

INRS

Institut Armand-Frappier

**CARACTÉRISATION DES RÉPONSES LYMPHOCYTAIRES DANS UN
MODÈLE MURIN DE REJET DE GREFFE DE PEAU**

Par

CAROLINE LEDUC

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.) en immunologie et virologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Alain Lamarre, INRS-IAF

Examineur externe

Jean-François Cailhier,
Faculté de médecine
Université de Montréal

Examineur externe

Sylvie Fournier,
Département de microbiologie et immunologie
Université McGill

Directeur de recherche

Claude Daniel, INRS-IAF

REMERCIEMENTS

À l'été 2002, j'arrivais à l'Institut Armand-Frappier pour un stage d'été qui aura été le début de plusieurs belles années. Après autant d'années passées à l'institut, je voudrais remercier des tonnes de gens et j'espère que je n'oublierai personne. Tout d'abord, je tiens à remercier énormément mon directeur de stage puis de maîtrise et enfin de doctorat, Dr Claude Daniel. Merci Claude d'avoir cru en moi, de m'avoir dirigée et aidée lorsque nécessaire et de m'avoir soutenue aussi longtemps. Ça aura été long, mais j'y serai parvenue! Je voudrais remercier aussi Alain Lamarre et Veronika Von Messling, qui m'ont suivie à travers mes différents comités d'encadrement, examen prédoctoral et/ou séminaires. Merci à Marcel Desrosiers pour son aide en cytométrie. Merci à Penny-Ann Rudd pour son aide en microscopie. Merci à tous qui m'ont apporté aide ou conseils.

Un grand merci à Yvon Lamontagne, notre cher technicien de laboratoire, ami et confident. Merci à Dominique Sauvé, mon maître de stage qui m'a tout appris des greffes! Merci aux deux Mimi, Myriam Baratin et Meriam Belghith qui ont été deux postdocs dans le laboratoire, complices de mes expériences, mentors et amies. Merci aux membres du labo passés et présents avec qui j'ai partagé de beaux moments et de nombreux fous rires notamment, Caro H, Suzie, Fred, Véro, Charles-David, Alban, Philippe, Houda, Ben. Merci aussi aux amis passés ou présents des autres labos, que vous soyez iraniens, colombiens, tunisiens, espagnol, français, québécois, « Freak bees » ou autres. Merci à Héctor. Merci à ma famille et amis à l'extérieur du labo pour leurs encouragements dans les moments les plus durs. Merci à tout le labo d'histocompatibilité, pour m'avoir fait une place dans votre équipe, mais aussi pour les beaux moments partagés ensemble. Merci au musée Armand-Frappier qui m'a aussi accueillie dans son équipe à la fin de mes études. Finalement merci à la fondation Armand-Frappier, le CRSNG et le FRSQ pour le financement tout au long de mes études.



TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
RÉSUMÉ	XIV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE	3
1. LA TRANSPLANTATION	5
1.1 Généralité	5
1.2 Historique.....	6
2. L'IMMUNOSUPPRESSION.....	9
3. LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ	13
3.1 Les molécules classiques de CMH de classe I (figure 5a).....	13
3.2 Les molécules du CMH de classe II (figure 5b).....	14
3.3 Génétique du CMH.....	14
4. L'ALLORÉACTIVITÉ.....	17
4.1 La voie directe	17
4.2 La voie indirecte	18
4.3 La voie semi-directe	20
5. ALLORÉACTIVITÉ VERSUS RESTRICTION AU CMH DU SOI	23
5.1 Le biais génétique	23
5.2 La haute fréquence des déterminants (dominance peptidique)	24
5.3 La haute densité des déterminants (dominance du CMH)	24
6. MÉCANISMES DU REJET	27
6.1 L'ischémie et la reperfusion	27
6.2 Les lymphocytes T CD4+.....	28
6.2.1 Les lymphocytes CD4+ Th1	31
6.2.2 Les lymphocytes CD4+ Th2	31
6.2.3 Le paradigme Th1-Th2 et les réponses allogéniques (figure 9)	33
6.2.4 Les lymphocytes CD4+ Th17	34
6.3 Les lymphocytes T CD8+.....	37
6.4 Les lymphocytes T régulateurs.....	38
6.4.1 Les lymphocytes T régulateurs FOXP3+ (Treg).....	39
6.4.2 Les lymphocytes T régulateurs FOXP3-.....	41
6.4.3 Les lymphocytes T régulateurs dans la transplantation.....	42
6.5 Les lymphocytes B, les anticorps et le rejet humoral	45
<i>Figure 15 : Activation du complément par les anticorps liés sur les cellules endothéliales et leurs effets (modifiée de (Colvin and Smith 2005)).</i>	49
6.6 Les macrophages	50
6.7 Les neutrophiles	53

