIP regulates the reciprocal development of T regulatory and Th17 cells. *J. Immunol.* 183: 975-983.
25. Classen, S., T. Zander, D. Eggle, J. M. Chemnitz, B. Brors, I. Buchmann, A. Popov, M. Beyer, R. Eils, S. Debey, and J. L. Schultze. 2007. Human resting CD4⁺ T cells are constitutively inhibited by TGF β under steady-state conditions. *J. Immunol.* 178: 6931-6940.
26. Li, M. O., Y. Y. Wan, and R. A. Flavell. 2007. T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26: 579-591.
27. Marie, J. C., D. Liggitt, and A. Y. Rudensky. 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor. *Immunity.* 25: 441-454.
28. Blais, M. E., G. Gérard, M. M. Martinic, G. Roy-Proulx, R. M. Zinkernagel, and C. Perreault. 2004. Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* 103: 3102-3110.

29. Blais, M. E., S. Brochu, M. Giroux, M. P. Bélanger, G. Dulude, R. P. Sékaly, and C. Perreault. 2008. Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different. *J. Immunol.* 180: 2299-2312.
30. LeHoux, J. G., G. Dupuis, and A. Lefebvre. 2001. Control of CYP11B2 gene expression through differential regulation of its promoter by atypical and conventional protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* 276: 8021-8028.
31. Lin, A. H., J. Luo, L. H. Mondschein, P. ten Dijke, D. Vivien, C. H. Contag, and T. Wyss-Coray. 2005. Global analysis of Smad2/3-dependent TGF- β signaling in living mice reveals prominent tissue-specific responses to injury. *J. Immunol* 175: 547-554.
32. Giroux, M., E. Yurchenko, J. St-Pierre, C. A. Piccirillo, and C. Perreault. 2007. T regulatory cells control numbers of NK cells and immature dendritic CD8a⁺ cells in the lymph node paracortex. *J. Immunol.* 179: 4492-4502.
33. Caron, É., R. Charbonneau, G. Huppé, S. Brochu, and C. Perreault. 2005. The structure and location of SIMP/STT3B account for its prominent imprint on the MHC I immunopeptidome. *Int. Immunol.* 17: 1583-1596.
34. Varelas, X., R. Sakuma, P. Samavarchi-Tehrani, R. Peerani, B. M. Rao, J. Dembowy, M. B. Yaffe, P. W. Zandstra, and J. L. Wrana. 2008. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 10: 837-848.
35. Abraham, R. T., and A. Weiss. 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 301-308.
36. Baier, G. 2003. The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol. Rev.* 192: 64-79.
37. Tan, S. L., and P. J. Parker. 2003. Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem. J.* 376: 545-552.

38. Sun, Z., C. W. Arendt, W. Ellmeier, E. M. Schaeffer, M. J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P. L. Schwartzberg, and D. R. Littman. 2000. PKC- η is required for TCR-induced NF- κ B activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404: 402-407.
39. Pfeifhofer, C., K. Kofler, T. Gruber, N. G. Tabrizi, C. Lutz, K. Maly, M. Leitges, and G. Baier. 2003. Protein kinase C η affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J. Exp. Med.* 197: 1525-1535.
40. Minami, Y., L. E. Samelson, and R. D. Klausner. 1987. Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262: 13342-13347.
41. von, E. M., M. W. Nielsen, C. M. Bonefeld, L. Boding, J. M. Larsen, M. Leitges, G. Baier, N. Odum, and C. Geisler. 2006. Protein kinase C (PKC) α and PKC η are the major PKC isotypes involved in TCR down-regulation. *J. Immunol.* 176: 7502-7510.
42. Chen, Y. G. 2009. Endocytic regulation of TGF- β signaling. *Cell Res.* 19: 58-70.
43. Maldonado, R. A., D. J. Irvine, R. Schreiber, and L. H. Glimcher. 2004. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* 431: 527-532.
44. Maldonado, R. A., M. A. Soriano, L. C. Perdomo, K. Sigrist, D. J. Irvine, T. Decker, and L. H. Glimcher. 2009. Control of T helper cell differentiation through cytokine receptor inclusion in the immunological synapse. *J. Exp. Med.* 206: 877-892.
45. Burack, W. R., K. H. Lee, A. D. Holdorf, M. L. Dustin, and A. S. Shaw. 2002. Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J. Immunol.* 169: 2837-2841.

46. Chen, C. L., W. H. Hou, I. H. Liu, G. Hsiao, S. S. Huang, and J. S. Huang. 2009. Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGF β signaling and responses. *J. Cell Sci.* 122: 1863-1871.
47. Berg-Brown, N. N., M. A. Gronski, R. G. Jones, A. R. Elford, E. K. Deenick, B. Odermatt, D. R. Littman, and P. S. Ohashi. 2004. PKC ζ signals activation versus tolerance in vivo. *J. Exp. Med.* 199: 743-752.
48. Wang, L., Z. Xiang, L. L. Ma, Z. Chen, X. Gao, Z. Sun, P. Williams, R. S. Chari, and D. P. Yin. 2009. Deficiency of protein kinase C- ζ facilitates tolerance induction. *Transplantation* 87: 507-516.
49. Valenzuela, J. O., C. Iclozan, M. S. Hossain, M. Prlic, E. Hopewell, C. C. Bronk, J. Wang, E. Celis, R. W. Engelman, B. R. Blazar, M. J. Bevan, E. K. Waller, X. Z. Yu, and A. A. Beg. 2009. PKC ζ is required for alloreactivity and GVHD but not for immune responses toward leukemia and infection in mice. *J. Clin. Invest* 119: 3774-3786.
50. Tsukazaki, T., T. A. Chiang, A. F. Davison, L. Attisano, and J. L. Wrana. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor. *Cell* 95: 779-791.
51. Goto, D., H. Nakajima, Y. Mori, K. Kurasawa, N. Kitamura, and I. Iwamoto. 2001. Interaction between Smad anchor for receptor activation and Smad3 is not essential for TGF- β /Smad3-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 1100-1105.
52. Brown, K. A., J. A. Pietenpol, and H. L. Moses. 2007. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF- β signaling. *J. Cell Biochem.* 101: 9-33.
53. Song, K., S. C. Cornelius, M. Reiss, and D. Danielpour. 2003. Insulin-like growth factor-I inhibits transcriptional responses of transforming growth factor- β by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent suppression of the activation of Smad3 but not Smad2. *J. Biol. Chem.* 278: 38342-38351.

54. Remy, I., A. Montmarquette, and S. W. Michnick. 2004. PKB/Akt modulates TGF- β signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat. Cell Biol.* 6: 358-365.
55. McKarns, S. C., R. H. Schwartz, and N. E. Kaminski. 2004. Smad3 is essential for TGF- β 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J. Immunol.* 172: 4275-4284.
56. Nakao, A., M. Afrakhte, A. Moren, T. Nakayama, J. L. Christian, R. Heuchel, S. Itoh, M. Kawabata, N. E. Heldin, C. H. Heldin, and D. P. ten. 1997. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 389: 631-635.
57. Nagarajan, R. P., J. Zhang, W. Li, and Y. Chen. 1999. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J. Biol. Chem.* 274: 33412-33418.
58. Monteleone, G., A. Kumberova, N. M. Croft, C. McKenzie, H. W. Steer, and T. T. MacDonald. 2001. Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest* 108: 601-609.
59. Kanamaru, Y., A. Nakao, M. Mamura, Y. Suzuki, I. Shirato, K. Okumura, Y. Tomino, and C. Ra. 2001. Blockade of TGF- β signaling in T cells prevents the development of experimental glomerulonephritis. *J. Immunol.* 166: 2818-2823.
60. Mizobuchi, T., K. Yasufuku, Y. Zheng, M. A. Haque, K. M. Heidler, K. Woods, G. N. Smith, Jr., O. W. Cummings, T. Fujisawa, J. S. Blum, and D. S. Wilkes. 2003. Differential expression of Smad7 transcripts identifies the CD4⁺CD45RC^{high} regulatory T cells that mediate type V collagen-induced tolerance to lung allografts. *J. Immunol.* 171: 1140-1147.
61. Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in

CD4⁺CD25⁻⁻⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.* 172: 5149-5153.

62. Lin, J., and A. Weiss. 2001. T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.* 114: 243-244.

Footnotes

¹ The study was supported by grants from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Groupe de recherche transdisciplinaire sur l'étude des prédictors du rejet) and the Leukemia & Lymphoma Society of Canada. MG and JSD are supported by the Cole Foundation and the Canadian Institutes for Health Research, respectively. MJH is the holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration of the Université de Montréal. CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology. The Institute for Research in Immunology and Cancer is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canada Foundation for Innovation, and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

² Abbreviations used in this paper: CA, constitutively active; DN, dominant negative; LRR, lipid rich raft; FLuc, firefly luciferase; qPCR, quantitative PCR; SBE, SMAD binding element; TGF- β R, TGF- β receptor;

Figure Legends

FIGURE 1. T cell activation inhibits TGF- β signaling in primary mouse CD4⁺ T cells. A-B) TCR stimulation inhibits SMAD2/3 accumulation in the nucleus. C57BL/6 mouse CD4⁺ T cells were stimulated or not with TGF- β for 1 h, then treated with mAbs to CD3 and CD28 or PBS for 30 min. Cells were fixed and stained with anti-SMAD2/3 Ab (red) followed by nuclear staining with DAPI (blue) and analyzed by confocal microscopy (63x objective). Cells with no or minimal accumulation of SMAD2/3 in the nucleus have a red cytoplasm and blue nucleus; high SMAD2/3 activity (accumulation in the nucleus) leads to colocalization of red and blue (magenta). A) Representative cells (white arrows in left hand panels) are enlarged in right hand panels. B) Global results based on analysis of > 160 cells/condition are depicted (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). C) TCR stimulation inhibits SBE-mediated luciferase translation. Relative luciferase activity in CD4⁺ T cells from SBE-Fluc mice stimulated or not with TGF- β for 1 h, then treated with mAbs to CD3 and CD28 or PBS for 4 h ($n = 3$, * $p < 0.05$). D-E) TCR stimulation downregulates expression of TGF- β -related transcripts. qPCR analysis of sorted naïve CD4⁺ T cells normalized to *Hprt* levels. Cells were stimulated with TGF- β for 1 h, then treated with mAbs to CD3 and CD28 for 5 h (D) or 23 h (E). Results are expressed as a percentage to gene expression in control condition (black horizontal line at 100%). In the control condition, cells were treated neither with TGF- β nor mAbs to CD3 and CD28 ($n = 3$, * $p < 0.05$).

FIGURE 2. T cell activation inhibits TGF- β -mediated signaling in a time- and dose-dependent manner. A-C) Jurkat cells were transiently transfected with *SBE-FLuc* reporter vector or pCDNA3.1-Fluc control vector. A) Jurkat cells were stimulated or not with TGF- β for 1 h, then treated with mAbs to CD3 (1 μ g/ml) and CD28 (0.5 μ g/ml) or PBS for 5 h. Histograms represent the ratio of luciferase activity in cells transfected with SBE-FLuc vs. pCDNA3.1-Fluc vector (n = 3, * p < 0.05). B,C) The SBE-FLuc/pCDNA3.1-Fluc luminescence ratio of cells treated only with TGF- β was fixed at 100% and used to normalize the relative luminescence in cells treated with mAbs to CD3 and CD28. B) Jurkat cells were treated as in (A) except that doses of mAb to CD3 ranged from 0 to 2.5 μ g/ml. C) Jurkat cells were treated as in (A) except that mAbs to CD3 and CD28 were added for 0 to 5 h (n = 3, * p < 0.05).

FIGURE 3. TCR stimulation increases expression of SMAD7 protein and decreases levels of phosphorylated SMAD3. A-B) Jurkat cells were treated or not with TGF- β for 1 h. Abs to CD3 and CD28 were added for 30 min where indicated. Cell lysates were immunoblotted with the indicated Abs. A) One representative out of 3 independent experiments is shown. B) Densitometric analysis of Western blots was conducted using cellular actin as a relative internal standard. Histograms represent the mean and SD for three independent experiments (* p < 0.05). C) qPCR analysis of *Smad7* mRNA expression in Jurkat cells normalized to *Hprt* levels. Cells were stimulated with TGF- β for 1 h, then treated or not with mAbs to CD3 and CD28 for 5 h. In the control condition, cells were treated neither with TGF- β nor mAbs to CD3 and CD28 (n = 3, * p < 0.05).

FIGURE 4. CD3-CD28 mediated TGF- β inhibition is PKC-dependent. A-B) We tested various pharmacological inhibitors of TCR signaling in *SBE-Fluc*-transfected Jurkat cells treated with TGF- β and mAbs to CD3 and CD28. Inhibitors, their target and concentration used are listed in Table I. In this assay, inhibitors that block the effect of CD3/CD28 stimulation rescue luciferase expression. A) Schematic representation of the TCR signaling pathway (adapted from (62)). Components of the TCR signaling pathway are circled in green when their inhibition rescued luciferase expression, and in red when it did not. B) Results from three independent experiments with pharmacological inhibitors of TCR signaling (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$). C) *SBE-Fluc*-transfected Jurkat cells (wild type clone E6.1; Lck activity deficient J.CaM1.6 or ZAP70 deficient Jp116) were treated with TGF- β and mAbs to CD3 and CD28 ($n = 3$).

FIGURE 5. TCR-mediated inhibition of TGF- β signaling is PKC θ -dependent. A) PKC θ interacts with TGF- β RII. Jurkat cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-TGF- β RII Ab followed by Western blotting (WB) with the indicated Abs. Input total lysate (right) and immunoprecipitated (left) lanes were revealed in the same conditions. One representative out of 3 independent experiments is shown. Numbers depict representative densitometry normalized to the densitometry of total lysates from untreated cells. B) Relative luciferase activity in Jurkat cells transfected with *SBE-Fluc* and one of the following vectors: CA-PKC α , DN-PKC α , CA-PKC θ , DN-PKC θ , or empty control vector. Cells expressing a CA-PKC or empty vector were treated for 6 h with TGF- β , and cells expressing a DN-PKC or empty vector were

treated with TGF- β for 1 h, then stimulated with mAbs to CD3 and CD28 for 5 h (n = 4, * p < 0.05).

FIGURE 6. TCR stimulation induces co-polarization of TCRs and TGF- β R in lipid rafts. A-B) Jurkat cells were stimulated with TGF- β for 1 h and then treated with mAbs to CD3 and CD28 or PBS for 30 min. Cells stained with Abs to TCR (red), TGF- β RI (green) and DAPI (blue) were analyzed by confocal microscopy (100x objective) (n = 3, * p < 0.05). Global evaluation of TCR/TGF- β R colocalization is depicted in (B). C-D) TCR stimulation induces accumulation of TGF- β RI and SMAD7, but not SMAD3, in LRR regions. Jurkat cell lysates were fractionated on a sucrose gradient and 0.5 to 1 ml fractions were blotted (WB) with the indicated Abs. Eleven fractions were loaded (F1 to F11), F1 being the top and F11 the bottom fraction. Cells were stimulated with TGF- β for 1 h and then treated or not with mAbs to CD3 and CD28 for 30 min. C) Western blots from one representative out of 5 experiments are shown. Fold enrichment represents the ratio of the densitometric intensity in LRR fractions relative to the densitometric intensity in clathrin positive regions. D) Histograms depict the proportion of LRR-associated protein in treated relative to untreated cells (n = 4, * p < 0.05). (E) Lipid raft disruption restores TGF- β -dependent luciferase activity. Luciferase activity in Jurkat cells transfected with SBE-Fluc and CA-PKC θ (black bars) or empty vector (gray bar). Cells were treated for 6 h with TGF- β in the presence of dynasore (80 μ M), M β CD (1 mM) or DMSO (n = 4, * p < 0.05).

Table I

Table I. Pharmacological inhibitors of TCR signaling used in this work

Reagent	Main target	Dose used	Manufacturer
Akt inhibitor IV (Akt-iIV)	AKT	1 μ M	Calbiochem
bisindolylmaleimide IV (BimIV)	PKC and PKA	100 nM	Calbiochem
calcineurin autoinhibitory peptide (CaN-AIP)	Calcineurin	50 μ M	Calbiochem
Go6976	PKC	5 μ M	Calbiochem
GW5074	RAF	20 nM	Sigma-Aldrich
Herbimycin A	LCK	5 μ M	Calbiochem
Lck inhibitor (Lck-i)	LCK	25 nM	Calbiochem
ly294002	PI3K	10 μ M	Calbiochem
NF- κ B activation inhibitor (NF κ B-i)	NF- κ B	20 nM	Calbiochem
PD98059	MEKK	25 μ M	Calbiochem
Pertussis toxin	G α i	100 ng/ml	Sigma-Aldrich
rapamycin	mTOR	200 nM	Sigma-Aldrich
SB203580	p38	5 μ M	Calbiochem
Sp600125	JNK	100 nM	Calbiochem
U0126	MEK1 and MEK2	25 μ M	Calbiochem
wortmannin	PI3K	100 nM	Calbiochem