6.8 Les éosinophiles	55
6.9 Les cellules NK.....	56
7. TYPES DE REJET.....	57
7.1 Le rejet hyperaigu	57
7.2 Le rejet aigu	59
7.3 Le rejet chronique et la dysfonction chronique du greffon.....	59
8. SITE D'ACTIVATION DES CELLULES T EFFECTRICES	63
8.1 Les organes lymphoïdes.....	63
8.2 Les organes lymphoïdes secondaires et l'initiation des réponses alloréactives.....	65
8.3 La contribution des OLS pour l'activation des lymphocytes T lors d'un rejet de greffe : des études contradictoires! (Tableau I)	66
8.4 Initiation de réponses immunitaires hors des OLS.....	69
8.4.1 La moelle osseuse comme SLO	69
8.4.2 Le greffon comme site d'activation	70
8.5 La formation des organes lymphoïdes tertiaires	73
9. LES OBJECTIFS DE MON PROJET DE THÈSE.....	77
9.1 Quels types de lymphocytes T auxiliaires (Th1 ou Th2) induisent le rejet?.....	77
9.2 Quel est le site d'activation des lymphocytes T lors du rejet de greffe?.....	77
10. LE MODÈLE MURIN DE GREFFE DE PEAU	79
10.1 La double spécificité du lymphocyte T 2.102	79
10.2 Les souris 2.102Tg.....	79
10.4 Le modèle murin de greffe de peau.....	81
CHAPITRE II : LES RÉSULTATS.....	83
ARTICLE I	85
ARTICLE II	109
FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	141
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	145
1. Introduction	145
2. Résultats / discussion.....	145
2.1 Les neutrophiles semblent impliqués dans le rejet dans la voie directe.	145
2.2 Les macrophages infiltrent les greffons de façon plus importante dans la voie indirecte.....	147
2.3 Résumé	147
3. Figures complémentaires.....	149
CHAPITRE III : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	155
1. LES ORIGINES DU PROJET.....	157
2. LE REJET DE GREFFE PEUT ÊTRE INDUIT PAR LES LYMPHOCYTES TH1 OU TH2	158
2.1 Les cytokines Th2 et l'acceptation des greffes.....	158
2.2 Les cytokines Th2 et le rejet des greffes	159
2.3 Les cytokines Th2 et le rejet chronique.....	160
2.4 Les lymphocytes Th1-Th2 et le rejet aigu dans notre modèle.....	161
2.5 La plasticité des lymphocytes T auxiliaires	163
2.6 Objectif #1 : résumé et perspectives.....	164
3. LA DÉTERMINATION DU SITE D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T LORS DU REJET DE GREFFE.....	166
3.1 Des études contradictoires sur l'importance des OLS pour l'initiation des réponses alloréactives	167

3.2 Les OLS ne sont pas nécessaires pour l'activation des lymphocytes de la voie directe dans notre modèle	168
3.3 Objectif #2 : résumé et perspectives	171
4. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	174
BIBLIOGRAPHIE	177
ANNEXE I : ARTICLE D. SAUVÉ ET AL.	191