Figure 1

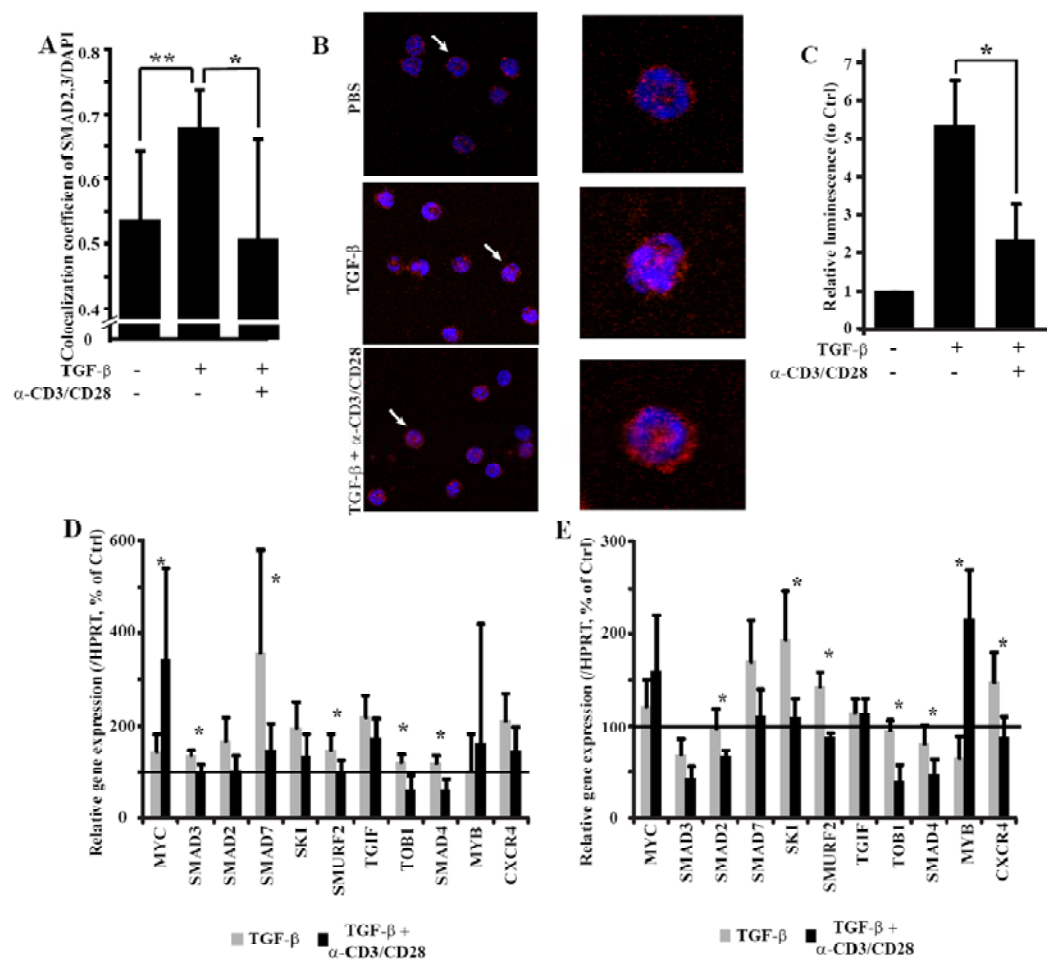


Figure 2

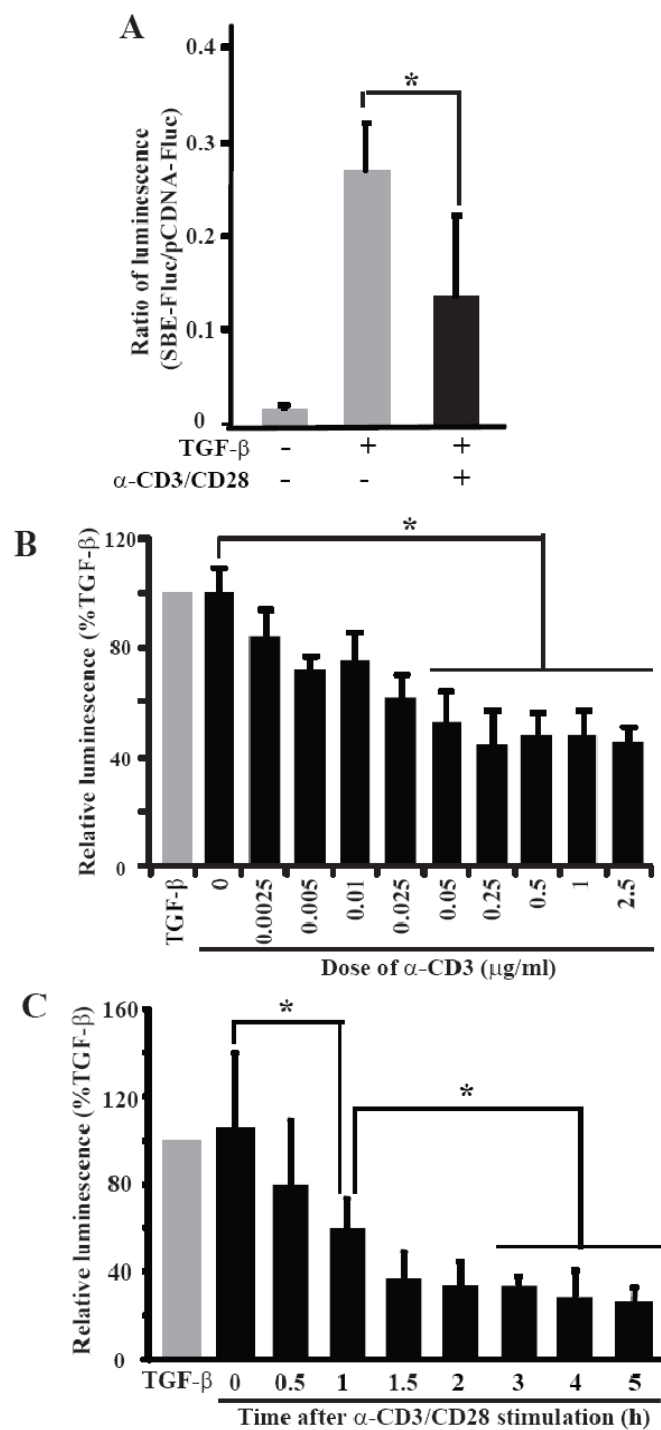


Figure 3

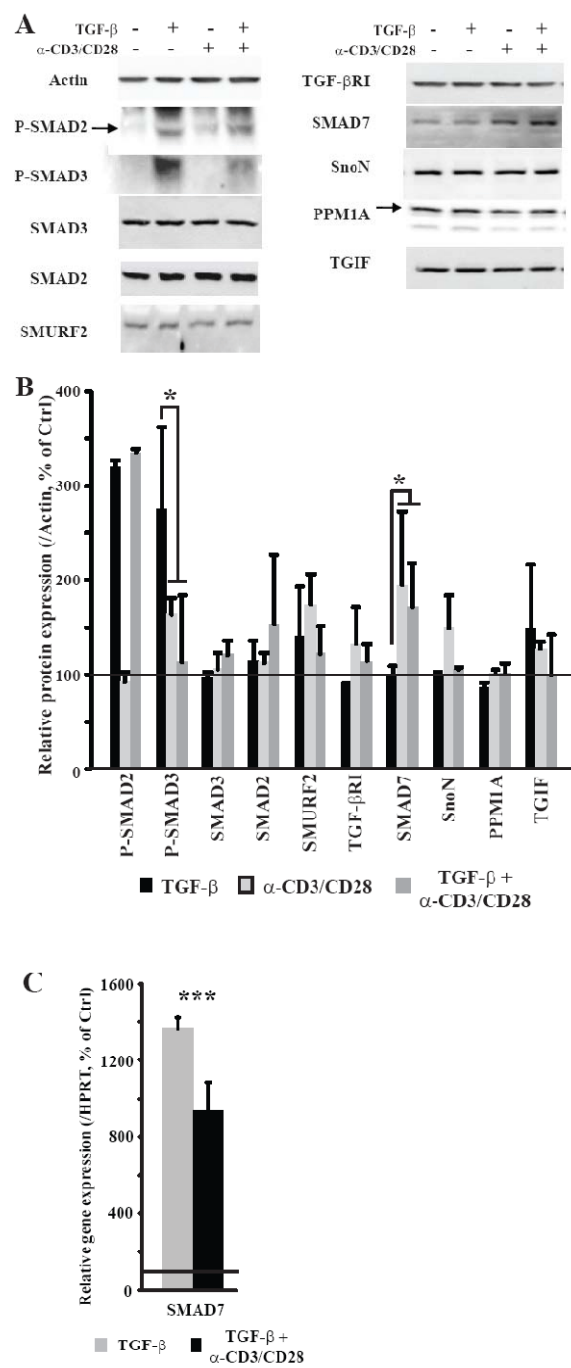


Figure 4

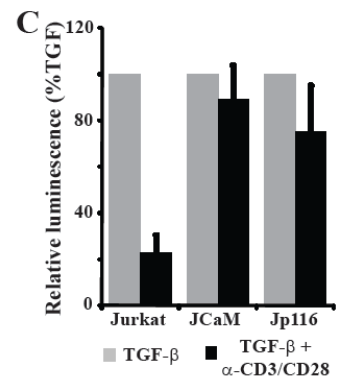
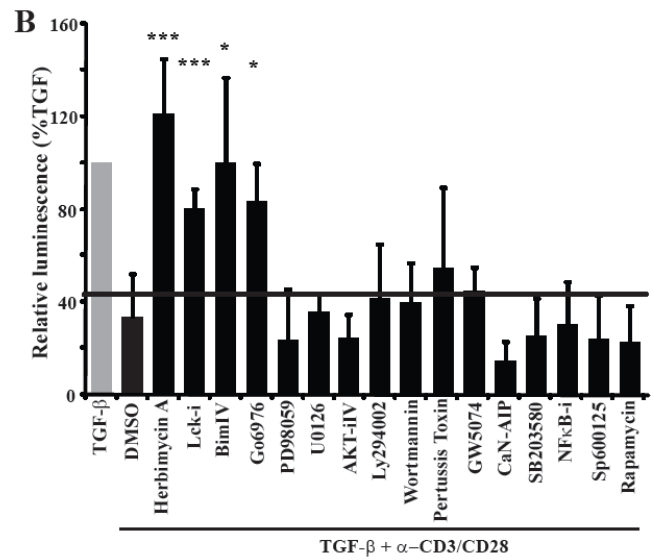
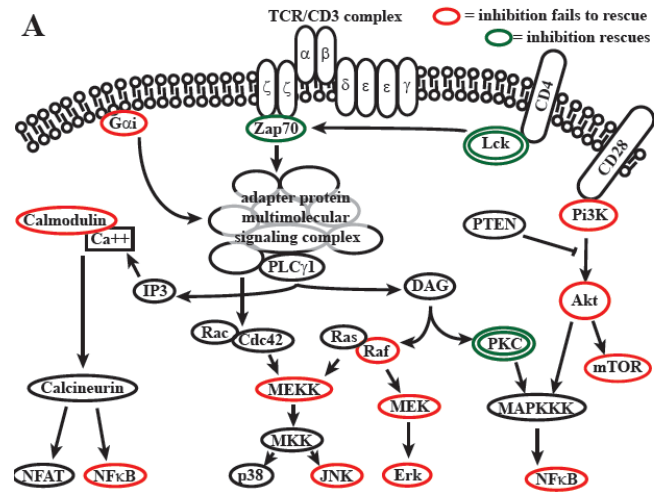


Figure 5

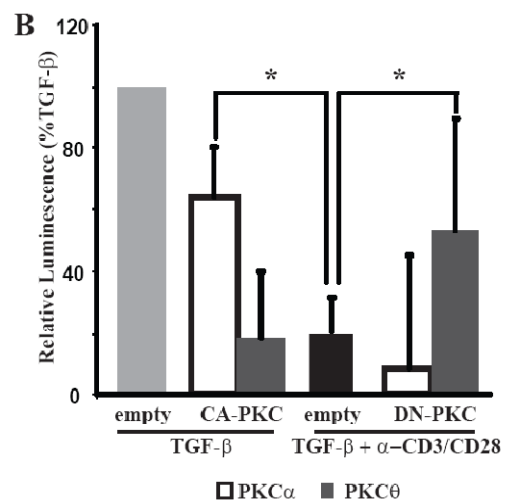
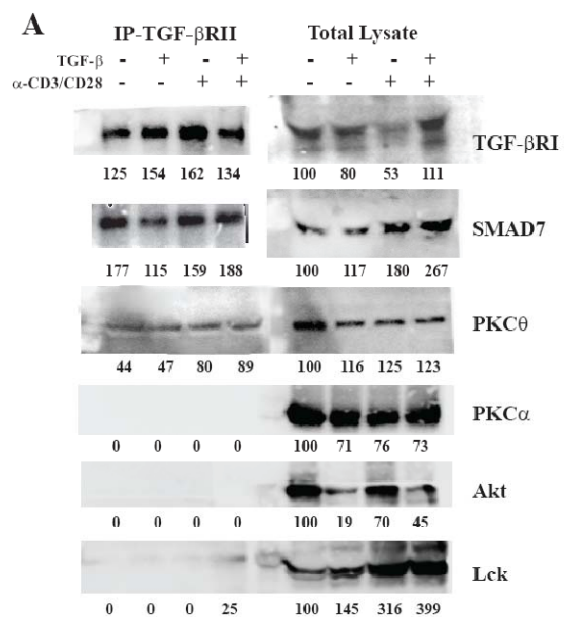
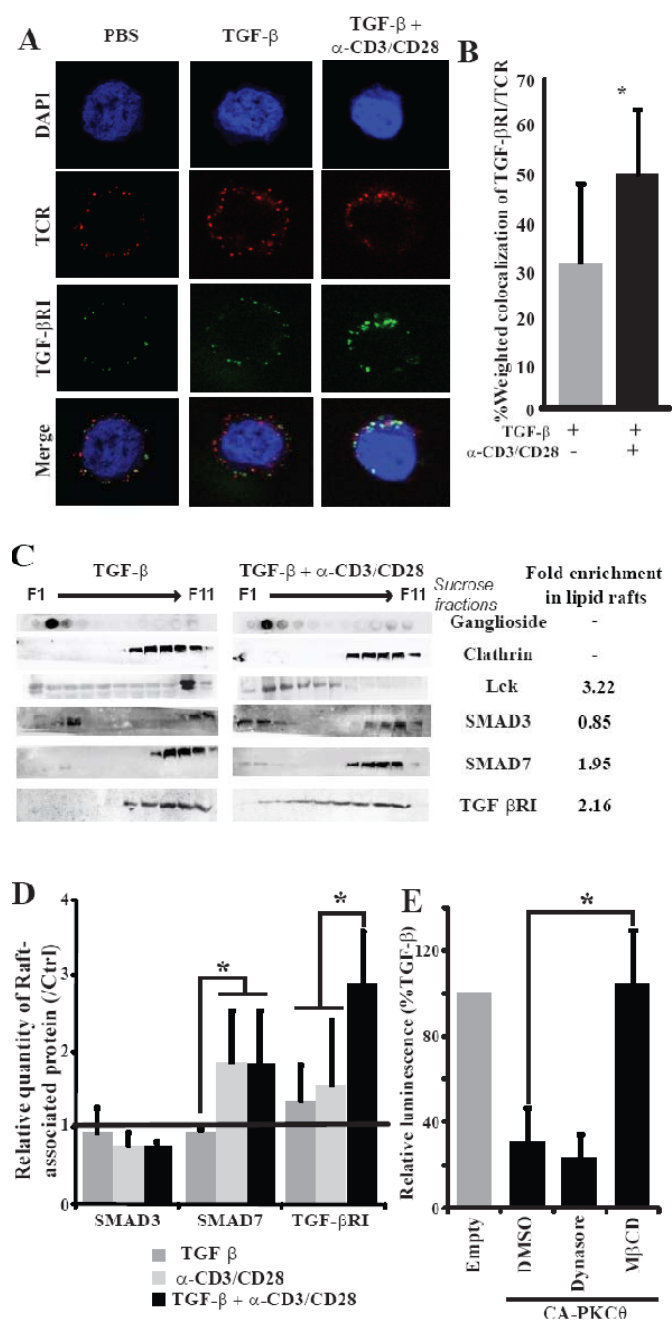
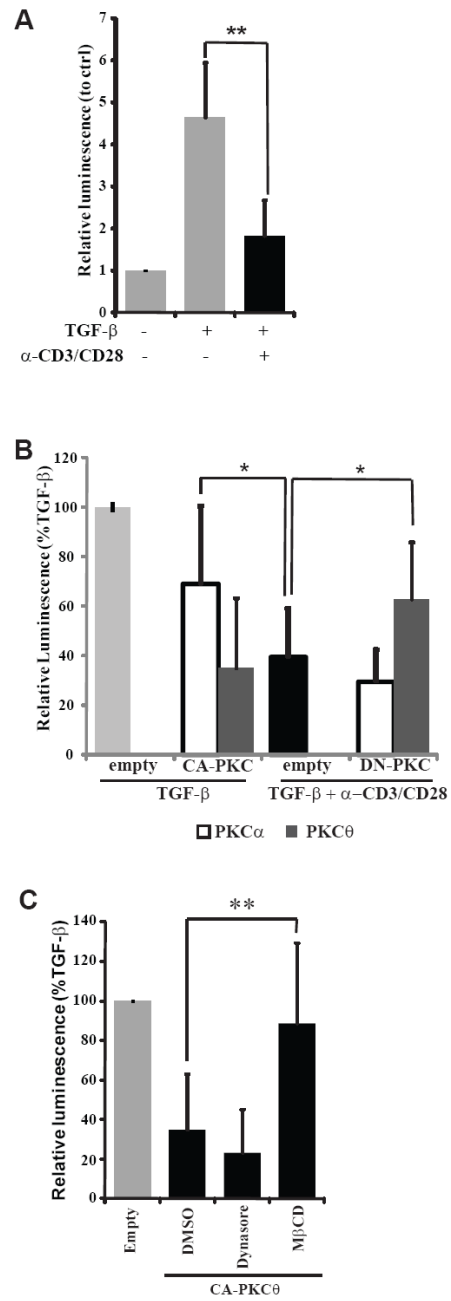


Figure 6



Supplemental Data 1



6.4-Annexe I

Données non-publiées dont toute l'interprétation à été faite par **Delisle JS.**

Devis expérimentaux : Delisle JS., Perreault C. et Giroux M.

Conseils techniques et scientifiques: Wilhelm B., Landry JR., Lemieux S.,
Boucher G.

Assistance technique : Landry JR., Boucher G.

Tous de l'IRIC, Université de Montréal

Annexe I

Introduction

Les articles II et III soulignent plusieurs aspects fondamentaux de la voie signalétique du TGF- β et de SMAD3 dans la tolérance. Nos données et nos souris montrent clairement que SMAD3 a un rôle dans le contrôle de la réaction immunitaire en agissant sur les lymphocytes T et chez des sous-types de cellules myéloïdes, notamment les neutrophiles. Ainsi, les souris maintenues dans les conditions libres de pathogènes et qui ne souffrent pas d'auto-immunité en l'absence de SMAD3, sont de très « dangereuses » donneuses de cellules hématopoïétiques. De plus, on a déjà montré que ces mêmes souris développent des carcinomes intestinaux si infectées par *Helicobacter pylori* suggérant fortement que SMAD3 contribue à limiter la carcinogénèse amenée par une inflammation chronique¹. Pourtant, l'activité de SMAD3 est présente dans les cellules quiescentes chez l'humain² et de nombreuses études démontrent un rôle important de SMAD3 en immunité (Tableau II, point 4.3.2 de cette thèse). Alors, il faut envisager sérieusement que les rôles fondamentaux de SMAD3 sont de prévenir ou limiter la réponse immunitaire, particulièrement dans des contextes de forte stimulation (infections, alloantigènes).

Les données des articles II et III nous laissent croire que SMAD3 contribue à élever le seuil d'activation des lymphocytes T CD4. En effet, lorsque SMAD3 est absent, la proportion de lymphocytes CD4 naïfs qui entrent en cycle après stimulation du TCR et de CD28 est plus grande. La cinétique de prolifération par contre n'est pas affectée par SMAD3 (Article II, Figure 1A et Supplemental Figure 2). De plus, l'article III suggère très fortement que la baisse de la transcription SMAD-dépendante chez les cellules quiescentes dépend de l'inhibition active de SMAD3 lors des étapes précoces de l'activation des lymphocytes T suite à une stimulation par le TCR.

Nous avons donc élaboré l'hypothèse suivante : SMAD3 contrôle la tolérance des lymphocytes T CD4 en modulant la transcription de gènes pouvant ou bien augmenter le seuil d'activation des lymphocytes T alors qu'ils sont quiescents, ou bien limiter les impacts précoces d'une signalisation via le TCR. Notre but était

d'identifier des gènes candidats ou des groupes de gènes reliés à des fonctions biologiques pouvant moduler ainsi la tolérance chez les lymphocytes T CD4.

Méthodes et devis

Des lymphocytes T CD4 naïfs ($\text{TRC}\beta^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-\text{CD62L}^+\text{CD44}^-$) provenant de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour le gène SMAD3 (SMAD3-KO) de la même colonie (*littermates*) ont été enrichis suite à une déplétion par billes anti-CD19 et anti-CD8 (Miltenyi), triées et mises en culture dans un milieu sans-sérum (X-Vivo 15, BioWhittaker) à une concentration de 10^6 par ml pendant 6 heures. Ces cellules ont été soumises à trois conditions; 1) sans TGF- β (retrait de la signalisation tonique), 2) avec stimulation par TGF- β à une concentration de 2.5ng/ml et 3) avec stimulation par TGF- β et anti-CD3/28 (Figure 1). Après 6 heures, les cellules ont été récoltées et l'ARN extrait (Qiagen mini-kit). Chaque réplica biologique était composé d'ARN provenant d'au moins deux souris. L'ARN de trois réplica biologiques par condition a été ensuite converti en cDNA, marqué et hybridé sur des micro-puces Nimblegen 385K (Nimblegen). Les signaux bruts ont été normalisés par Nimblescan (Nimblegen) et les données traitées par LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*). Une différence d'expression de 1.5 fois entre les groupes WT et SMAD3-KO, ainsi qu'une valeur de p de moins de 0.05 furent retenues pour identifier les gènes différentiellement exprimés. La recherche des fonctions des gènes identifiés a été exécutée avec BioHarvester et NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Les analyses de regroupements fonctionnels en classes de gènes ont été faites par DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*)³ et GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*)⁴ en se basant sur la classification GO (*Gene Ontology*) et les bases de données KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

Résultats et discussion

Peu de rôles transcriptionnels non-redondants de SMAD3 en l'absence de TGF- β

Nous avons déterminé qu'une incubation de 6 heures serait suffisante pour obtenir à la fois une forte induction de la voie TGF- β et TCR in vitro (5^e et article III). Notre devis nous permet d'observer les rôles non-redondants de SMAD3 dans trois

conditions. La figure 2 montre la distribution des transcrits identifiés comme étant différentiellement exprimés. Deux valeurs par condition et par génotype sont montrées; le nombre de transcrits uniques (la micro-puce contient parfois plusieurs représentations *-feature-* du même gène) et parmi ces transcrits, le nombre de transcrits pour lesquels on a démontré l'existence d'une protéine dont on connaît la (ou une des) fonction. La première conclusion que nous pouvons tirer de ces données est qu'en l'absence de TGF- β , les lymphocytes T CD4 des deux génotypes montrent peu de différences, surtout au niveau des transcrits de gènes dont la fonction est connue. Ceci va de pair avec le fait que très peu de kinases ont été identifiées comme pouvant remplacer le complexe TGF- β R dans l'activation de SMAD3^{6,7}. Cependant, en présence de TGF- β , SMAD3 module les niveaux de plusieurs transcrits. Cette différence est toutefois atténuée lorsqu'une stimulation du TCR est surimposée.

SMAD3 module les niveaux de transcrits de plusieurs gènes « immunitaires »

Parmi les gènes dont l'ARN messager est différentiellement exprimé, nous trouvons néanmoins plusieurs régulateurs ou acteurs de l'immunité. De façon générale, on peut même avancer que les gènes dont l'expression serait favorisée par SMAD3 sont davantage des « immuno-régulateurs » que des « immuno-stimulants » (Figure 3). La réciproque, c'est-à-dire la répression de gènes stimulant la réponse immunitaire par SMAD3, semble aussi se vérifier. Quelques gènes connus comme ayant une fonction dans le système immunitaire indépendante de la régulation de la réponse immunitaire comme telle (ex : ontogénie des cellules immunitaires) ont aussi été identifiés. Bien que la plupart de ces gènes aient été évalués dans des contextes expérimentaux précis et différents du nôtre, la ségrégation est frappante. Toutefois, ces catégories comportent une large part de subjectivité, car elles sont basées sur une interprétation par l'auteur de la littérature scientifique. Une liste des gènes pouvant aider à expliquer l'effet tolérogène de SMAD3 est donnée à la figure 3. Notons parmi les régulateurs négatifs de l'activation T, dont l'expression est augmentée par SMAD3, les facteurs de transcription FOXO3a et c-Maf ainsi que la chaîne alpha du récepteur de l'IL-10 (IL10Ra). À l'opposé, des régulateurs positifs de l'activation T potentiellement réprimés par SMAD3, soulignons la présence de la calcineurine (Ppp3Ca).

SMAD3 contrôle la transcription de plusieurs processus plausiblement reliés à la tolérance

L'approche de génomique fonctionnelle que nous avons choisie nous permet également de rechercher des régulateurs de l'immunité par une approche non-biaisée. En effet, plusieurs gènes que nous avons identifiés pourraient avoir un rôle dans le contrôle de la réactivité des lymphocytes T CD4, même si une telle fonction n'a jamais été directement validée auparavant. Nous ne parlerons pas de ces gènes candidats dans cet annexe, mais décrirons plutôt comment d'une manière non-biaisée nous avons pu identifier des groupes de gènes dont l'expression coordonnée pourrait nous indiquer quels processus biologiques sont susceptibles d'être influencés par l'axe TGF- β /SMAD3. Dans un premier temps, nous avons sélectionné la liste de tous les transcrits différentiellement exprimés suite à une exposition au TGF- β et soumis cette liste à l'algorithme DAVID, à qui nous avons demandé d'identifier les voies (*KEGG pathways*) et catégories fonctionnelles (*GO terms*) dans lesquelles la présence de nos gènes différentiellement exprimés était enrichie. Dans un second temps, nous avons utilisé l'outil GSEA qui n'utilise pas de liste de gène différentiellement exprimés, mais plutôt la hiérarchie d'expression. C'est-à-dire que l'algorithme vérifie si un gène appartenant à un groupe de gènes (*Gene set*) est davantage exprimé dans une condition plutôt que dans une autre. Si plusieurs gènes du *Gene set* se trouvent à être davantage exprimés dans une condition plutôt qu'une autre, même si la différence pour chaque gène est petite, l'algorithme le signalera. Cette façon de faire permet de voir les choses de façon globale (par exemple, une variation de 20% dans tous les gènes régulant une voie métabolique passerait inaperçue si on décide d'analyser seulement les gènes dont l'expression différentielle est de 1.5 ou 2 fois, pourtant l'impact d'une variation subtile mais plus généralisée pourrait s'avérer déterminante pour cette voie métabolique). Le but était d'explorer la possibilité que des sous-groupes de gènes parmi les transcrits différentiellement exprimés entre les cellules WT et SMAD3-KO, appartiennent aux mêmes catégories fonctionnelles ou voies. Cette démarche s'inscrivait dans une recherche de cohérence ou de synexpression dans les programmes transcriptionnels modulés par SMAD3.

Le tableau I résume nos résultats les plus significatifs. De façon globale, on peut dire que les processus identifiés ne sont pas directement reliés à l'immunité (sauf peut-être « diabète de type I » chez les SMAD3-KO pour qui l'algorithme a identifié un enrichissement de gènes reliés à l'IL-12 et IFN- γ). Cependant, il est devenu clair au cours des dernières années que le contrôle des voies métaboliques est déterminant dans la physiologie de l'activation immunitaire⁸. Aussi la voie du calcium (identifiée par DAVID et GSEA) joue un rôle fondamental dans les étapes précoces de l'activation^{9,10}. De plus, les processus liés au cytosquelette et aux interactions inter-cellulaires ainsi qu'au transport vésiculaire et à la signalisation par les neurotransmetteurs sont tous des processus susceptibles d'orienter la réponse immunitaire¹¹⁻¹⁴. Les analyses ont aussi été faites pour la condition de stimulation simultanée TGF- β et TCR, mais les différences étant plus petites, un peu moins de processus ont été identifiés et ces résultats ne seront pas présentés ici.

Perspectives

Notre objectif était de cerner les effets transcriptionnels de SMAD3 dans différents contextes, mais principalement lors de la quiescence sous l'action du TGF- β et à l'interface entre la quiescence et les phases précoces de l'activation T. Nos analyses ont permis d'identifier au niveau individuel de nombreux gènes pouvant influencer la tolérance d'une façon SMAD3-dépendante. Cependant, c'est au niveau des processus que s'orientera la suite des choses dans un premier temps. En effet, nous avons identifié que SMAD3 influençait la transcription de gènes impliqués dans les processus métaboliques et calciques. Ces deux voies sont liées dans l'activation précoce des lymphocytes T et leur modulation pourrait altérer le seuil et l'ampleur de l'activation. Les processus métaboliques plus « transcrits » chez les cellules WT (par exemple *mTOR signaling pathway* et *Insulin signaling pathway*) ont été identifiés par GSEA parce que des transcrits de gènes stimulateurs et inhibiteurs de ces voies étaient plus exprimés chez les cellules WT. Parmi les activateurs notons: AKT1, AKT2, et les unités clés de PI3K; PIK3CB et PIK3R5. Par contre, les régulateurs négatifs centraux de ces voies étaient aussi sur-représentés (Tuberous Sclerosis 2 – TSC2, les deux unités catalytiques d'AMP Kinase, PRKAA1 et PKRAA2 ainsi qu'EIF4-binding protein 1)¹⁵ (données non-montrées). Ainsi seule l'expérimentation

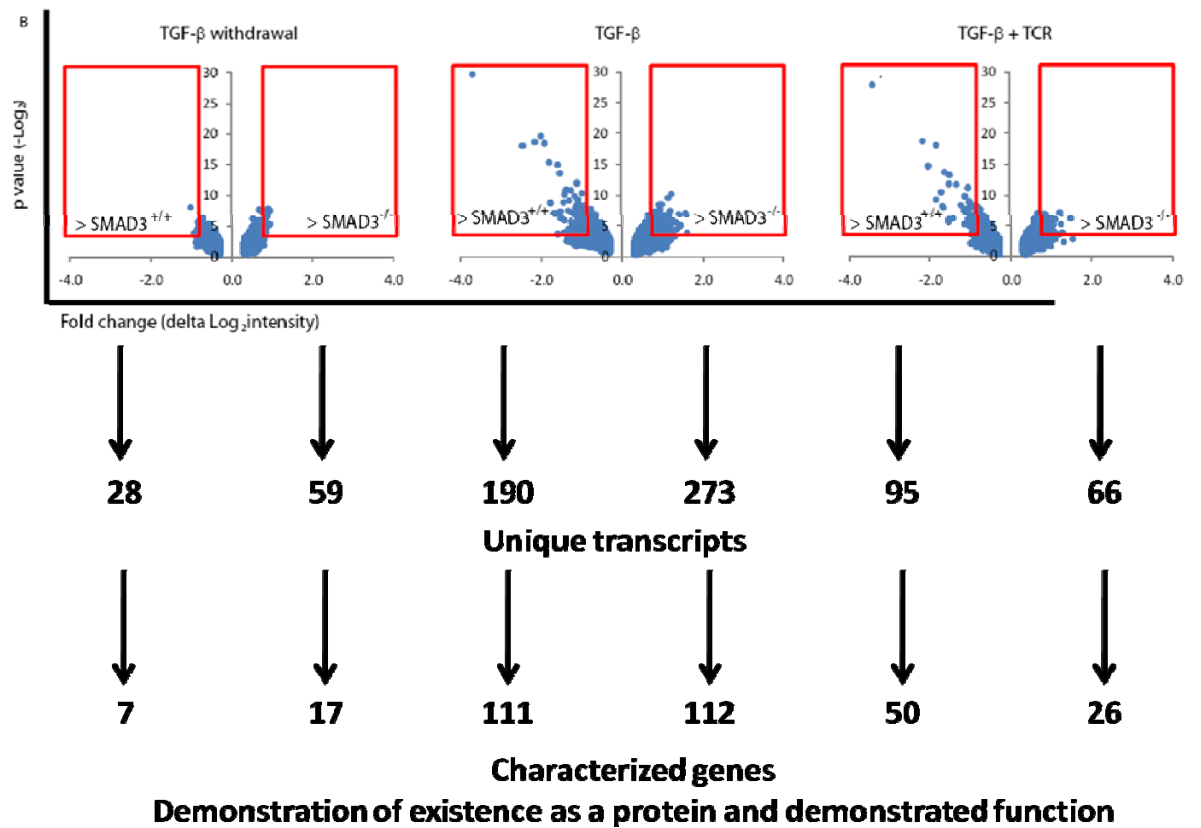
directe nous permettra de savoir si l'activité de ces voies est augmentée, diminuée ou inchangée par la présence de SMAD3. Nous sommes à élaborer les devis visant à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'axe TGF- β /SMAD3 contrôlerait la tolérance via une modulation du métabolisme et des flux calciques. Une mise en contexte plus détaillée de ces processus est incluse dans la section discussion de cette thèse.

Références

1. Maggio-Price L, Treuting P, Zeng W, Tsang M, Bielefeldt-Ohmann H, Iritani BM. Helicobacter infection is required for inflammation and colon cancer in SMAD3-deficient mice. *Cancer Res.* 2006;66:828-838.
2. Classen S, Zander T, Eggle D, et al. Human resting CD4+ T cells are constitutively inhibited by TGF beta under steady-state conditions. *J Immunol.* 2007;178:6931-6940.
3. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44-57.
4. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:15545-15550.
5. Iwashima M. Kinetic perspectives of T cell antigen receptor signaling. A two-tier model for T cell full activation. *Immunol Rev.* 2003;191:196-210.
6. Zhu S, Wang W, Clarke DC, Liu X. Activation of Mps1 promotes transforming growth factor-beta-independent Smad signaling. *J Biol Chem.* 2007;282:18327-18338.
7. Chung AC, Zhang H, Kong YZ, et al. Advanced glycation end-products induce tubular CTGF via TGF-beta-independent Smad3 signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:249-260.

8. Jones RG, Thompson CB. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*. 2007;27:173-178.
9. Vig M, Kinet JP. Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol*. 2009;10:21-27.
10. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:690-702.
11. Bhowmick S, Singh A, Flavell RA, Clark RB, O'Rourke J, Cone RE. The sympathetic nervous system modulates CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells via a TGF-beta-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*. 2009;86:1275-1283.
12. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619.
13. Kipnis J, Cardon M, Avidan H, et al. Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4+CD25+ regulatory T-cell activity: implications for neurodegeneration. *J Neurosci*. 2004;24:6133-6143.
14. Kummerow C, Junker C, Kruse K, Rieger H, Quintana A, Hoth M. The immunological synapse controls local and global calcium signals in T lymphocytes. *Immunol Rev*. 2009;231:132-147.
15. Souldard A, Hall MN. SnapShot: mTOR signaling. *Cell*. 2007;129:434.

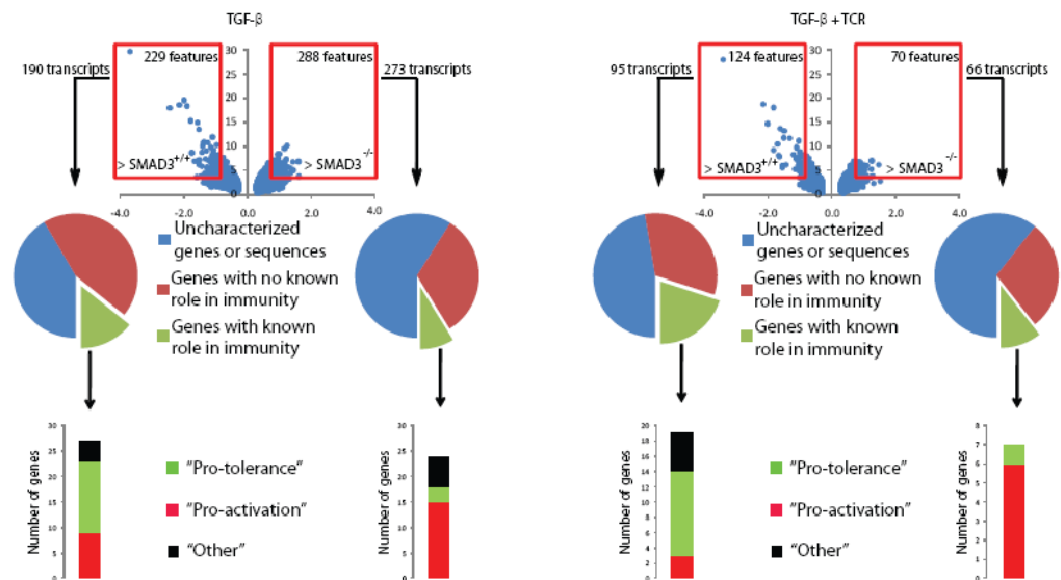
Figure 2



Distribution des gènes différentiellement exprimés. *Volcano Plots* montrant sur l'axe horizontal l'expression différentielle des gènes entre lymphocytes T CD4 naïfs SMAD3^{+/+} (WT) et SMAD3^{-/-} (SMAD3-KO) et sur l'axe vertical le négatif du Log en base 2 de la valeur de p. Les transcrits à l'intérieur du rectangle rouge ont une expression différentielle d'au moins 1.5 et une valeur de p plus petite que 0.05.

Figure 3

A



B

TGF- β /SMAD3 modulated genes with described role in immunity

> in SMAD3^{+/+} "pro-tolerance" > in SMAD3^{-/-} "pro-activation"

Gene ID	Gene Name	Gene ID	Gene Name
12776	Ccr8	11749	Anxa6
12633	Cflar	12530	Cdc25a
11477	Acvr1	29867	Cabp1
56484	Foxo3a	623596	Pglyrp-2
16154	Il10ra	12305	Ddr1
80906	Kcnp2	67425	Eps8l1
240754	Lax1	14938	Gzma
107321	Lpxn	215257	Il1f9
17132	Maf	16195	Il6st
18186	Nrp1	16333	Ins1
13713	Elk3	57264	Retn
19201	Pstpip2	13805	Eng
65960	Twsg1	19055	Ppp3ca
76510	Trappc9	21823	Th
12479	Cd1d1	18733	Lilrb3
12874	Cpd	320100	Tnfrsf19l
242083	Ppm1l	13637	Efna2
13024	Ctla2a	14940	Gzmc
		16612	Klk1
		218699	Pxk

SMAD3 module la transcription de gènes immunologiquement pertinents. A) Caractérisation des transcrits modulés par SMAD3 selon leur rôle biologique et immunitaire. B) Une liste inclusive (conditions TGF- β et TGF- β + Activation du TCR et CD28) de gènes rapportés comme étant tolérogènes et activateurs, selon le génotype SMAD3.

Tableau I : Résultats d'analyses non-biaisées.

DAVID	Functionnal Categories* and number of GO TERMS	Pathways
	WT Cytoskeleton + cell motility 7 Morphogenesis 5 Angiogenesis 5 Metabolism 3 Neurogenesis 3	Basal transcription factors Thyroid cancer Endometrial Cancer
	SMAD3-KO Neurotransmission 9 Ion Transport 6 CNS developement 5 Negative regulation of transcription 3 Muscle function 3 Cell adhesion 2	Maturity onset diabetes of the Young Calcium signaling
	*As determined by the author to regroup enriched GO TERMS.	
GSEA	Gene Sets (Decreasing order of statistical significance - for all all results FDR q-val <0.25)	
	WT Ribosome Oxidative phosphorylation Pathogenic E coli infection EPEC RNA polymerase Proteasome Pathogenic E coli infection EHEC Cell Cycle Basal transcription factors Ubiquitin mediated proteolysis MTor signaling pathway Glycan structure degradation Pyrimidine metabolism Pentose phosphate pathway Amyotrophic lateral sclerosis Insulin signaling pathway N glycan degradation Heparan sulfate biosynthesis Huntingtons disease Bladder cancer Purine metabolism Arginine and Proline metabolism Glycosaminoglycan degradation	SMAD3-KO Cell communication Calcium signaling pathway Type I diabetes mellitus Neuroactive ligand receptor interaction Taste transduction Basal cell carcinoma

Discussion

7- L'IFN- γ , une question de dose et de contexte- Article I

L'article I est basé sur deux questions : 1) L'IFN- γ est-il nécessaire pour la modulation de la densité antigénique, par le biais de l'augmentation des complexes MHC, sur les tissus cible de la GVHD ? et 2) L'absence de signalisation en aval de l'IFN- γ R chez les cellules de l'hôte a-t-elle des conséquences sur les cellules greffées (d'un donneur sensible à l'IFN- γ) ?