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
PHYSICAL CHEMISTRY
BY
JAMES H. COOKE
AND
ROBERT W. WILSON
1958

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

FIGURE 1 : BILAN DE LA SITUATION DES GREFFES AU QUÉBEC JUSQU'À 2011 (QUÉBEC-TRANSPLANT 2011).....	5
FIGURE 2 : TYPE DE GREFFES : AUTOGREFFE, ISOGREFFE, ALLOGREFFE ET XÉNOGREFFES (MODIFIÉE DE (BENJAMINI, SUNSHINE ET AL. 2000)).	7
FIGURE 3 : HISTORIQUE DES SUCCÈS DE LA TRANSPLANTATION DE 1900 À AUJOURD'HUI.....	8
FIGURE 4 : LES PRINCIPAUX IMMUNOSUPPRESSEURS ET LEUR SITE D'ACTION (MODIFIÉE DE (HALLORAN 2004)).....	11
FIGURE 5 : LES LES MOLÉCULES D'HISTOCOMPATIBILITÉ CHEZ L'HUMAIN (A) ET LA SOURIS (B) (MODIFIÉE DE (BENJAMINI, SUNSHINE ET AL. 2000))......	11
FIGURE 6 : LES TROIS VOIES D'ALLORECONNAISSANCE (MODIFIÉE DE (GOKMEN, LOMBARDI ET AL. 2008))	22
FIGURE 7 : HYPOTHÈSES POUR EXPLIQUER LE GRAND NOMBRE DE LYMPHOCYTES T ALLORÉACTIFS : MODÈLE DE LA DOMINANCE PEPTIDIQUE OU DE LA DOMINANCE DU CMH (MODIFIÉE DE (SYKES, WOOD ET AL. 2008) ET (FELIX AND ALLEN 2007)) 25	
FIGURE 8 : IMPLICATION DES LYMPHOCYTES T CD4+ DANS LE REJET DE GREFFE (MODIFIÉE DE (LE MOINE, GOLDMAN ET AL. 2002)).	30
FIGURE 9 : DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES T CD4+ AUXILIAIRES EN TH1 OU TH2 ET LEURS EFFETS RESPECTIFS (MODIFIÉE DE (LAKKIS 1998)).....	32
FIGURE 10 : DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES T CD4+ NAÏFS EN AUXILIAIRES TH1, TH2 ET TH17 ET LEURS EFFETS RESPECTIFS (MODIFIÉE DE (CHADHA, HEIDT ET AL. 2011)).....	35
FIGURE 11 : LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DE L'IL-17 (MODIFIÉE DE (XU AND CAO 2010)).	35
FIGURE 12 : LES DIFFÉRENTS SOUS-TYPES DE CELLULES T RÉGULATRICES (MODIFIÉE DE (MILLS 2004)).....	39
FIGURE 13 : LE MODE D'ACTION DES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS DANS LA TRANSPLANTATION (MODIFIÉE DE (WOOD AND SAKAGUCHI 2003)).	41
FIGURE 14 : MÉCANISMES DU REJET HUMORAL DÉCLENCHÉS PAR LA LIAISON DES ANTICORPS AUX ALLOANTIGÈNES SUR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES (MODIFIÉE DE (CAI AND TERASAKI 2005)).	48
FIGURE 15 : ACTIVATION DU COMPLÉMENT PAR LES ANTICORPS LIÉS SUR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET LEURS EFFETS (MODIFIÉE DE (COLVIN AND SMITH 2005)).	49
FIGURE 16 : LES TYPES DE MACROPHAGES ET LEURS RÔLES DANS L'INFLAMMATION, LA RÉPARATION DES TISSUS ET LA FIBROSE (ADAPTÉE DE (MURRAY AND WYNN 2011)).	52
FIGURE 17 : RÔLE DES NEUTROPHILES DANS LA PHASE D'INDUCTION (A) ET LA PHASE EFFECTRICE (B) DU REJET DES ALLOGREFFES (SURQUIN, LE MOINE ET AL. 2005).	55
FIGURE 18 : LES 3 TYPES DE REJET DE GREFFE ET LEURS MÉCANISMES (MODIFIÉE DE (ABBAS AND LITCHMAN 2009)).....	58
FIGURE 19 : (A) LES ORGANES LYMPHOÏDES PRIMAIRES (ROUGE), LES ORGANES SECONDAIRES (BLEU) ET LE RÉSEAU LYMPHATIQUE (VERT), (IMAGE ADAPTÉE DE (MARIEB AND HOEHN 2010)). (B) LA STRUCTURE D'UN GANGLION LYMPHATIQUE (IMAGE MODIFIÉE DE (SIMON 2009)).	65
FIGURE 20 : HYPOTHÈSE DE L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T ALLORÉACTIFS PAR LA VOIE DIRECTE (A) OU INDIRECTE (B) (MODIFIÉE DE (TURKA AND LECHLER 2009)).....	67
FIGURE 21: LA CIRCULATION DES LYMPHOCYTES T DANS ET EN DEHORS DE LA MOELLE OSSEUSE (MODIFIÉE DE (DI ROSA AND PABST 2005)).	70
FIGURE 22: REVASCULARISATION D'UNE GREFFE DE PEAU AVEC LES VAISSEAUX SANGUINS DU RECEVEUR EN ROUGE ET CEUX DU DONNEUR EN BLEU (MODIFIÉE DE (CAPLA, CERADINI ET AL. 2006)).....	72
FIGURE 23: LES ÉTAPES DE LA FORMATION D'ORGANES LYMPHOÏDES TERTIAIRES DANS LE CADRE D'UNE INFLAMMATION CHRONIQUE, PROCESSUS QUI SERAIT SEMBLABLE POUR LA FORMATION DES OLT DANS LE CADRE D'UN REJET DE GREFFE (ADAPTÉE DE (ALOISI AND PUJOL-BORRELL 2006)).	75
FIGURE 24 : LA DOUBLE SPÉCIFICITÉ DU LYMPHOCYTE T 2.102 (ADAPTÉE DE (SAUVE, BARATIN ET AL. 2004)).....	75