L'augmentation des complexes MHC de façon IFN- γ -dépendante avait été un élément central d'une étude précédente au laboratoire¹⁰⁹. Dans cette étude, le rejet de mélanomes établis chez la souris était directement tributaire de l'expression augmentée des complexes MHC portant un mHAg reconnu par des lymphocytes T CD8. Ce rejet tumoral était TCR-dépendant et associé à une forte dégranulation de la part des effecteurs CD8, suggérant fortement une cytotoxicité médiée par le système perforine/granzyme. Nous voulions savoir si l'impact de l'IFN- γ sur la densité antigénique de tissus cibles de la GVHD amenait le même genre de conséquences. Notre modèle en était un de GVHD dont l'alloréactivité était CD8-dépendante³⁰⁰. Nous avons montré que l'IFN- γ est en effet un puissant inducteur du MHC en examinant deux organes cibles de la GVHD. Cependant, cette surexpression de complexes MHC n'amène pas de dégranulation dans ces tissus et ne corrèle pas nécessairement avec l'étendue des dommages histologiques. Ainsi la relation entre la densité antigénique et l'activité cytotoxique varie selon les contextes et n'est pas un enjeu majeur dans les organes cibles de la GVHD (Article I, Figures 1 et 2).

Une observation faite au début de nos travaux montrait clairement que les lymphocytes T CD4 et CD8 de type donneur acquéraient un phénotype activé plus rapidement après la greffe dans un hôte déficient pour le récepteur de l'IFN- γ (comparativement à un hôte WT). Nous avons rapidement vérifié l'hypothèse selon laquelle l'absence de récepteur pour l'IFN- γ sur les cellules du receveur augmentait la disponibilité de la cytokine pour les cellules du donneur (perte d'un *cytokine sink*). En effet, les cellules du donneur étaient exposées à des concentrations d'IFN- γ de 2 à 5 fois plus élevées au jour 4 post-greffe dans des hôtes IFN- γ R déficients, ce qui était

corrélé avec la répression transcriptionnelle de la chaîne IFN- γ R2, un marqueur crédible d'une forte signalisation par la voie en aval de l'IFN- γ R²¹⁴. Cette différence n'était déjà plus visible au jour 8 post-greffe. Ainsi, les cellules d'un même donneur C3H.SW étaient exposées à de fortes concentrations d'IFN- γ lorsque greffées dans un hôte déficient pour le récepteur de l'IFN- γ plutôt que dans un hôte WT (les deux hôtes sur un fond génétique B6 identique). Cette exposition précoce menait à un échec de reconstitution hémato-lymphoïde noté au jour 15 post-greffe et caractérisé par de forts taux d'apoptose FasL-dépendante et une baisse de prolifération cellulaire. Les impacts sur la prolifération et l'apoptose étaient généralisés aux sous-types de cellules lymphoïdes et myéloïdes matures dans la rate. Dans la moelle osseuse, nous avons pu mettre en évidence qu'un déficit de prolifération des progéniteurs hématopoïétiques précoces LSKF⁻ (*Lineage⁻, Sca-1⁺, c-kit⁺, FLT3-récepteur⁻*) était associé à la répression de deux gènes dont l'expression est connue comme étant inhibée par l'IFN- γ ; cyclineD1 et c-myc. On avait déjà démontré que la concentration d'IFN- γ à laquelle les lymphocytes était exposée avait un impact sur les phénotypes immunitaires³⁰¹, mais notre étude était la première à montrer que l'exposition précoce à de forts taux d'IFN- γ programmait un échec d'hématopoïèse et une contraction accélérée et profonde en AHCT. En quelque sorte, l'IFN- γ cause une réaction « greffe contre greffe ».

7.1-L' IFN- γ , hémato-lymphopoïèse et homéostasie, hypothèses et discussion

Quelques mois avant la publication de notre article, le groupe de Jean-Laurent Casanova rapportait des résultats qui allaient dans le même sens que les nôtres³⁰². S'interrogeant sur les hauts taux de rejet de greffe chez les patients déficients pour l'IFN- γ RI (les cellules des donneurs, sensibles à l'IFN- γ , sont incapables de remplacer les compartiments hémato-lymphoïdes des receveurs), les auteurs ont clairement montré chez la souris que les hauts niveaux d'IFN- γ étaient nécessaires et suffisants pour supprimer l'hématopoïèse de type donneur. Dans ce modèle, il n'y avait pas d'alloréactivité (donc pas ou peu d'IFN- γ sécrété par les cellules du donneur), mais plutôt une modulation des niveaux d'IFN- γ de plus de 12 fois par une infection par mycobactéries ou par l'injection d'un plasmide adénoviral produisant de l'IFN- γ . Ces expériences nous ont convaincu que notre hypothèse d'une absence

de *cytokine sink* était à l'origine des modulations de concentration d'IFN- γ et que l'IFN- γ était clairement anti-hématopoïétique de façon dose-dépendante. De plus, le rôle hémato-suppresseur de l'IFN- γ a souvent été évoqué comme acteur central des aplasies médullaires acquises^{206,207,303}, mais les mécanismes sous-jacents n'ont jamais, à notre connaissance, été directement investigués.

7.1.1 La prolifération et l'apoptose

L'échec de reconstitution hémato-lymphoïde est dépendante, au moins en partie d'un échec de prolifération et d'une apoptose fasL-dépendante. Chez les progéniteurs hématopoïétiques de la moelle (LSKF), ceci était corrélé à la répression de gènes impliqués dans la transition G1-S du cycle, connue comme étant sensible aux effets de l'IFN- γ ¹⁷⁹ (Article I, Figure 7). Afin de vérifier plus directement le rôle d'une signalisation en aval de l'IFN- γ R dans la modulation du cycle cellulaire chez les cellules du donneur post-greffe, nous aurions pu utiliser les receveurs déficients pour l'IFN- γ RI comme donneurs en inversant le couplage donneur-receveur des souches C3H.SW et B6 (autrement dit en injectant un greffon B6 IFN- γ R-KO dans des hôtes C3H.SW). Il aurait été possible également de moduler la concentration d'IFN- γ en n'en injectant. La suggestion que l'IFN- γ est un modulateur de la prolifération des cellules primitives, de façon contradictoire selon les modèles expérimentaux²⁰⁸, souligne encore une fois l'importance du contexte dans une relation IFN- γ -hématopoïèse qui n'est sûrement pas linéaire. En effet, les étapes précoces de la reconstitution hématopoïétique post-AHCT sont marquées par une prolifération inhabituelle des cellules souches de type donneur³⁰⁴ (peut-être pour combler des niches rendues disponibles par l'irradiation pré-greffe). Ainsi, il est possible que cette activité proliférative exceptionnelle rende les cellules souches plus vulnérables aux effets cytostatiques de l'IFN- γ .

Les taux de cellules apoptotiques, ainsi que les différences dans ces taux entre les compartiments spléniques et médullaires (Article 1, Figures 6 et 7) soulèvent quelques questions. La première hypothèse qui nous vient à l'esprit est que les taux d'apoptose pourraient varier de façon dose-dépendante. En effet, les concentrations d'IFN- γ pourraient montrer une variation géographique. Nos méthodes dans la préparation des extraits de rate et de moelle n'étaient pas exactement les mêmes, donc

nous ne pouvons conclure. Cependant, les organes lymphoïdes secondaires sont les sièges précoces de l'alloréactivité. Il est donc possible que la production locale d'IFN- γ joue un rôle déterminant dans les concentrations d'IFN- γ . Nous avons décidé de directement tester l'hypothèse selon laquelle l'apoptose Fas-dépendante était responsable des hauts taux d'apoptose, compte tenu des liens établis entre l'IFN- γ et la modulation de FasL. Cette hypothèse s'est vérifiée, mais qu'en partie, suite au blocage des interactions Fas-FasL. L'étude des voies d'apoptose mitochondriale aurait pu offrir une explication complémentaire.

7.1.2 La programmation

L'asynchronie entre le pic de concentration d'IFN- γ et les phénotypes observés nous suggère très fortement que les hauts niveaux d'IFN- γ au jour 4 post-AHCT chez les receveurs IFN- γ RI déficients programment les phénotypes divergents au jour 15 chez les cellules de type donneur. En effet, dès le jour 8 les concentrations d'IFN- γ sont moindres, et semblables, chez les deux types de receveurs. De plus, il est connu que les cellules recevant un signal IFN- γ deviennent rapidement insensibles à celui-ci²¹⁴. Nous savons que l'IFN- γ programme l'activation^{213,305} et la contraction des lymphocytes T⁵³, particulièrement des lymphocytes T CD8. Nous avons démontré que l'acquisition du marqueur d'activation CD43/1B11 sur les cellules du donneur était plus précoce dans un hôte IFN- γ déficient (Article I, Figure 3). Un suivi dans le temps de marqueurs témoignant d'une différenciation en *Short-term effectors* (T-bet et KLRG1)⁵⁴ aurait appuyé le concept d'une programmation par l'exposition à des hautes concentrations d'IFN- γ .

Cette idée de programmation précoce par l'IFN- γ est largement démontrée dans des modèles infectieux³⁰⁶ et même dans certains modèles de GVHD. En effet, l'injection d'IFN- γ post-AHCT peut prévenir la GVHD, possiblement en programmant l'échec de l'expansion des lymphocytes T. En effet, on a montré que l'injection d'IFN- γ dans les trois premiers jours était essentielle, supportant l'idée de programmation, mais qu'elle devait être poursuivie pendant 5 semaines, suggérant que les signaux précocement induits par l'IFN- γ ne sont pas suffisants³⁰⁷. Il est possible que les cellules de type donneur redeviennent graduellement sensibles à l'IFN- γ (par la ré-expression de leur récepteur)²¹⁴ dans notre modèle et qu'ainsi, une signalisation IFN-

γ soutenue puisse ajouter à l'effet de programmation par des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques directs.

Le phénomène de programmation a sûrement des fondements transcriptionnels. Les réponses cellulaires découlant d'une signalisation par l'IFN- γ se font en vagues successives (par le biais de l'IRF-1 notamment), laissant présager que les effets d'une stimulation par l'IFN- γ se prolongent dans le temps. Des études de micro-puces d'ADNc ou de séquençage d'ARN, faites dans le temps *in-vivo* ou *in-vitro* avec un inhibiteur de la traduction (et donc des vagues de transcription secondaires) telle la cycloheximide³⁰⁸, pourraient nous aider à disséquer plus précisément ce concept encore vague de programmation.

Tel que nous l'avons souligné dans l'introduction, le concept de programmation sert l'homéostasie lymphocytaire et immunitaire. Les rôles homéostatiques de l'IFN- γ n'ont pas été examinés dans nos travaux. Parmi eux, notons la génération de TReg²¹⁹ et de cellules myéloïdes aux propriétés immunorégulatrices et antiprolifératives suite à une induction d'IDO et d'iNOS^{309,310}. Outre l'effet direct de l'IFN- γ sur les tissus de l'hôte, la présence de cellules régulatrices dans les infiltrats pourrait moduler les dommages histologiques et éventuellement la survie.

7.2-IFN- γ et organes cibles de la GVHD, mécanismes à entrevoir

7.2.1 – Le système hématopoïétique comme cible

L'IFN- γ , sécrété par les cellules alloréactives du donneur²²², amène dans notre modèle un effet greffon contre greffon en limitant la reconstitution hématolymphoïde de type donneur. L'IFN- γ limite la GVHD dans la plupart des systèmes expérimentaux, mais l'augmente dans des contextes où le receveur ne reçoit pas de traitements myéloablatifs³¹¹ avant la greffe (par exemple les modèles de « parent dans F1 » : le receveur reconnaît les cellules du receveur comme faisant parti du soi et ne les rejette pas, mais les cellules du donneur reconnaissent les cellules de l'hôte comme étrangères)^{221,224}. Une bonne partie de cette dichotomie s'explique par le rôle important de l'IFN- γ dans l'élimination des cellules hématopoïétiques de l'hôte. Ainsi, même dans le contexte allogénique, le rôle anti-hématopoïétique de l'IFN- γ s'observe.

7.2.2 – *La densité antigénique et la GVHD, implications pour l'immunologie anti-tumorale.*

Une hypothèse attrayante, découlant de nos études sur des tumeurs¹⁰⁹, était que l'induction de l'expression du MHC sur les cellules non-hématopoïétiques par l'IFN- γ amènerait une reconnaissance accrue via le TCR et une dégranulation des lymphocytes T. Une étude avait d'ailleurs suggérée que l'atteinte variable des organes cibles selon les modèles murins de GVHD dépendait de la distribution des antigènes dans ces tissus³¹². Dans notre modèle, nous montrons que l'IFN- γ augmente l'expression du MHC, mais que cela ne corrèle pas nécessairement avec la sévérité de la pathologie ni avec la dégranulation des lymphocytes T CD8 infiltrants. Pourtant, dans la rate, où on peut présumer que la plupart des cibles étaient des cellules hématopoïétiques de type receveur, la dégranulation était active. L'utilisation du système perforine/granzyme serait donc limitée aux compartiments hématolymphoïdes. Cette observation amène deux questions intéressantes; 1) Faut-il d'autres signaux afin de permettre une dégranulation, ou bien la dégranulation est-elle inhibée dans les tissus cibles de la GVHD? et 2) Les lymphocytes T CD8 infiltrants sont-ils de bons effecteurs ?

Nous nous limiterons à proposer que deux hypothèses afin d'offrir une réponse plausible à la première question. En lien avec le reste des travaux présentés dans cette thèse, nous pouvons spéculer que des facteurs tels l'irradiation, mènent à une production accrue de TGF- β dans les tissus cibles, inhibant la dégranulation²⁴⁷. Aussi, il est possible que des interactions cellulaires directes et spécifiques, ou la présence de chimiokines dans l'environnement des organes lymphoïdes, facilitent la dégranulation.

La deuxième question soulève une hypothèse intéressante, le lymphocyte T CD8 hyper-activé dans les organes lymphoïdes pendant les phases précoces de la GVHD pourrait montrer des signes d'épuisement (*exhaustion*) suite à l'exposition à l'IFN- γ et à la perforine²¹⁶. Le foie est un site d'accumulation privilégié de lymphocytes épuisés et sénescents^{313,314} et souffre davantage de la cytotoxicité FasL-dépendante¹⁶⁰, non-spécifique et active chez les lymphocytes apoptotiques. L'infiltration de lymphocytes dans les tissus cibles de la GVHD pourrait avoir d'autres rôles que la

cytotoxicité directe, en favorisant par exemple l'entrée d'effecteurs non-T (décrit au point 8.2)

L'IFN- γ contribue à l'effet anti-hématopoïétique et est un rouage déterminant des réactions GVT^{226,315-317}. Serait-il possible qu'un lien existe entre les deux, expliquant pourquoi l'effet GVT chez l'humain ne s'observe à toutes fins pratiques que dans les néoplasies hémato-lymphoïdes ? L'IFN- γ pourrait directement être toxique pour les cellules hématopoïétiques néoplasiques et son effet être dépendant du contexte de l'organe hémato-lymphoïde. Les cellules hémato-lymphoïdes expriment constitutivement les complexes MHC à leur surface et ainsi semblent être de bonnes cibles pour la reconnaissance par le TCR menant à une exocytose de perforine et granzyme. On a même déjà montré chez la souris que le système perforine/granzyme était essentiel pour l'effet GVT, mais accessoire pour la GVHD^{158,159}. De plus, le contact direct des lymphocytes T avec leurs cibles semble plus important pour l'effet GVT que pour l'effet GVHD³¹⁸. L'IFN- γ , le MHC et le système perforine/granzyme sont des déterminants essentiels de l'effet GVT¹⁰⁹, mais pas de la GVHD. Cette dichotomie offre un canevas pour réfléchir aux moyens de séparation des deux effets^{315,317} en AHCT humaine et nous y reviendrons brièvement au point 9.

7.2.3-Toxicité directe sur les tissus cibles

La toxicité de l'IFN- γ ne touche pas seulement les cellules hémato-lymphoïdes. L'absence de maladie intestinale chez les receveurs IFN- γ RI-déficients est à cet égard particulièrement pertinente car l'atteinte intestinale en GVHD est une cause importante de morbidité chez l'humain³¹⁹. L'IFN- γ et le TNF- α perturbent l'homéostasie des cellules épithéliales directement en activant la voie AKT et Wnt³²⁰. De plus, l'IFN- γ est un activateur potentiel de la synthèse et de la sécrétion de nombreuses chimiokines et molécules d'adhésion pouvant influencer le trafic des leucocytes (notons VCAM-1, ICAM-1, CCL5, CCL3, CCL4, CXCL9, CCL2 et CXCL10)¹⁷⁹. Nos données non-publiées révèlent toutefois que l'expression de VCAM-1 et ICAM-1, importants dans la GVHD hépatique³²¹, n'est pas perturbée chez les souris IFN- γ RI déficientes. De plus, les systèmes chimiokiniens sont si redondants³²¹ qu'il est difficile d'identifier un seul coupable. Par contre, l'IFN- γ pourrait contrôler l'ampleur des réponses chimiokiniennes et ainsi influencer sur

l'infiltration leucocytaire quantitativement. Les effets protecteurs de l'IFN- γ sur le tissu pulmonaire restent mystérieux, même aux yeux des auteurs qui les premiers ont observé le phénotype²²⁸. On a évoqué un rôle au niveau du recrutement et de l'expansion leucocytaire intra-parenchymateuse (d'ailleurs largement supporté par d'autres modèles²⁹⁵). Le fait que l'atteinte pulmonaire en GVHD soit augmentée par les réponses Th17 pourrait aussi offrir quelques pistes^{156,322}. Les mécanismes qui sous-tendent l'effet de l'IL-22, de l'IL-6 et de l'IL-17 (encore largement inconnus) dans le recrutement d'effecteurs myéloïdes (article I, Figure 1) pourraient être réprimés par l'IFN- γ ²⁵⁴. De plus, l'IFN- γ est un inhibiteur de la néoangiogénèse, ce qui contribue à son effet anti-tumoral¹⁰⁹. On vient de mettre en évidence que l'inhibition du recrutement de progéniteurs endothéliaux aux sites de GVHD contribue à atténuer la sévérité de la maladie³²³. Peut-être que l'IFN- γ inhibe la néovascularisation dans le poumon et ainsi limite la maladie.

8- L'axe TGF- β /SMAD3, la GVHD et la physiologie des lymphocytes T (Article II, III et Annexe 1)

8.1-Impact de SMAD3 sur la GVHD

Le deuxième article inclu dans cette thèse cherchait à découvrir si SMAD3, un médiateur canonique de TGF- β dans les cellules du donneur modulait la GVHD. Nous suspicions que oui, compte tenu du rôle prépondérant de SMAD3 dans l'immunité et l'association entre les niveaux de transcrits de SMAD3 dans les lymphocytes T CD4 des donneurs et la GVHD, soulevée par Baron et al¹⁷¹. Notre modèle murin montre une très forte influence de l'absence de SMAD3 sur l'incidence et la sévérité de la GVHD. En effet, les souris receveuses de greffons SMAD3-KO mourraient presque toutes secondairement à une atteinte colique, alors que les receveuses de greffons WT survivaient à long terme. Une différenciation Th1 et une expansion/infiltration de cellules myéloïdes surtout granulocytaires caractérisaient ce phénotype. Cependant, l'absence de SMAD3 dans les compartiments T et myéloïdes était nécessaire pour amener un phénotype létal chez tous les animaux (Article II, Figure 4). Notre modèle est donc un point de départ intéressant pour réfléchir aux acteurs autres que les cellules T dans la GVHD ainsi qu'aux interactions et interdépendances leucocytaires.

8.2-Les sous-types cellulaires «non-T» et la GVHD

Les macrophages, les cellules NK et à moindre titre les neutrophiles sont tous impliqués dans la GVHD aiguë et chronique¹³⁸. Pourtant, le rôle précis de ces sous-types de cellules dans les dommages tissulaires reste vague. En effet, on évoque leur participation dans la présentation antigénique^{140,150}, la propagation et/ou régulation de l'inflammation ainsi qu'au remodelage tissulaire, sans quantifier leur apport ni élaborer sur les mécanismes qui les contrôlent (autre ceux directement dépendant des lymphocytes T)^{138,141}. Nos connaissances sont davantage axées sur les déterminants de la réponse T, essentielle pour le déclenchement de la maladie, mais probablement insuffisante pour en expliquer toutes les conséquences pathophysiologiques et cliniques. Aussi, il nous faut considérer une variable incontournable: le temps. En effet, les rôles des cytokines maîtresses et des sous-types cellulaires changent tout au cours de l'évolution de la maladie²⁸¹.

8.2.1 La réponse innée et la GVHD

Nous emprunterons aux maladies inflammatoires chroniques certaines idées pouvant élargir notre conception de ce qu'est la GVHD.

Tout comme la réponse adaptative, la réponse innée comprend elle aussi une forme de «contraction programmée»³²⁴. Les macrophages et les neutrophiles collaborent dans cette régulation¹² qui est nécessaire pour protéger l'hôte des conséquences d'une inflammation soutenue. Brièvement, la contraction de la réponse inflammatoire des macrophages et des neutrophiles s'élabore à partir d'une « conversion lipidique » où la synthèse de lipides pro-inflammatoires à partir de l'acide arachidonique cesse et est remplacée par la synthèse de lipoxines et résolvines anti-inflammatoires. La synthèse des médiateurs de l'inflammation, tel la céruloplasmine, cesse et du cortisol est synthétisé à partir de la cortisone circulante³²⁵. Parmi les orchestrateurs principaux de cette conversion nous retrouvons le TNF- α et l'IFN- γ ³²⁶ soulignant la présence d'une autre boucle de rétro-action négative. Ainsi, on propose que les macrophages résidants dans les tissus attirent les neutrophiles suite à un signal de danger, et que l'activation subséquente des neutrophiles attire d'autres neutrophiles et des macrophages. L'apoptose rapide des neutrophiles, et leur phagocytose par les

macrophages induisent chez ces derniers un programme tolérogène caractérisé entre autres par la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β ^{12,327,328}. Le TGF- β a deux rôles: la suppression des fonctions effectrices des cellules immunitaires et la stimulation du remodelage tissulaire¹². Plusieurs maladies humaines sont la conséquence d'une inflammation qui ne peut se résoudre, souvent à cause d'une constante ré-initiation³²⁹. Les maladies inflammatoires de l'intestin sont un exemple probant et peut-être la GVHD, surtout dans sa chronicisation. Une assimilation défectueuse des signaux émanant du TGF- β R, causée par une réduction de SMAD3, pourrait perpétuer le processus inflammatoire tout en permettant au TGF- β de stimuler la formation de fibrose à long terme²⁸¹. De plus, la perpétuation de la réponse inflammatoire peut aussi découler d'un défaut dans la régulation de l'immunité innée par l'immunité adaptative. Le contexte lymphopénique post-AHCT pourrait contribuer paradoxalement à certaines formes d'auto-agressions telles qu'observées dans des contextes d'immunodéficiences congénitales³³⁰.

Bien qu'encore incertain, des polymorphismes dans NOD2/CARD15 pourraient influencer la GVHD^{174,176}. Cette possible association amène la l'hypothèse que la régulation des inflammasomes, plateformes moléculaires menant à la sécrétion de l'IL-1 β ³³¹, sont des acteurs plausibles de la GVHD. L'IL-1 β est une cytokine centrale du système monocyte/macrophage qui initie et perpétue la réponse inflammatoire et dont l'inhibition améliore plusieurs conditions inflammatoires chroniques chez l'humain^{331,332}. L'inhibition pharmacologique de l'IL-1 β peut se faire par des agonistes d'un inhibiteur naturel de la cytokine: l'IL-1RA (*IL-1 receptor antagonist*)³³¹. Des variations inter-individuelles dans l'IL1-RA influencent d'ailleurs la GVHD chez l'humain³³³. Les inflammasomes sont activés par des signaux de dangers et peuvent être négativement régulés par plusieurs molécules provenant de microbes ainsi que par les lymphocytes T CD4 activés³³⁴. Très peu d'études lient la biologie des inflammasomes et la voie TGF- β ³³⁵, mais une interaction dans la non-résolution et la ré-initiation de l'inflammation (par des signaux de danger) pourrait être envisagée.

8.2.2- Les neutrophiles comme nouveaux joueurs de la GVHD

La présence de neutrophiles corrèle avec la sévérité de la GVHD, mais il est difficile de jauger exactement s'ils sont acteurs ou spectateurs³³⁶. Nous croyons être les premiers à montrer qu'un facteur (SMAD3) prévient la GVHD en jouant un rôle essentiel chez les cellules myéloïdes, possiblement en réprimant les fonctions cytotoxiques des neutrophiles dans les organes cibles.

Ce qui est connu de la relation entre les neutrophiles et le TGF- β se résume à la répression des fonctions effectrices reliées à la génération de radicaux libres⁷⁷ et à la sécrétion granulaire³³⁷ ainsi qu'à la grande capacité chimiotactique du TGF- β ²³¹. Cette dernière fonction serait d'ailleurs en grande partie SMAD3-dépendante²⁷⁴. Nous pouvons présumer que SMAD3 régule beaucoup plus de processus reliés à la biologie des neutrophiles suite à notre étude.

En premier lieu, l'ontogénie. Les cavités osseuses des receveurs de greffons SMAD3-KO montraient une hyper-cellularité et une déviation myéloïde. Un examen microscopique confirmait la présence de neutrophiles matures (Article II, Figure 6). Nous savions que le TGF- β réprimait l'expansion des cellules myéloïdes^{269,270} dans des contextes inflammatoires, mais nos données suggèrent que la partie SMAD3 de cette répression touche davantage la lignée granulocytaire. Rappelons que chez les souris SMAD3 non-manipulées, aucune myéloprolifération est détectée. C'est donc le contexte post-AHCT qui déclenche cette expansion granulocytaire. Deux principales hypothèses non-exclusives doivent être considérées : 1) L'expansion granulocytaire est secondaire à un facteur inflammatoire et/ou 2) l'expansion granulocytaire est secondaire à une réponse sous-optimale au TGF- β . Nos données peuvent déjà nous aider à répondre à la deuxième question. En effet, *in vitro* le TGF- β réduit de façon SMAD3-dépendante la génération de granulocytes. Ceci dit, cette régulation par le TGF- β n'est pas constitutive, ce qui nous force à chercher un signal activateur. Le milieu de méthylcellulose que nous avons utilisé contient entre autre de l'IL-6, une cytokine abondante chez les receveurs de cellules SMAD3-KO (au moins dans le colon – Article II, Figure 5) et un facteur de croissance granulocytaire notoire¹⁴⁵. D'autres candidats dont la signalisation serait accrue en l'absence de SMAD3 sont aussi possibles (ex : G-CSF).

Le TGF- β est un facteur chimiotactique pour les neutrophiles. Cette propriété est toutefois dépendante du contexte, et une forte inflammation pourrait en fait inhiber la transmigration³³⁸. Nous n'avons pas directement évalué la capacité de migration vers le colon, mais une étude récente sur le rôle du TGF- β dans la répression des fonctions anti-tumorales des neutrophiles démontre que le TGF- β réprime transcriptionnellement plusieurs chimiokines et molécules d'adhésion dont CCL2 et CCL5 chez les neutrophiles⁷⁷. Une étude immunohistochimique sur des spécimens de colons et des études en cytométrie sur des neutrophiles infiltrants le colon pourrait dans un premier temps nous renseigner sur la modulation de plusieurs molécules d'adhésion (notamment MAdCAM, VCAM-1, ICAM-1) et leur ligand.

Les impacts d'une dérégulation de SMAD3 touchent plusieurs types cellulaires. Rappelons que l'absence de SMAD3 dans les compartiments myéloïdes et lymphoïdes T du greffon est nécessaire pour amener une GVHD létale chez tous les receveurs. Ainsi, plusieurs fonctions des neutrophiles dans notre modèle sont indirectes et T-dépendantes. Nous savons que le potentiel cytotoxique tel que mesuré par DHR après une brève stimulation est différent entre des granulocytes SMAD3-KO et WT, mais il serait étonnant que le milieu riche en IFN- γ et TNF- α du colon post-AHCT dans notre modèle n'influence en rien les fonctions des neutrophiles^{179,339}. La contribution relative de SMAD3 endogène et exogène (i.e dans un autre type cellulaire) est difficile à déterminer. Cependant, l'analyse des contenus granulaires, la régulation de gènes participants à la cytotoxicité, notamment le complexe NADPH oxydase par PCR en temps réel sont possibles. De plus des essais de phagocytose et de cytotoxicité directe⁷⁷ avec des neutrophiles fraîchement extraits sont envisageables. De telles analyses faites sur des neutrophiles SMAD3-KO extraits de contextes différents pourraient nous livrer quelques indices sur l'importance des influences externes.

8.3-SMAD3 et les lymphocytes T

L'implication de SMAD3 dans l'expansion et la cytotoxicité de sous-types de cellules non-lymphoïdes et leur rôle dans la GVHD fut une révélation. Cependant, l'article II nous confirme ce que nous aurions pu anticiper du rôle de l'axe TGF- β /SMAD3 chez les lymphocytes T CD4 en GVHD. En effet, nous avons confirmé ce que certains

avaient montré ou suggéré en démontrant que SMAD3 inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4³⁴⁰ et favorise l'expression du facteur de transcription FoxP3³⁴¹, maître d'œuvre de la différenciation TReg. De plus, nous montrons que SMAD3 joue un rôle dans la répression de T-bet lors d'une différenciation Th1 *in-vitro*, ce que d'autres avaient mis en doute³⁴². La GVHD aiguë étant une réponse de type Th1, nous anticipions que SMAD3 chez les lymphocytes T CD4 influencerait la différenciation Th1. L'absence de «compensation» vers un phénotype TReg des cellules de donneurs WT *in-vivo* nous a par ailleurs surpris.

Nous avons aussi confirmé que SMAD3 n'influçait pas la prolifération des CD8³⁴⁰. De plus, l'absence d'infiltration significative des colons par des lymphocytes T CD8 a fait en sorte que nous n'avons pas investigué les rôles possibles de SMAD3 chez ceux-ci. Compte tenu que TGF- β réprime les mécanismes cytotoxiques²⁴⁷ et que la modulation de l'expression de T-bet⁵¹ détermine la différenciation des lymphocytes T CD8, il est probable que SMAD3 contribue aussi à la biologie de ces derniers. Des modèles infectieux, tumoraux ou l'utilisation de modèles de GVHD dépendant des lymphocytes T CD8³⁰⁰ pourraient être envisagés afin de directement évaluer le rôle de SMAD3 chez les lymphocytes T CD8.

L'article III et l'annexe I comportent plusieurs nouvelles données suggérant que l'axe TGF- β /SMAD3 est important dans le maintien de la tolérance des lymphocytes T CD4 et seront développées au point 8.4.

8.3.1 Les phénotypes Th, la régulation et la GVHD

Les mécanismes limitant ou régulant la différenciation Th1 sont susceptibles d'avoir un impact majeur sur le développement de la GVHD. C'est peut-être là le rôle le plus fondamental de SMAD3 dans les lymphocytes T. Le rôle central de SMAD3 dans l'interconversion par l'ajout de TGF- β de l'expression de T-bet et FoxP3 dans des conditions de cultures dirigeant une différenciation Th1 est révélateur (Article II, Figure 1). En effet, elle nous montre que le lymphocyte T CD4 WT placé dans des conditions optimales de différenciation Th1 est extrêmement vulnérable à l'action du TGF- β . En fait, FoxP3 est induit aussi fortement que dans des conditions de différenciation TReg. SMAD3 vraisemblablement se lie aux deux promoteurs^{250,277} et

y influence la transcription de façon opposée. De plus, SMAD3 se lie à un *enhancer* du gène FoxP3 avec NFAT²⁵⁰ suggérant que l'activation T prédispose à une régulation par SMAD3. Cette dernière boucle de rétroaction négative est probablement hautement pertinente pour la régulation de la réponse Th1. Nous n'en avons toutefois pas trouvé de trace convaincante *in vivo*. Une autre surprise fut l'absence d'une signature Th17 chez un ou l'autre des receveurs. En fait, les hauts niveaux d'IL-6, la présence de neutrophiles et le rôle connu de TGF- β et de SMAD3 dans le choix de différenciation TReg/Th17^{275,299,343}, nous ont fait croire que les Th17 auraient un rôle à jouer chez les receveurs de greffons SMAD3-KO. La somme des influences a favorisé une différenciation Th1 chez les receveurs de cellules SMAD3-KO. Ces influences sont probablement des facteurs locaux car l'infiltration de cellules Th1 était seulement observable dans le colon, même aux moments plus précoces, avant l'apparition d'infiltrats inflammatoires significatifs. On connaît bien l'influence des phénotypes Th sur le type d'organes cibles¹⁵⁶, mais qu'en est-il de l'influence de l'environnement des organes sur la différenciation et le maintien des schèmes Th ? On pourrait imaginer que l'environnement intestinal inflammatoire favorise entre autres la maturation des APC *in-situ* ou dans les plaques de Peyer et la sécrétion d'IL-12.

Un autre facteur pourrait expliquer la prépondérance d'effecteurs Th1 chez les receveurs de greffons SMAD3-KO. Le TGF- β est un facteur de survie pour les lymphocytes naïfs. Il a été démontré que les lymphocytes T déficients pour le TGF- β R meurent, à moins de se différencier en effecteurs Th1²⁴⁹. Par contre, les lymphocytes porteurs d'une double déficience de TGF- β R et T-bet sont grandement susceptibles à l'apoptose. T-bet est donc lui aussi un facteur de survie, possiblement grâce à une signalisation via CD122, la chaîne β des récepteurs à l'IL-15 et l'IL-2. Se peut-il que les autres types d'effecteurs Th SMAD3-KO *in vivo* soient défavorisés ? La régulation de la réponse immunitaire T par apoptose est déterminante. Le rôle de SMAD3 dans ce processus est inconnu.

8.4-Quels pourraient être les fondements de l'effet tolérogène de SMAD3 ?

Le TGF- β freine la prolifération des lymphocytes suite à une stimulation par le TCR ou l'IL-2. La partie SMAD3-dépendante de cette inhibition s'observe dans des

contextes de stimulation par le TCR et non par l'IL-2²⁴⁶. Nos données solidifient et précisent ces résultats en montrant que SMAD3 ne freine pas la cinétique de prolifération TGF- β -dépendante des lymphocytes T naïfs suite à une stimulation par le TCR, mais plutôt que SMAD3 diminue le pourcentage de cellules qui parviennent à se diviser. Les concepts actuels d'activation T suggèrent qu'après une stimulation productive, un lymphocyte T se divisera au moins 7 fois, même en l'absence de stimulation continue⁵⁵. Ainsi, SMAD3 pourrait être un rhéostat moléculaire et transcriptionnel, augmentant le seuil requis pour déclencher l'activation via le TCR. L'article 3 renforce cette hypothèse en suggérant fortement que l'effet inhibiteur tonique du TGF- β s'exerce à des niveaux faibles de stimulation par le TCR et que seuls les stimulus forts parviennent à inhiber la transcription SMAD-dépendante. De plus, l'inhibition de la transcription SMAD-dépendante dans ces cas là serait vraisemblablement tributaire d'une baisse sélective de la phosphorylation de SMAD3 par rapport à SMAD2.

C'est à la lumière de ces résultats que nous avons interprété nos données de micro-puces d'ADNc. Précisément, nous cherchions à savoir quels sont les transcrits régulés par SMAD3 en quiescence et lors des étapes précoces d'activation via le TCR. En fait pouvons-nous traduire en gènes cette notion évasive de seuil d'activation ? L'axe TGF- β /SMAD3, est impliqué dans la transcription de nombreux gènes dont les fonctions connues se rattachent à une foule de processus biologiques différents et parfois difficiles à relier. Il est possible cependant qu'un régulateur tel que l'axe TGF- β /SMAD3 parvienne à moduler la tolérance en agissant sur plusieurs voies différentes mais fonctionnellement reliées³⁴⁴.

Nous avons choisi d'approfondir deux processus dont le rôle dans le maintien de la quiescence est plausible : le contrôle des voies métaboliques et calciques. Le rôle de l'influx calcique dans les phases précoces de l'activation T est établi^{24,345}. La réponse des lymphocytes T déficients pour le gène du TGF- β à une faible stimulation via le TCR semble d'ailleurs être calcineurine-dépendante³⁴⁶. De plus, le TGF- β inhibe la Tec-kinase ITK dont le rôle dans l'activation T par les flux calciques est démontré²⁴⁵. En l'absence de SMAD3, les lymphocytes T CD4 expriment plusieurs transcrits de protéines qui sont des joueurs importants dans la signalisation calcique, dont la

calcineurine elle-même (Annexe 1, Figure 3B -Ppp3ca). Si SMAD3 réprime la transcription de ces gènes de telle façon que la mobilisation du calcium puisse être modulée, nous pourrions expliquer, au moins en partie, la réduction du seuil d'activation des lymphocytes T CD4 SMAD3 déficients. Nous prévoyons dans un premier temps mesurer les flux calciques en présence ou en absence de TGF- β chez des lymphocytes T CD4 WT ou SMAD3-KO in vitro afin de vérifier si en effet l'ampleur et la rapidité de la mobilisation calcique est modulée par l'axe TGF- β /SMAD3 lors d'une stimulation par le TCR.