Figures (suite)

FIGURE 25: LA CONSTRUCTION DE LA PROTÉINE DE FUSION MEMBRANAIRE MHEL-H8.....	80
FIGURE 26: MODÈLE MURIN DE GREFFE DE PEAU DU LABORATOIRE UTILISANT LES PROPRIÉTÉS DU CLONE T 2.102 (ADAPTÉE DE (SAUVE, BARATIN ET AL. 2004)).....	82
FIGURE 27 : LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES T AUXILIAIRES EN TH1, TH2, TH17, T RÉGULATRICES INDUCTIBLES (iTREG) OU FOLLICULAIRES (TFH : PRÉSENTES DANS LES FOLLICULES B DES ORGANES LYMPHOÏDES SECONDAIRES) ET LA PLASTICITÉ ENTRE LES PHÉNOTYPES (MODIFIÉE DE (ZHOU, CHONG ET AL. 2009)).....	164

Tableau

TABEAU 1 : RÉSUMÉ DES ÉTUDES CONTRADICTOIRES SUR LA CONTRIBUTION DES OLS LORS DU REJET	68
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADCC cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps	IL- interleukine
ADN acide désoxyribonucléique	IFN interféron
Aly alymphoblastique	KO déficience pour un gène
BrdU bromodésoxyuridine	LT lymphotoxine
CAM complexe d'attaque membranaire	LTβR récepteur de la lymphotoxine β
CD cellule dendritique	NO oxyde nitrique
CMH complexe majeur d'histocompatibilité	NK cellules tueuses naturelles
CPA cellule présentatrice d'antigènes	OLS organes lymphoïdes secondaires
CTL lymphocyte T cytotoxique	OLT organes lymphoïdes tertiaires
DTH hypersensibilité de type retardé	PNAd Addressine des ganglions périphériques
Hb hémoglobine	RAG gènes activant la recombinaison
HEL lysozyme d'oeuf de poule	SCID immunodéficienc e combinée sévère
HLA Antigène leucocytaire humain	TNF facteur nécrosant des tumeurs
Ig immunoglobuline	Th lymphocyte T auxiliaire

RÉSUMÉ

Bien qu'il soit établi jusqu'à ce jour que les lymphocytes T CD4+ aient un rôle important dans le rejet de greffe, plusieurs questions restent encore à éclaircir. Entre autres, la contribution des organes lymphoïdes secondaires (OLS) dans l'activation des lymphocytes T et la contribution des lymphocytes différenciés en Th1 vs Th2 pour le rejet de greffe sont toujours controversées. Le but de notre étude est premièrement de déterminer *in vivo* (dans un modèle murin de greffe de peau) le site d'activation des lymphocytes T CD4+ dans les voies d'alloréactivité directe ou indirecte et deuxièmement de déterminer si les cellules T CD4+ Th1 ou Th2 induisent le rejet.