L'hypothèse métabolique est attrayante pour deux raisons :

1) d'une part, le passage entre la quiescence et la prolifération/activation requiert une conversion métabolique^{27,347}. Nous entendons par conversion métabolique un changement dans la façon de générer de l'énergie. Le lymphocyte quiescent utilise le catabolisme d'une grande variété de substrats pour générer de l'énergie et repose essentiellement sur la phosphorylation oxydative pour générer des molécules d'ATP. Par contre, le lymphocyte activé s'hypertrophie et devient largement anabolique, reposant sur l'activité glycolytique pour ces besoins énergétiques. Ces changements morphologique et biochimique surviennent avant la première division et donc corrélatent dans le temps avec nos études de micro-puces d'ADNc. Si l'effet global de SMAD3 est de freiner cette conversion en favorisant AMPK ou en limitant la voie mTOR, nous pourrions sérieusement donner un substratum biochimique à la vague notion de seuil d'activation. La conversion métabolique n'est pas anodine et surtout, elle n'est pas seulement une conséquence passive de l'activation. Par exemple, l'activité de la voie mTOR détermine les phénotypes T. En effet, les souris mTOR déficientes ne peuvent se différencier en effecteurs Th1 ou Th2 et deviennent des TReg³⁴⁸ et l'inhibition de mTOR par rapamycine est une stratégie immunosuppressive établie³⁴⁹⁻³⁵¹. De plus, l'activation pharmacologique de la phosphorylation oxydative durant les phases précoces d'une réaction anti-ovalbumine (première semaine) favorise le développement de cellules mémoires³⁵². Mentionnons également que le gène FOXO3a (Annexe 1, figure 3B) est modestement induit chez les cellules WT en présence de TGF- β (1.7 fois par rapport aux cellules SMAD3-KO), mais pas lors de la double stimulation TGF- β /anti CD3/CD28 (données non-

montrées). Les gènes FOXO (4 paralogues chez les mammifères)³⁵³ sont des acteurs fondamentaux de la quiescence chez de nombreux types cellulaires³⁵⁴ et sont inactivés par phosphorylation suite à une signalisation en aval des récepteurs de facteurs de croissance. Au surplus, ces facteurs de transcriptions agissent en synergie avec les complexes SMAD²³⁶. FOXO1 est essentiel au maintien de la tolérance³⁵⁵ et FOXO3a contrôle négativement la voie NF- κ B et inhibe ainsi l'activation chez les lymphocytes primaires T³⁵⁶. De plus, FOXO3a et FOXO1 sont des maillons essentiels de la différenciation TReg par le TGF- β en périphérie^{357,358}.

2) La régulation de la croissance et de l'utilisation des ressources énergétiques est une fonction ancestrale de la voie TGF- β . En effet, l'absence de TGF- β (*daf-7*) chez le nématode *C. Elegans*, amène le développement du stade Dauer (pause dans le développement larvaire lorsque les ressources alimentaires sont insuffisantes pour supporter la croissance)^{359,360}. Chez le nématode, le TGF- β est donc pro-anabolique, aux antipodes de notre hypothèse au sujet d'un rôle possible de l'axe TGF- β /SMAD3 dans le maintien d'un métabolisme catabolique chez les lymphocytes quiescents. Ceci dit, les mammifères et *C.Elegans* ont aussi des voies TGF- β /SMAD aux antipodes. En effet, chez *C.Elegans* l'orthologue de SMAD2 et SMAD3 inhibe l'orthologue du co-SMAD SMAD4, plutôt que de collaborer avec lui³⁶¹. Alors, nous pouvons croire que l'axe TGF- β /SMAD3 est un candidat légitime dans le contrôle des voies métaboliques chez le lymphocyte T CD4. Dans un premier temps, nous vérifierons si l'hypertrophie cellulaire et la consommation de glucose sont altérées chez les lymphocytes T CD4 SMAD3-KO dans des contextes de quiescence et d'activation *in-vitro*. Aussi, nous mesurerons l'activité des voies métaboliques principales (AMPK, mTOR, AKT) par western blot dans les mêmes conditions. Si ces résultats suggèrent que SMAD3 est lié à l'activation T par le biais de son contrôle sur les voies métaboliques, nous pourrions directement tester le rôle d'une stimulation de la voie AMPK (metformine) ou d'une inhibition de la voie mTOR (rapamycine) *in vitro* et *in vivo* dans notre modèle de GVHD.

9-Perspectives générales sur la signalisation cytokinique dans les processus complexes

Nous nous attendions à ce que la biologie des cytokines maîtresses soit complexe. À cet effet, John Letterio écrivait en 2005 au sujet du TGF- β : “*if one...views...the principal function of TGF- β signaling to be an arbiter of the response to the many other environmental signals that act on a cell at any given time*” et “*...it is important to remember that the effects of TGF- β on converging signaling cascades are often both dose and context dependent*”³⁶². Ces deux extraits prédisent tous les concepts importants que nos travaux ont soulevés au sujet de la signalisation cytokinique. Le temps, le lieu et la dose sont pourtant des variables négligées dans la plupart des modèles généralement utilisés et expliquent peut-être les échecs^{363,364} ou les succès mitigés³⁶⁵ des approches de blocage de cytokines en GVHD humaine. Ceci est même le cas pour le blocage du TNF- α , pourtant lui aussi souvent considéré comme une cytokine maîtresse, surtout dans la pathologie de la GVHD intestinale¹⁶¹.

Dans un article phare de 2001⁸⁵, Ron Germain écrivait : «*Here the argument is put forward that stochastic events, potent amplification mechanisms, feedback controls, and heterogeneity arising from spatially dispersed cell interactions give rise to many of the gross properties of the immune system*». De façon importante, on y décrivait les répercussions qu’avait la somme d’influences subtiles sur les phénotypes immunitaires. Dans l’article II, nous identifions *in-vitro* plusieurs effets indéniables, mais modestes de SMAD3 sur la prolifération et la différenciation de populations leucocytaires. Cependant, la somme de ces différences (et vraisemblablement les interactions entre elles) amenait des phénotypes dramatiquement différents après une AHCT (survie sans maladie ou mort). De façon un peu analogue, l’amalgame d’influences ou de variations subtiles peut déterminer l’état d’une cellule. Nos études de micro-puces d’ADNc révèlent que la modulation de gènes potentiellement importants pour le maintien de la tolérance des lymphocytes T CD4 n’est pas spectaculaire (la plupart de des gènes différentiellement exprimés l’étaient de 1.5 à 2 fois). Toutefois, il demeure possible que cette somme d’altérations converge en contextes physiologiques³².

En guise de conclusion à cette section, nous devons peut-être faire une mise en garde. Nos modèles murins, où une réponse à une cytokine est complètement absente ou sévèrement affectée par une déficience complète d’un médiateur central, sont utiles

afin de mettre en relief les fonctions les plus fondamentales des gènes en question. Par contre, ces modèles pourraient masquer les véritables rôles physiologiques de ces cytokines en permettant, par exemple, l'activation de voies alternatives habituellement non-physiologiques. Un exemple illustrant cette idée à merveille est l'étrange dualité des R-SMAD. En effet, SMAD2 et SMAD3 peuvent tous deux être activés de la même façon, se lier à SMAD4 et moduler la transcription. Cependant, leurs fonctions respectives diffèrent si on procède à des *knockdown* sélectifs (révélant généralement que SMAD3 est le médiateur principal de la transcription induite par TGF- β ^{366,367}). La relation est complexe, les deux R-SMAD pouvant notamment entrer en compétition³⁶⁸. En effet, on a pu démontrer en augmentant le ratio SMAD2/SMAD3 que les fonctions cytotostatiques de TGF- β (SMAD3-médiées) diminuaient³⁶⁹. De plus, on peut montrer que les actions de l'un ou de l'autre sur la transcription de certains gènes sont contraires (répression/activation)^{370,371}. Le temps et l'état de différenciation de cellules pourraient aussi jouer³⁷², SMAD3 ayant été proposé comme un médiateur de la réponse rapide suite à une stimulation par le TGF- β ³⁶⁶. On peut spéculer que l'absence de SMAD3 pourrait changer toute la transcription SMAD-dépendante en permettant à SMAD2 d'occuper un rôle qu'il n'a pas dans des contextes normaux. La biologie de modèles non-physiologiques peut donc nous induire en erreur.

La collecte d'une grande quantité de données quantitatives, idéalement dans des contextes physiologiques, suivi de simulation et de modélisation, pourrait nous aider à saisir plus précisément les interactions subtiles entre plusieurs variables qui déterminent les phénotypes. La voie TGF- β est déjà étudiée sous cet angle^{373,374} et la modélisation semble déjà offrir des hypothèses biologiquement vérifiables³⁷⁵⁻³⁷⁷.

Malgré toutes ces réserves, les approches actuelles peuvent tout de même nous livrer plusieurs connaissances utiles dont la pertinence bio-médicale est réelle.

10-Pertinence et applications

Nos travaux révèlent plusieurs éléments qui sont immédiatement pertinents pour notre compréhension et le traitement de la GVHD humaine. En effet, les problèmes liés à une mauvaise reconstitution hémato-lymphoïde post-AHCT (cytopénies,

immunodéficiences) sont fréquents³⁷⁸. L'implication possible d'une exposition à des concentrations élevées d'IFN- γ n'a pourtant jamais été soulevée. Il faudrait dans un premier temps établir des corrélations dans les niveaux d'IFN- γ sanguin et des signes d'une forte stimulation (par répression de l'IFN- γ R2 au niveau de l'ARNm par exemple) par ce dernier dans les leucocytes circulants ou mêmes présents dans d'autres spécimens (moelle osseuse, biopsie d'organes cibles). Il est possible que certaines variations interindividuelles et/ou des facteurs liés à la procédure comme telle (quantité de cellules T greffées par exemple) contribuent à faire varier le taux d'IFN- γ (ou la sensibilité des cellules à celui-ci) post-AHCT. Il est plausible que certains patients puissent bénéficier d'une manipulation des niveaux d'IFN- γ précocement post-greffe (par anticorps bloquants par exemple). Une diminution, et non un blocage total, pourrait peut-être permettre de limiter les effets négatifs de l'IFN- γ , sans toutefois perdre le rôle protecteur de ce dernier au niveau pulmonaire ou compromettre l'effet GVT. La somme des risques liés à un blocage de l'IFN- γ post-AHCT reste très grande. En effet, les barrières méthodologiques et surtout régulatrices³⁷⁹ touchant les essais cliniques visant la manipulation des processus physiopathologiques complexes sont encore nombreuses. Cependant, des essais cliniques sont en cours où l'efficacité d'anticorps monoclonaux anti-IFN- γ est évaluée (sclérose en plaque, maladie de Crohn, arthrite rhumatoïde et lupus)³⁸⁰. Dans certains de ces cas, le blocage de l'IFN- γ semble porter fruit sans causer d'effets secondaires catastrophiques (telle l'accumulation d'effecteurs lymphocytaires ou une inflammation pulmonaire). De façon plus prudente, les données que nous avons générées *in vivo* chez la souris pourraient être fort utiles dans les protocoles d'expansion et de différenciation de lymphocytes T *in vitro*. La thérapie cellulaire par transfert adoptif de lymphocytes est une approche contemporaine pour traiter certaines infections virales³⁸¹ et quelques néoplasies³⁸²⁻³⁸⁴. En effet, limiter la concentration d'IFN- γ à laquelle les cellules T sont exposées dans les phases précoces de leur stimulation pourrait favoriser leur survie après le transfert chez le patient et possiblement même la formation de cellules mémoires^{51,53,216}. Ce dernier aspect n'est pas à négliger car les protocoles actuels d'expansion de cellules T *ex-vivo* génèrent des effecteurs CD8 différenciés de façon terminale dont la survie *in vivo* est courte³⁸⁵.

La GVHD intestinale est une des, ou la plus importante des, complications de l'AHCT^{319,386}. La recherche de traitements efficaces demeure donc très active. Nos travaux ont révélé que l'IFN- γ (en agissant sur les cellules intestinales de l'hôte) et la signalisation TGF- β /SMAD3-dépendante (chez les cellules du donneur) sont des acteurs de premier plan dans la régulation de la GVHD intestinale. La relation d'antagonisme entre l'IFN- γ et le TGF- β semble en effet se révéler à merveille dans l'immunopathologie des maladies inflammatoires du colon^{387,388}, notamment en ayant des rôles opposés sur la différenciation Th1. Nos travaux montrent que l'IFN- γ a des effets délétères directs (voir 7.2.3) sur les cellules intestinales post AHCT. L'expression de SMAD3 dans les cellules du donneur a quant à lui un effet protecteur. Nous évoquons dans l'Article II qu'une stimulation de l'axe TGF- β /SMAD3 par des probiotiques pourrait se montrer salutaire^{389,390}. La recherche d'un effet thérapeutique localisé au niveau intestinal, sans risque d'effets secondaires à d'autres endroits, est souhaitable. D'ailleurs, des formulations de corticostéroïdes topiques ayant peu d'effets systémiques sont déjà incorporées dans nos approches actuelles pour le traitement de la GVHD intestinale³⁹¹. Nos travaux soulignent l'importance des cellules du système immunitaire inné dans la GVHD. Il est généralement reconnu que ces cellules arrivent tardivement dans le processus, bien après l'activation des lymphocytes T. Notre pharmacopée immunosuppressive moderne centrée sur l'inhibition de la calcineurine et l'inhibition de la synthèse des nucléotides est très efficace pour prévenir l'activation T. Cependant, ses effets sont beaucoup plus modestes pour traiter des processus inflammatoires établis comme la GVHD dans sa phase symptomatique³⁹². Bien que plusieurs approches soient en cours d'étude, le traitement de la GVHD, surtout de sa forme chronique, reste frustrant. Le « T centrisme » de notre conception de la GVHD est peut-être responsable de la lenteur de nos progrès. Pourtant, l'hypothèse selon laquelle les cellules du système immunitaire inné ont un rôle important à jouer n'est pas neuve. En effet, dès 1994, une petite étude³⁹³ laissait entrevoir que l'on pouvait traiter la GVHD réfractaire efficacement avec de l'IL-1RA recombinant. Par contre, un tel traitement donné en prophylaxie immédiatement après l'AHCT n'était pas efficace pour prévenir la GVHD³⁶³. Peut-être faut-il mettre au premier plan l'importance du temps dans la physiopathologie de la GVHD. L'inhibition de l'IL-1, cytokine centrale

de l'immunité innée, pourrait être utile durant la phase clinique de la GVHD alors que les cellules du système inné sont activement impliquées dans la propagation et la perpétuation de l'inflammation, mais inutile pendant la phase d'allorecognition des lymphocytes T. De plus, cibler le processus inflammasome/IL-1 β , un grand orchestrateur de l'inflammation plutôt que les cytokines effectrices comme le TNF- α pourrait s'avérer être un bon investissement.

Les changements transcriptionnels SMAD3-dépendants et notre découverte d'un lien entre SMAD3 et les étapes précoces de la réponse des lymphocytes T CD4 pourraient aussi trouver la route de la médecine translationnelle. En effet, et comme nous l'avons vu, les événements précoces de l'activation déterminent en grande partie la vie d'un lymphocyte T. Il est donc possible d'imaginer que la modulation de ces événements pourrait modifier le déroulement de la réponse immunitaire en entier. Le contrôle des voies métaboliques décrites plus haut a déjà montré un grand potentiel dans la génération de lymphocytes T CD8 mémoires *in vivo*^{352,394}. Un rapport récent évoque que l'ajout de TGF- β aux cultures d'expansion de lymphocytes T CD8 anti-tumoraux pourrait favoriser leur survie³⁹⁵. Cette dernière trouvaille est intrigante et mérite qu'on tente d'en découvrir les mécanismes sous-jacents. Nous pouvons toutefois soulever la possibilité que le TGF- β pourrait restreindre l'expression de T-bet et l'action de cytokines telles l'IFN- γ et l'IL-2 et ainsi limiter la différenciation terminale^{51,385}. La mobilisation de l'axe TGF- β /SMAD3 pourrait aussi être exploitée afin de générer des TReg³⁹⁶, en prenant bien garde cependant que les lymphocytes ainsi générés ne se reconvertissent pas en Th effecteurs après leur transfert³⁹⁷. La plasticité reste un enjeu d'envergure en immunothérapie adoptive.

Conclusion

La GVHD est une maladie complexe dont la mortalité et morbidité associées demeurent élevées. Les deux cytokines maîtresses l'IFN- γ et le TGF- β y jouent des rôles prépondérants. Nos travaux ont permis de raffiner nos connaissances au sujet des processus que celles-ci régulent. Dans les deux cas, nous avons pu entrevoir la grande complexité des processus impliqués. Cette complexité s'articule autour de variables telles le nombre, la nature et la plasticité des acteurs ainsi que les effets de doses et le temps. Ainsi, nous avons pu constater qu'il est impossible de se soustraire

du contexte. Au-delà de ces considérations philosophiques (mais bien réelles !), nos travaux ont mis en relief des éléments importants et pertinents pour la GVHD humaine, dont les rôles déterminants de l'IFN- γ et de l'axe TGF- β /SMAD3 dans la GVHD intestinale. À cet égard l'évocation d'une contribution neutrophilique est peut-être le fait saillant.

Cette thèse est rédigée au milieu d'un projet alliant génomique et immunologie cellulaire, dont le but est de mieux cerner les effets tolérogènes de SMAD3 chez les lymphocytes T CD4. Les hypothèses de travail ont émergé des données elles-mêmes, avant d'être raffinées par nos connaissances. Il en fut d'ailleurs de même dans le cas du lien possible entre SMAD3 et la GVHD¹⁷¹. Bien qu'idéalisées à l'heure actuelle³⁹⁸⁻⁴⁰⁰, les approches globales et non-biaisées permettent de générer, ou de raffiner, des hypothèses autrement difficiles à faire. En effet, notre habileté à générer des données et par conséquent des hypothèses a considérablement augmentée au cours des dernières années. Malheureusement, notre capacité à interpréter ces données accuse un retard certain. En effet, les outils méthodologiques servant à l'étude des phénomènes complexes ne nous permettent pas encore de bien traduire en sens ce que nous observons en signal. C'est à un niveau bien rudimentaire que les travaux soumis ici nous font réfléchir à la multiplicité des variables (types cellulaires, organes cibles, temps, dose, etc.). L'intégration et la modélisation de toutes ces variables en biologie et en médecine en est à ses premiers balbutiements^{401,402} et sera un défi colossal. Les gains potentiels, même d'une intégration partielle, sont toutefois immenses et pourront permettre un saut quantique dans notre compréhension du vivant. Pouvons-nous même oser penser que pour la première fois depuis des siècles, nous sommes capables d'entrevoir une ère post-réductionniste, où les systèmes complexes pourront être étudiés de façon globale ? Peut-être vivons-nous à une époque formidable...

Bibliographie

1. Abbas AK, Lichtman, A.H. ed Cellular and Molecular Immunology (ed Fifth Edition). Philadelphia: Saunders; 2003.
2. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296:301-305.
3. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296:298-300.
4. Burnet FM. Theories of immunity. *Perspect Biol Med*. 1960;3:447-458.
5. Silverstein AM, Rose NR. There is only one immune system! The view from immunopathology. *Semin Immunol*. 2000;12:173-178; discussion 257-344.
6. Metcalf D. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells*. 2007;25:2390-2395.
7. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327:291-295.
8. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2009;227:221-233.
9. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112:935-945.
10. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006;214:73-91.