Nous avons démontré que les souris sans OLS peuvent rejeter leur greffe de peau, mais avec une cinétique de rejet retardée par rapport aux souris avec OLS. Les cellules T CD4+ sont détectées et prolifèrent dans le greffon dès les jours 5 et 7 dans la voie directe et cette infiltration est associée avec une régulation à la hausse de l'ARNm de l'IFN- γ . La présence de l'ARNm d'une enzyme impliquée dans la synthèse des PNAd exprimées exclusivement sur les endothéliums des OLS ainsi que la présence de CCL19 suggèrent que des structures lymphoïdes tertiaires peuvent être présentes dans le greffon et pourraient servir de site d'activation. La présence de PNAd a été confirmée par immunohistochimie dès le jour 7 dans la voie directe et cette expression est encore plus importante au jour 11. Étonnamment, le rejet dans la voie indirecte survient aussi en absence d'OLS. Bien qu'un peu de prolifération soit observée dans les greffons dans la voie indirecte, il n'est pas exclu qu'une partie de l'activation se produise au niveau de la moelle osseuse où beaucoup de cellules en prolifération sont observées dès le jour 7 alors que nous détectons beaucoup de cellules T CD4+ qu'à partir du jour 11 dans le greffon.

De plus, des expériences ont été effectuées afin d'évaluer le rôle des cellules T CD4+ différenciées en Th1 ou Th2. Nous avons confirmé que les profils de sécrétion de cytokines des cellules étaient maintenus *in vivo* jusqu'à 21 jours post-transplantation. Contrairement à certaines études, nous avons observé que les deux types de cellules induisent un rejet du greffon. Par contre, le rejet des greffons dans la voie indirecte avec des cellules Th2 est significativement retardé. Finalement, le rejet par les cellules Th1 est accompagné d'une production d'anticorps IgG_{2a} tel qu'attendu tandis que le rejet induit par les Th2 s'accompagne plutôt d'une réponse mixte en anticorps.

The first part of the book is devoted to a general survey of the history of the subject. It begins with a discussion of the early attempts to explain the origin of life, and then proceeds to a more detailed account of the development of the theory of evolution. The author discusses the work of Darwin and Wallace, and the evidence in support of their theory. He also discusses the work of other scientists, such as Huxley and Lyell, and the influence of their work on the development of the theory.

The second part of the book is devoted to a detailed account of the development of the theory of evolution. It begins with a discussion of the work of Darwin and Wallace, and the evidence in support of their theory. It then discusses the work of other scientists, such as Huxley and Lyell, and the influence of their work on the development of the theory. The author also discusses the work of other scientists, such as Mendel and Morgan, and the influence of their work on the development of the theory.

The third part of the book is devoted to a detailed account of the development of the theory of evolution. It begins with a discussion of the work of Darwin and Wallace, and the evidence in support of their theory. It then discusses the work of other scientists, such as Huxley and Lyell, and the influence of their work on the development of the theory. The author also discusses the work of other scientists, such as Mendel and Morgan, and the influence of their work on the development of the theory.

INTRODUCTION

Bien que de nos jours la transplantation soit une solution couramment pratiquée pour de nombreux patients ayant un organe déficient, ces patients devront ensuite prendre un cocktail de médicaments immunosuppresseurs sans jamais complètement être à l'abri d'un éventuel rejet de greffe. Il est clairement établi depuis des années que les lymphocytes T CD4⁺ ont un rôle primordial à jouer dans le rejet. Ils peuvent jouer leur rôle en étant activés par deux voies : la voie directe ou indirecte. Tout d'abord, dans la voie directe, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent reconnaître directement une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du donneur. Dans la voie indirecte, les lymphocytes T CD4⁺ vont plutôt reconnaître un peptide dérivé d'une protéine du donneur (particulièrement les molécules du CMH) qui est apprêtée et présentée par une CPA du soi. La voie directe est souvent associée avec le rejet aigu tandis que la voie indirecte est associée à la dysfonction chronique du greffon.