11. Born WK, Yin Z, Hahn YS, Sun D, O'Brien RL. Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse. *J Immunol*. 2010;184:4055-4061.
12. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:427-439.
13. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2010;22:130-137.
14. Woodland DL, Kohlmeier JE. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:153-161.
15. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2010;11:21-27.
16. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2009;227:234-247.
17. Haring JS, Badovinac VP, Harty JT. Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity*. 2006;25:19-29.
18. Baxter AG, Hodgkin PD. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:439-446.
19. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619.
20. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2001;13:114-119.

21. Diehl L, Den Boer AT, van der Voort EI, Melief CJ, Offringa R, Toes RE. The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity. *J Mol Med.* 2000;78:363-371.
22. Behrens G, Li M, Smith CM, et al. Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:84-90.
23. Obar JJ, Lefrancois L. Early events governing memory CD8⁺ T-cell differentiation. *Int Immunol.* 2010.
24. Vig M, Kinet JP. Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol.* 2009;10:21-27.
25. Hermann-Kleiter N, Baier G. NFAT pulls the strings during CD4⁺ T helper cell effector functions. *Blood.* 2010;115:2989-2997.
26. Jones RG, Bui T, White C, et al. The proapoptotic factors Bax and Bak regulate T Cell proliferation through control of endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis. *Immunity.* 2007;27:268-280.
27. Jones RG, Thompson CB. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity.* 2007;27:173-178.
28. Rocha B, Tanchot C. Towards a cellular definition of CD8⁺ T-cell memory: the role of CD4⁺ T-cell help in CD8⁺ T-cell responses. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:259-263.
29. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8⁽⁺⁾ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4⁽⁺⁾ T-cell help. *Nature.* 2009;462:510-513.
30. van de Berg PJ, van Leeuwen EM, ten Berge IJ, van Lier R. Cytotoxic human CD4⁽⁺⁾ T cells. *Curr Opin Immunol.* 2008;20:339-343.

31. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007;13:1173-1175.
32. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-489.
33. Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:91-105.
34. Lee YK, Turner H, Maynard CL, et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity.* 2009;30:92-107.
35. Wei G, Wei L, Zhu J, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity.* 2009;30:155-167.
36. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity.* 1998;9:745-755.
37. Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity.* 2003;18:415-428.
38. Usui T, Preiss JC, Kanno Y, et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med.* 2006;203:755-766.

39. Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol.* 2007;8:145-153.
40. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science.* 2005;307:430-433.
41. Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:146-152.
42. Frucht DM, Aringer M, Galon J, et al. Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. *J Immunol.* 2000;164:4659-4664.
43. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:15137-15142.
44. Suto A, Wurster AL, Reiner SL, Grusby MJ. IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J Immunol.* 2006;177:3721-3727.
45. Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity.* 2001;14:205-215.
46. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol.* 2010;10:225-235.
47. Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology.* 2010;130:166-171.

48. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*. 1995;2:271-279.
49. Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*. 2000;95:231-240.
50. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*. 2002;295:338-342.
51. Joshi NS, Cui W, Chandele A, et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity*. 2007;27:281-295.
52. Weant AE, Michalek RD, Khan IU, Holbrook BC, Willingham MC, Grayson JM. Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8⁺ T cell contraction. *Immunity*. 2008;28:218-230.
53. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol*. 2002;3:619-626.
54. Parish IA, Kaech SM. Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:291-297.
55. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol*. 2001;2:415-422.

56. Badovinac VP, Haring JS, Harty JT. Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity*. 2007;26:827-841.
57. Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:217-225.
58. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*. 2007;315:1687-1691.
59. van Leeuwen EM, Sprent J, Surh CD. Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:167-172.
60. Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zajac AJ, Weaver CT. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. *Nature*. 2008;452:356-360.
61. Lohning M, Hegazy AN, Pinschewer DD, et al. Long-lived virus-reactive memory T cells generated from purified cytokine-secreting T helper type 1 and type 2 effectors. *J Exp Med*. 2008;205:53-61.
62. Celli S, Lemaitre F, Bousso P. Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation. *Immunity*. 2007;27:625-634.
63. Mathis D, Benoist C. Levees of immunological tolerance. *Nat Immunol*. 2010;11:3-6.
64. von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2010;11:14-20.
65. Lee JW, Epardaud M, Sun J, et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol*. 2007;8:181-190.

66. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* 1999;5:1249-1255.
67. Venuprasad K. Cbl-b and itch: key regulators of peripheral T-cell tolerance. *Cancer Res.* 2010;70:3009-3012.
68. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity.* 1997;6:411-417.
69. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006;12:1198-1202.
70. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity.* 2007;27:670-684.
71. Murrack P, Kappler J. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:765-787.
72. Meunier MC, Baron C, Perreault C. Two host factors regulate persistence of H7-specific T cells injected in tumor-bearing mice. *PLoS One.* 2009;4:e4116.
73. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11:7-13.
74. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood.* 2010;115:4293-4301.

75. Venet F, Chung CS, Monneret G, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol.* 2008;83:523-535.
76. Pillai AB, George TI, Dutt S, Strober S. Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood.* 2009;113:4458-4467.
77. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 2009;16:183-194.
78. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 2005;23:344-346.
79. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:162-174.
80. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev.* 2008;222:206-221.
81. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:170-181.
82. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, et al. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med.* 2007;204:273-283.
83. Zhao J, Yang X, Auh SL, Kim KD, Tang H, Fu YX. Do adaptive immune cells suppress or activate innate immunity? *Trends Immunol.* 2009;30:8-12.
84. Benoist C, Germain RN, Mathis D. A plaidoyer for 'systems immunology'. *Immunol Rev.* 2006;210:229-234.

85. Germain RN. The art of the probable: system control in the adaptive immune system. *Science*. 2001;293:240-245.
86. De Tomaso AW, Nyholm SV, Palmeri KJ, et al. Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus. *Nature*. 2005;438:454-459.
87. Horton R, Wilming L, Rand V, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004;5:889-899.
88. Havlicek J, Roberts SC. MHC-correlated mate choice in humans: a review. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:497-512.
89. Piertney SB, Oliver MK. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*. 2006;96:7-21.
90. Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:11260-11264.
91. Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D. HLA and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:370-385, Table of Contents.
92. Trowsdale J. The gentle art of gene arrangement: the meaning of gene clusters. *Genome Biol*. 2002;3:COMMENT2002.
93. Pietra G, Romagnani C, Moretta L, Mingari MC. HLA-E and HLA-E-bound peptides: recognition by subsets of NK and T cells. *Curr Pharm Des*. 2009;15:3336-3344.

94. Rohrllich PS, Fazilleau N, Ginhoux F, et al. Direct recognition by alphabeta cytolytic T cells of Hfe, a MHC class Ib molecule without antigen-presenting function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12855-12860.
95. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:781-790.
96. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:607-618.
97. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:109-117.
98. Blanchard N, Shastri N. Cross-presentation of peptides from intracellular pathogens by MHC class I molecules. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:237-250.
99. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*. 2003;425:402-406.
100. Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*. 1991;353:622-627.
101. Goulmy E. Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer. *Hum Immunol*. 2006;67:433-438.
102. Takacs L, Szende B, Rot A, Diamanstein T. Expression of MHC class II antigens on bile duct epithelium in experimental graft versus host disease. *Clin Exp Immunol*. 1985;60:449-456.
103. Turesson C. Endothelial expression of MHC class II molecules in autoimmune disease. *Curr Pharm Des*. 2004;10:129-143.

104. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:833-844.
105. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:127-135.
106. Mathis D, Benoist C. Aire. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:287-312.
107. McMahan RH, Slansky JE. Mobilizing the low-avidity T cell repertoire to kill tumors. *Semin Cancer Biol.* 2007;17:317-329.
108. Suresh M, Whitmire JK, Harrington LE, et al. Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory. *J Immunol.* 2001;167:5565-5573.
109. Meunier MC, Delisle JS, Bergeron J, Rineau V, Baron C, Perreault C. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med.* 2005;11:1222-1229.
110. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 2008;27:5904-5912.
111. Smith TR, Kumar V. Revival of CD8⁺ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol.* 2008;29:337-342.
112. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986;319:675-678.
113. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;112:461-469.

114. Hong S, Scherer DC, Singh N, et al. Lipid antigen presentation in the immune system: lessons learned from CD1d knockout mice. *Immunol Rev.* 1999;169:31-44.
115. Bleakley M, Otterud BE, Richardt JL, et al. Leukemia-associated minor histocompatibility antigen discovery using T-cell clones isolated by in vitro stimulation of naive CD8⁺ T cells. *Blood.* 2010.
116. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:371-380.
117. McCarroll SA, Bradner JE, Turpeinen H, et al. Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease. *Nat Genet.* 2009;41:1341-1344.
118. Barth R, Counce S, Smith P, Snell GD. Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *Ann Surg.* 1956;144:198-204.
119. Simpson E, Scott D, James E, et al. Minor H antigens: genes and peptides. *Transpl Immunol.* 2002;10:115-123.
120. Glotz D, Antoine C, Duboust A. Antidonator antibodies and transplantation: how to deal with them before and after transplantation. *Transplantation.* 2005;79:S30-32.
121. Zorn E, Miklos DB, Floyd BH, et al. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med.* 2004;199:1133-1142.
122. Blume KG, Forman, S.J., Appelbaum, F.R. ed Thomas' Hematopoietic cell Transplantation (ed Third). Malden: Blackwell Science; 2004.

123. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*. 2007;69:545-556.
124. Sonnenday CJ, Warren DS, Cooper M, et al. Plasmapheresis, CMV hyperimmune globulin, and anti-CD20 allow ABO-incompatible renal transplantation without splenectomy. *Am J Transplant*. 2004;4:1315-1322.
125. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*. 1999;55:713-723.
126. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation*. 2006;81:643-654.
127. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*. 2004;4:438-443.
128. Smith PA, Brunmark A, Jackson MR, Potter TA. Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL). *J Exp Med*. 1997;185:1023-1033.
129. Schneck J, Munitz T, Coligan JE, Maloy WL, Margulies DH, Singer A. Inhibition of allorecognition by an H-2Kb-derived peptide is evidence for a T-cell binding region on a major histocompatibility complex molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:8516-8520.
130. Opelz G, Dohler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation*. 2007;84:137-143.

131. Smyth LA, Herrera OB, Golshayan D, Lombardi G, Lechler RI. A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases. *Transplantation*. 2006;82:S15-18.
132. de la Morena MT, Gatti RA. A history of bone marrow transplantation. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30:1-15.
133. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956;177:452-454.
134. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res*. 1965;25:1525-1531.
135. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257:491-496.
136. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112:4371-4383.
137. Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Massenkeil G. Allogeneic stem cell transplantation for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6:1449-1458.
138. Paczesny S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:1-11.
139. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966;62:21-78.

140. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999;285:412-415.
141. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:340-352.
142. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med*. 1998;339:1177-1185.
143. Kanda Y, Chiba S, Hirai H, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood*. 2003;102:1541-1547.
144. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, et al. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol*. 2006;24:5695-5702.
145. Hoffman R, Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E., McGlave, P. ed *Hematology, Basic Principles and Practice* (ed third). Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.
146. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102:756-762.
147. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373:1550-1561.

148. Martin PJ. Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach. *Keio J Med.* 2008;57:177-183.
149. Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood.* 2005;105:2227-2234.
150. Matte CC, Liu J, Cormier J, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med.* 2004;10:987-992.
151. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG. Host-reactive CD8⁺ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2005;11:1299-1305.
152. Atkinson K, Farrell C, Chapman G, Downs K, Penny R, Biggs J. Female marrow donors increase the risk of acute graft-versus-host disease: effect of donor age and parity and analysis of cell subpopulations in the donor marrow inoculum. *Br J Haematol.* 1986;63:231-239.
153. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood.* 2010;115:3861-3868.
154. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2002;196:389-399.
155. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med.* 2003;9:1144-1150.

156. Yi T, Chen Y, Wang L, et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114:3101-3112.
157. Nikolic B, Lee S, Bronson RT, Grusby MJ, Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest*. 2000;105:1289-1298.
158. Tsukada N, Kobata T, Aizawa Y, Yagita H, Okumura K. Graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1999;93:2738-2747.
159. Schmaltz C, Alpdogan O, Horndasch KJ, et al. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2001;97:2886-2895.
160. van Den Brink MR, Moore E, Horndasch KJ, et al. Fas-deficient *lpr* mice are more susceptible to graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2000;164:469-480.
161. Schmaltz C, Alpdogan O, Muriglan SJ, et al. Donor T cell-derived TNF is required for graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity after bone marrow transplantation. *Blood*. 2003;101:2440-2445.
162. Zecher D, van Rooijen N, Rothstein DM, Shlomchik WD, Lakkis FG. An innate response to allogeneic nonself mediated by monocytes. *J Immunol*. 2009;183:7810-7816.
163. Vogelsang GB. How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2001;97:1196-1201.

164. Zhang Y, Hexner E, Frank D, Emerson SG. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2007;179:3305-3314.
165. Hard RC, Jr., Kullgren B. Etiology, pathogenesis, and prevention of a fatal host-versus-graft syndrome in parent-F1 mouse chimeras. *Am J Pathol.* 1970;59:203-224.
166. Keil F, Haas OA, Fritsch G, et al. Donor leukocyte infusion for leukemic relapse after allogeneic marrow transplantation: lack of residual donor hematopoiesis predicts aplasia. *Blood.* 1997;89:3113-3117.
167. Kim DH, Sohn SK, Won DI, Lee NY, Suh JS, Lee KB. Rapid helper T-cell recovery above $200 \times 10^6/l$ at 3 months correlates to successful transplant outcomes after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:1119-1128.
168. Berger M, Figari O, Bruno B, et al. Lymphocyte subsets recovery following allogeneic bone marrow transplantation (BMT): CD4+ cell count and transplant-related mortality. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:55-62.
169. Brochu S, Rioux-Masse B, Roy J, Roy DC, Perreault C. Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood.* 1999;94:390-400.
170. Cavazzana-Calvo M, Andre-Schmutz I, Hacein-Bey-Abina S, Bensoussan D, Le Deist F, Fischer A. Improving immune reconstitution while preventing graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation. *Semin Hematol.* 2002;39:32-40.

171. Baron C, Somogyi R, Greller LD, et al. Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene-expression profiling. *PLoS Med.* 2007;4:e23.
172. Dickinson AM, Holler E. Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21:149-164.
173. Dickinson AM, Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:517-525.
174. Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, et al. The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet.* 2008;35:381-384.
175. Dickinson AM. Non-HLA genetics and predicting outcome in HSCT. *Int J Immunogenet.* 2008;35:375-380.
176. Nguyen Y, Al-Lehibi A, Gorbe E, et al. Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease-associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation. *Blood.* 2010;115:3625-3631.
177. Valente G, Ozmen L, Novelli F, et al. Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur J Immunol.* 1992;22:2403-2412.
178. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:375-386.
179. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75:163-189.

180. Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 2010;50:1-14.
181. Maher SG, Romero-Weaver AL, Scarzello AJ, Gamero AM. Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem*. 2007;14:1279-1289.
182. Robertson G, Hirst M, Bainbridge M, et al. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods*. 2007;4:651-657.
183. Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*. 2002;23:96-101.
184. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*. 1996;84:431-442.
185. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*. 1996;84:443-450.
186. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:7556-7561.
187. Gil MP, Bohn E, O'Guin AK, et al. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6680-6685.
188. Huang S, Hendriks W, Althage A, et al. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*. 1993;259:1742-1745.

189. Dorman SE, Picard C, Lammas D, et al. Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet*. 2004;364:2113-2121.
190. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med*. 2002;196:129-134.
191. Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, et al. Interferon-gamma and cancer immunoediting. *Immunol Res*. 2005;32:231-245.
192. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450:903-907.
193. Haas C, Ryffel B, Le Hir M. IFN-gamma receptor deletion prevents autoantibody production and glomerulonephritis in lupus-prone (NZB x NZW)F1 mice. *J Immunol*. 1998;160:3713-3718.
194. Hultgren B, Huang X, Dybdal N, Stewart TA. Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 1996;45:812-817.
195. Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol*. 2000;164:2759-2768.
196. Boissier MC, Chiochia G, Bessis N, et al. Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*. 1995;25:1184-1190.
197. Taieb J, Chaput N, Menard C, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med*. 2006;12:214-219.

198. Chan CW, Crafton E, Fan HN, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med.* 2006;12:207-213.
199. Car BD, Eng VM, Schnyder B, et al. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J Exp Med.* 1994;179:1437-1444.
200. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood.* 2006;107:2570-2577.
201. Issekutz TB. Effects of six different cytokines on lymphocyte adherence to microvascular endothelium and in vivo lymphocyte migration in the rat. *J Immunol.* 1990;144:2140-2146.
202. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis.* 2003;8:237-249.
203. Harvat BL, Seth P, Jetten AM. The role of p27Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells. *Oncogene.* 1997;14:2111-2122.
204. Mandal M, Bandyopadhyay D, Goepfert TM, Kumar R. Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene.* 1998;16:217-225.
205. Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, et al. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 2000;19:263-272.

206. Zeng W, Miyazato A, Chen G, Kajigaya S, Young NS, Maciejewski JP. Interferon-gamma-induced gene expression in CD34 cells: identification of pathologic cytokine-specific signature profiles. *Blood*. 2006;107:167-175.
207. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*. 2006;108:2509-2519.
208. Baldrige MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature*. 2010;465:793-797.
209. Cowdery JS, Boerth NJ, Norian LA, Myung PS, Koretzky GA. Differential regulation of the IL-12 p40 promoter and of p40 secretion by CpG DNA and lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1999;162:6770-6775.
210. Salkowski CA, Thomas KE, Cody MJ, Vogel SN. Impaired IFN-gamma production in IFN regulatory factor-1 knockout mice during endotoxemia is secondary to a loss of both IL-12 and IL-12 receptor expression. *J Immunol*. 2000;165:3970-3977.
211. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-795.
212. Hollenbaugh JA, Dutton RW. IFN-gamma regulates donor CD8 T cell expansion, migration, and leads to apoptosis of cells of a solid tumor. *J Immunol*. 2006;177:3004-3011.
213. Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med*. 2005;201:1053-1059.

214. Haring JS, Corbin GA, Harty JT. Dynamic regulation of IFN-gamma signaling in antigen-specific CD8+ T cells responding to infection. *J Immunol.* 2005;174:6791-6802.
215. Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med.* 2002;196:999-1005.
216. Badovinac VP, Tvinnereim AR, Harty JT. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science.* 2000;290:1354-1358.
217. Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2000;192:123-128.
218. Dalton DK, Haynes L, Chu CQ, Swain SL, Wittmer S. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med.* 2000;192:117-122.
219. Blais ME, Brochu S, Giroux M, et al. Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different. *J Immunol.* 2008;180:2299-2312.
220. Asavaroengchai W, Wang H, Wang S, et al. An essential role for IFN-gamma in regulation of alloreactive CD8 T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:46-55.
221. Wang H, Asavaroengchai W, Yeap BY, et al. Paradoxical effects of IFN-gamma in graft-versus-host disease reflect promotion of lymphohematopoietic graft-versus-host reactions and inhibition of epithelial tissue injury. *Blood.* 2009;113:3612-3619.

222. Yang YG, Dey BR, Sergio JJ, Pearson DA, Sykes M. Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J Clin Invest.* 1998;102:2126-2135.
223. Ellison CA, Bradley DS, Fischer JM, Hayglass KT, Gartner JG. Murine graft-versus-host disease induced using interferon-gamma-deficient grafts features antibodies to double-stranded DNA, T helper 2-type cytokines and hypereosinophilia. *Immunology.* 2002;105:63-72.
224. Ellison CA, Fischer JM, HayGlass KT, Gartner JG. Murine graft-versus-host disease in an F1-hybrid model using IFN-gamma gene knockout donors. *J Immunol.* 1998;161:631-640.
225. Ellison CA, Natuik SA, McIntosh AR, Scully SA, Danilenko DM, Gartner JG. The role of interferon-gamma, nitric oxide and lipopolysaccharide in intestinal graft-versus-host disease developing in F1-hybrid mice. *Immunology.* 2003;109:440-449.
226. Yang YG, Wang H, Asavaroengchai W, Dey BR. Role of Interferon-gamma in GVHD and GVL. *Cell Mol Immunol.* 2005;2:323-329.
227. Ichiba T, Teshima T, Kuick R, et al. Early changes in gene expression profiles of hepatic GVHD uncovered by oligonucleotide microarrays. *Blood.* 2003;102:763-771.
228. Burman AC, Banovic T, Kuns RD, et al. IFN-gamma differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood.* 2007;110:1064-1072.
229. Schmierer B, Hill CS. TGF-beta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:970-982.

230. Newfeld SJ, Wisotzkey RG, Kumar S. Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers. *Genetics*. 1999;152:783-795.
231. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.
232. Pesu M, Watford WT, Wei L, et al. T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature*. 2008;455:246-250.
233. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003;116:217-224.
234. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005;19:2783-2810.
235. Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell*. 2002;110:19-32.
236. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:659-693.
237. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*. 2003;5:410-421.
238. Massague J. Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev*. 2003;17:2993-2997.

239. Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*. 2004;117:211-223.
240. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. 2008;134:392-404.
241. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992;359:693-699.
242. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:770-774.
243. Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T, et al. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood*. 1996;87:1439-1445.
244. Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity*. 2000;12:171-181.
245. Chen CH, Seguin-Devaux C, Burke NA, et al. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp Med*. 2003;197:1689-1699.
246. McKarns SC, Schwartz RH, Kaminski NE. Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J Immunol*. 2004;172:4275-4284.
247. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 2005;8:369-380.

248. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol.* 2000;165:4773-4777.
249. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity.* 2006;25:455-471.
250. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol.* 2008;9:194-202.
251. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441:235-238.
252. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 2008;29:44-56.
253. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007;26:579-591.
254. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
255. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007;8:1390-1397.

256. Longenecker G, Thyagarajan T, Nagineni CN, et al. Endocrine expression of the active form of TGF-beta1 in the TGF-beta1 null mice fails to ameliorate lethal phenotype. *Cytokine*. 2002;18:43-50.
257. Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, et al. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol*. 1986;136:3916-3920.
258. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol*. 2005;6:600-607.
259. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:4120-4125.
260. Kaplan DH, Li MO, Jenison MC, Shlomchik WD, Flavell RA, Shlomchik MJ. Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 2007;204:2545-2552.
261. Strobl H, Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect*. 1999;1:1283-1290.
262. Geissmann F, Revy P, Regnault A, et al. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol*. 1999;162:4567-4575.
263. Belladonna ML, Volpi C, Bianchi R, et al. Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J Immunol*. 2008;181:5194-5198.

264. Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, Arditi M. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Biol Chem.* 2005;280:5491-5495.
265. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature.* 1988;334:260-262.
266. Bottalico LA, Wager RE, Agellon LB, Assoian RK, Tabas I. Transforming growth factor-beta 1 inhibits scavenger receptor activity in THP-1 human macrophages. *J Biol Chem.* 1991;266:22866-22871.
267. Tridandapani S, Wardrop R, Baran CP, et al. TGF-beta 1 suppresses myeloid Fc gamma receptor function by regulating the expression and function of the common gamma-subunit. *J Immunol.* 2003;170:4572-4577.
268. Takeuchi M, Alard P, Streilein JW. TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1998;160:1589-1597.
269. Shah AH, Tabayoyong WB, Kimm SY, Kim SJ, Van Parijs L, Lee C. Reconstitution of lethally irradiated adult mice with dominant negative TGF-beta type II receptor-transduced bone marrow leads to myeloid expansion and inflammatory disease. *J Immunol.* 2002;169:3485-3491.
270. Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, et al. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J Clin Invest.* 1996;98:2109-2119.
271. Li L, Iwamoto Y, Berezovskaya A, Boussiotis VA. A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27Kip1 and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance. *Nat Immunol.* 2006;7:1157-1165.

272. Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell*. 1998;94:703-714.
273. Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol*. 1999;19:2495-2504.
274. Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J*. 1999;18:1280-1291.
275. Martinez GJ, Zhang Z, Chung Y, et al. Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J Biol Chem*. 2009;284:35283-35286.
276. Trotta R, Col JD, Yu J, et al. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J Immunol*. 2008;181:3784-3792.
277. Yu J, Wei M, Becknell B, et al. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity*. 2006;24:575-590.
278. Ramesh S, Qi XJ, Wildey GM, et al. TGF beta-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. *EMBO Rep*. 2008;9:990-997.
279. Al-Salleeh F, Petro TM. Promoter analysis reveals critical roles for SMAD-3 and ATF-2 in expression of IL-23 p19 in macrophages. *J Immunol*. 2008;181:4523-4533.

280. Asai O, Longo DL, Tian ZG, et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1998;101:1835-1842.
281. Banovic T, MacDonald KP, Morris ES, et al. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood*. 2005;106:2206-2214.
282. McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol*. 1999;163:5693-5699.
283. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, et al. Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30:665-671.
284. Li Q, Zhai Z, Xu X, et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res*. 2010.
285. Takaki H, Minoda Y, Koga K, Takaesu G, Yoshimura A, Kobayashi T. TGF-beta1 suppresses IFN-gamma-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation. *Genes Cells*. 2006;11:871-882.
286. Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*. 1999;397:710-713.

287. Reardon C, McKay DM. TGF-beta suppresses IFN-gamma-STAT1-dependent gene transcription by enhancing STAT1-PIAS1 interactions in epithelia but not monocytes/macrophages. *J Immunol.* 2007;178:4284-4295.
288. Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Chen S, Varga J. Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta. Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators. *J Biol Chem.* 2001;276:11041-11048.
289. Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, Nakao A, Kaneko H, Nakatsuka I. Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J Biol Chem.* 2003;278:43470-43479.
290. Park IK, Shultz LD, Letterio JJ, Gorham JD. TGF-beta1 inhibits T-bet induction by IFN-gamma in murine CD4+ T cells through the protein tyrosine phosphatase Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1. *J Immunol.* 2005;175:5666-5674.
291. Tanaka K, Ichiyama K, Hashimoto M, et al. Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads. *J Immunol.* 2008;180:3746-3756.
292. Puliaev R, Nguyen P, Finkelman FD, Via CS. Differential requirement for IFN-gamma in CTL maturation in acute murine graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2004;173:910-919.
293. Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J Exp Med.* 1999;189:231-239.

294. Sanjabi S, Mosaheb MM, Flavell RA. Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity*. 2009;31:131-144.
295. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*. 2009;31:539-550.
296. Ogawa K, Funaba M, Tsujimoto M. Suppression of NF-kappaB and IRF-1-induced transcription of the murine IL-12 p40 by transforming growth factor-beta Smad pathway in macrophages. *Mol Cell Biochem*. 2008;308:9-15.
297. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*. 2009;10:595-602.
298. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing T H 17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2009;66:390-402.
299. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:883-889.
300. Korngold R, Sprent J. Variable capacity of L3T4+ T cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. *J Exp Med*. 1987;165:1552-1564.
301. Flaishon L, Topilski I, Shoseyov D, et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. *J Immunol*. 2002;168:3707-3711.
302. Rottman M, Soudais C, Vogt G, et al. IFN-gamma mediates the rejection of haematopoietic stem cells in IFN-gammaR1-deficient hosts. *PLoS Med*. 2008;5:e26.

303. Tang Y, Desierto MJ, Chen J, Young NS. The role of the Th1 transcription factor T-bet in a mouse model of immune-mediated bone-marrow failure. *Blood*. 2010;115:541-548.
304. Pawliuk R, Eaves C, Humphries RK. Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood*. 1996;88:2852-2858.
305. Whitmire JK, Benning N, Whitton JL. Cutting edge: early IFN-gamma signaling directly enhances primary antiviral CD4+ T cell responses. *J Immunol*. 2005;175:5624-5628.
306. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol*. 2004;5:809-817.
307. Brok HP, Vossen JM, Heidt PJ. IFN-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: pharmacodynamic studies and influence on proliferative capacity of chimeric spleen cells. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:1005-1010.
308. Bourdeau V, Deschenes J, Laperriere D, Aid M, White JH, Mader S. Mechanisms of primary and secondary estrogen target gene regulation in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:76-93.
309. Feuerer M, Eulenburg K, Loddenkemper C, Hamann A, Huehn J. Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J Immunol*. 2006;176:2857-2863.
310. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:762-774.

311. Welniak LA, Blazar BR, Anver MR, Wiltout RH, Murphy WJ. Opposing roles of interferon-gamma on CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease: effects of conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6:604-612.
312. Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Shlomchik MJ, Shlomchik WD. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. *J Immunol.* 2004;173:5467-5475.
313. Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev.* 2000;174:47-62.
314. Park S, Murray D, John B, Crispe IN. Biology and significance of T-cell apoptosis in the liver. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:74-83.
315. Yang YG, Qi J, Wang MG, Sykes M. Donor-derived interferon gamma separates graft-versus-leukemia effects and graft-versus-host disease induced by donor CD8 T cells. *Blood.* 2002;99:4207-4215.
316. Yang YG, Sergio JJ, Pearson DA, Szot GL, Shimizu A, Sykes M. Interleukin-12 preserves the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells while inhibiting CD4-dependent graft-versus-host disease in mice. *Blood.* 1997;90:4651-4660.
317. Satake A, Inoue T, Kubo S, et al. Separation of antileukemic effects from graft-versus-host disease in MHC-haploidentical murine bone marrow transplantation: participation of host immune cells. *Int J Hematol.* 2010;91:485-497.
318. Matte-Martone C, Liu J, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. CD8+ but not CD4+ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4+ and CD8+ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL. *Blood.* 2008;111:3884-3892.

319. Martin PJ, McDonald GB, Sanders JE, et al. Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10:320-327.
320. Nava P, Koch S, Laukoetter MG, et al. Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity.* 2010;32:392-402.
321. Wysocki CA, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood.* 2005;105:4191-4199.
322. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood.* 2009;113:1365-1374.
323. Penack O, Henke E, Suh D, et al. Inhibition of neovascularization to simultaneously ameliorate graft-vs-host disease and decrease tumor growth. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:894-908.
324. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6:1191-1197.
325. Gilmour JS, Coutinho AE, Cailhier JF, et al. Local amplification of glucocorticoids by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol.* 2006;176:7605-7611.
326. Muhl H, Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int Immunopharmacol.* 2003;3:1247-1255.

327. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 2002;109:41-50.
328. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101:890-898.
329. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell.* 2010;140:871-882.
330. Goyal R, Bulua AC, Nikolov NP, Schwartzberg PL, Siegel RM. Rheumatologic and autoimmune manifestations of primary immunodeficiency disorders. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21:78-84.
331. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140:821-832.
332. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2007;356:1517-1526.
333. Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol.* 2004;127:479-490.
334. Guarda G, Dostert C, Staehli F, et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature.* 2009;460:269-273.
335. Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA, et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296:G1248-1257.

336. Socie G, Mary JY, Lemann M, et al. Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and Fas expression. *Blood*. 2004;103:50-57.
337. Shen L, Smith JM, Shen Z, Eriksson M, Sentman C, Wira CR. Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Immunol*. 2007;149:155-161.
338. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isenmann S, Vadas MA, Gamble JR. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol*. 1996;157:360-368.
339. Muller I, Munder M, Kropf P, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol*. 2009;30:522-530.
340. McKarns SC, Schwartz RH. Distinct effects of TGF-beta 1 on CD4+ and CD8+ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3. *J Immunol*. 2005;174:2071-2083.
341. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*. 2004;172:5149-5153.
342. Park IK, Letterio JJ, Gorham JD. TGF-beta 1 inhibition of IFN-gamma-induced signaling and Th1 gene expression in CD4+ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent. *Mol Immunol*. 2007;44:3283-3290.

343. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*. 2008;453:236-240.
344. Fraser ID, Germain RN. Navigating the network: signaling cross-talk in hematopoietic cells. *Nat Immunol*. 2009;10:327-331.
345. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:690-702.
346. Bommireddy R, Ormsby I, Yin M, Boivin GP, Babcock GF, Doetschman T. TGF beta 1 inhibits Ca²⁺-calcineurin-mediated activation in thymocytes. *J Immunol*. 2003;170:3645-3652.
347. Zheng Y, Delgoffe GM, Meyer CF, Chan W, Powell JD. Anergic T cells are metabolically anergic. *J Immunol*. 2009;183:6095-6101.
348. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*. 2009;30:832-844.
349. Pescovitz MD, Nezakatgoo N, Lorber MI, et al. Prospective observational study of sirolimus as primary immunosuppression after renal transplantation. *Transplantation*. 2009;88:1010-1018.
350. Rodriguez R, Nakamura R, Palmer JM, et al. A phase II pilot study of tacrolimus/sirolimus GVHD prophylaxis for sibling donor hematopoietic stem cell transplantation using 3 conditioning regimens. *Blood*. 2010;115:1098-1105.
351. Rostaing L, Kamar N. mTOR inhibitor/proliferation signal inhibitors: entering or leaving the field? *J Nephrol*. 2010;23:133-142.

352. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*. 2009;460:103-107.
353. Peng SL. Foxo in the immune system. *Oncogene*. 2008;27:2337-2344.
354. Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, et al. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 2010;463:676-680.
355. Ouyang W, Beckett O, Flavell RA, Li MO. An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity*. 2009;30:358-371.
356. Lin L, Hron JD, Peng SL. Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity*. 2004;21:203-213.
357. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Paik JH, Depinho RA, Li MO. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2010;11:618-627.
358. Harada Y, Elly C, Ying G, Paik JH, Depinho RA, Liu YC. Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2010.
359. Liu T, Zimmerman KK, Patterson GI. Regulation of signaling genes by TGFbeta during entry into dauer diapause in *C. elegans*. *BMC Dev Biol*. 2004;4:11.
360. Shaw WM, Luo S, Landis J, Ashraf J, Murphy CT. The *C. elegans* TGF-beta Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling. *Curr Biol*. 2007;17:1635-1645.

361. Park D, Estevez A, Riddle DL. Antagonistic Smad transcription factors control the dauer/non-dauer switch in *C. elegans*. *Development*. 2010;137:477-485.
362. Letterio JJ. TGF-beta signaling in T cells: roles in lymphoid and epithelial neoplasia. *Oncogene*. 2005;24:5701-5712.
363. Antin JH, Weisdorf D, Neuberg D, et al. Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2002;100:3479-3482.
364. Couriel DR, Saliba R, de Lima M, et al. A phase III study of infliximab and corticosteroids for the initial treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:1555-1562.
365. Rager A, Frey N, Goldstein SC, et al. Inflammatory cytokine inhibition with combination daclizumab and infliximab for steroid-refractory acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010.
366. Yang YC, Piek E, Zavadil J, et al. Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:10269-10274.
367. Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem*. 2007;101:9-33.
368. Yu J, Zhang L, Chen A, et al. Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF-beta-Smad2/3-Smad4 signaling. *J Cell Physiol*. 2008;215:422-433.
369. Kim SG, Kim HA, Jong HS, et al. The endogenous ratio of Smad2 and Smad3 influences the cytostatic function of Smad3. *Mol Biol Cell*. 2005;16:4672-4683.

370. Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L. Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell*. 1998;2:109-120.
371. Petersen M, Pardali E, van der Horst G, et al. Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2010;29:1351-1361.
372. Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem*. 2003;278:11721-11728.
373. Clarke DC, Betterton MD, Liu X. Systems theory of Smad signalling. *Syst Biol (Stevenage)*. 2006;153:412-424.
374. Clarke DC, Liu X. Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling. *Trends Cell Biol*. 2008;18:430-442.
375. Zi Z, Klipp E. Constraint-based modeling and kinetic analysis of the Smad dependent TGF-beta signaling pathway. *PLoS ONE*. 2007;2:e936.
376. Kahlem P, Newfeld SJ. Informatics approaches to understanding TGFbeta pathway regulation. *Development*. 2009;136:3729-3740.
377. Schmierer B, Tournier AL, Bates PA, Hill CS. Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:6608-6613.

378. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med.* 2003;54:29-52.
379. Levinson AD. Cancer therapy reform. *Science.* 2010;328:137.
380. Miller CH, Maher SG, Young HA. Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1182:69-79.
381. Heslop HE, Bollard CM, Gottschalk S, et al. Immune therapy for EBV infections after hemopoietic stem-cell transplant. *Cytotherapy.* 2002;4:433-434.
382. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood.* 2010;115:925-935.
383. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:299-308.
384. Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood.* 2010;115:3869-3878.
385. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 2005;115:1616-1626.
386. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2000;95:2754-2759.

387. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med.* 2002;195:1129-1143.
388. Strober W, Kelsall B, Fuss I, et al. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today.* 1997;18:61-64.
389. Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2004;34:1059-1067.
390. Fujii T, Ohtsuka Y, Lee T, et al. Bifidobacterium breve enhances transforming growth factor beta1 signaling by regulating Smad7 expression in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43:83-88.
391. Hockenbery DM, Cruickshank S, Rodell TC, et al. A randomized, placebo-controlled trial of oral beclomethasone dipropionate as a prednisone-sparing therapy for gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood.* 2007;109:4557-4563.
392. Koc S, Leisenring W, Flowers ME, et al. Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood.* 2002;100:48-51.
393. Antin JH, Weinstein HJ, Guinan EC, et al. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of steroid-resistant graft-versus-host disease. *Blood.* 1994;84:1342-1348.
394. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature.* 2009;460:108-112.

395. Liu S, Etto T, Rodriguez-Cruz T, et al. TGF-beta1 induces preferential rapid expansion and persistence of tumor antigen-specific CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother.* 2010;33:371-381.
396. Shatry A, Chirinos J, Gorin MA, Jones M, Levy RB. Targeting Treg cells in situ: emerging expansion strategies for (CD4(+))CD25(+) regulatory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:1239-1243.
397. Koenecke C, Czeloth N, Bubke A, et al. Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3+ Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD. *Eur J Immunol.* 2009;39:3091-3096.
398. Weinberg R. Point: Hypotheses first. *Nature.* 2010;464:678.
399. Golub T. Counterpoint: Data first. *Nature.* 2010;464:679.
400. Germain R. Ron Germain: Towards a grand unified theory. Interview by Amy Maxmen. *J Exp Med.* 2010;207:266-267.
401. Perl A. Systems biology of lupus: mapping the impact of genomic and environmental factors on gene expression signatures, cellular signaling, metabolic pathways, hormonal and cytokine imbalance, and selecting targets for treatment. *Autoimmunity.* 2010;43:32-47.
402. Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science.* 2004;306:640-643.