Bien que nos connaissances soient de plus en plus nombreuses sur les mécanismes impliqués dans le rejet, plusieurs points restent encore nébuleux. Entre autres, il est connu que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs vont se différencier en cellules auxiliaires de type Th1 ou Th2 suite à une activation, mais la contribution de chacun des 2 types en transplantation reste à déterminer. En effet, certaines études suggèrent que les Th1 pourraient favoriser le rejet alors que les Th2 pourraient favoriser la tolérance. D'autres ont montré que les Th1 pourraient être impliqués dans le rejet aigu alors que les Th2 favoriseraient plutôt la dysfonction chronique du greffon. Des études précédentes dans notre laboratoire par Sauvé et al. ont quant à elles démontré que les lymphocytes T CD4⁺ se différencient en un profil mixte autant Th1 que Th2 suite à une greffe de peau peu importe la voie d'alloréactivité, n'associant aucun type en particulier au rejet de greffe (Sauvé, Baratin et al. 2004). Le premier objectif de mes présents travaux était donc de répondre, à l'aide de notre modèle, à la question suivante : est-ce que les cellules Th1 ou le Th2 peuvent induire le rejet dans chacune des voies d'alloréactivité?

Ensuite, le site d'activation de ces lymphocytes T est aussi une question qui génère des réponses contradictoires. En effet, bien qu'il soit généralement accepté que les lymphocytes T CD4+ naïfs nécessitent un environnement structuré tel que les organes lymphoïdes secondaires (OLS) pour supporter leur activation et leur prolifération, certaines études démontrent que l'initiation du rejet pourrait se faire en dehors de ces organes lymphoïdes. Une précédente étude effectuée dans notre laboratoire par Baratin et al. suggère plus spécifiquement que seulement les lymphocytes T activés par la voie directe pourraient être activés dans le greffon (Baratin, Bonin et al. 2004). C'est pourquoi le deuxième objectif de cette étude était de déterminer quel est le site d'activation des lymphocytes T dans chacune des voies d'alloréactivité.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle murin de greffe de peau basé sur le transfert adoptif de lymphocytes T CD4+ 2.102 dans des souris receveuses déficientes en lymphocytes T CD4+ et/ou déficientes en OLS. La double spécificité de la cellule 2.102 dans notre modèle de greffe de peau nous donne l'avantage de pouvoir étudier séparément les deux voies d'alloréactivité à l'intérieur d'un même receveur contrairement à tous les autres modèles utilisés jusqu'à ce jour. Afin de répondre à la première question, les lymphocytes T CD4+ ont été différenciés *in vitro* en Th1 ou Th2 avant leur transfert *in vivo* dans les souris receveuses sans lymphocytes T et la cinétique de rejet ainsi que la production d'anticorps ont été étudiées. Pour répondre à la deuxième question, des souris receveuses sans OLS ont été transférées avec les lymphocytes T CD4+ afin de déterminer si les cellules étaient activées dans le greffon et si le rejet avait toujours lieu sans OLS.

Des réponses à ces deux questions sont importantes, car différentes stratégies pour manipuler la réponse immunitaire afin d'éviter un rejet pourraient être développées en meilleure connaissance de cause. Par exemple, tel qu'il sera expliqué dans la revue de littérature, certaines stratégies visaient antérieurement à dévier la différenciation des lymphocytes T en un profil de type Th2, car il été pensé que les cytokines Th2 favorisaient l'acceptation de la greffe. Or, des résultats précédents ainsi que nos résultats démontrent maintenant que les lymphocytes de type Th2 peuvent aussi conduire au rejet de la greffe.

CHAPITRE I :
REVUE DE LITTÉRATURE

THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN LIBRARY

1. La transplantation

1.1 Généralité

De nos jours, la transplantation d'organes ou de tissus est une procédure couramment utilisée afin de venir en aide à de nombreux patients ayant des organes déficients. En effet en 2011, 384 personnes ont été transplantées au Québec, la majorité étant des transplantations rénales (figure 1) (Québec-Transplant 2011). Malheureusement, la disponibilité des organes est beaucoup moins grande que la demande et année après année, le nombre de personnes en attente d'une greffe augmente, certaines personnes décédant même lors de l'attente. Néanmoins, plusieurs mesures sont en œuvre afin d'augmenter cette disponibilité. Entre autres, l'amélioration constante des techniques pour prélever et conserver les organes afin d'assurer leur qualité, la sensibilisation au don d'organes ainsi que le développement de programmes de dons d'organes appariés ou de don altruiste permettent d'augmenter le nombre d'organes disponibles.

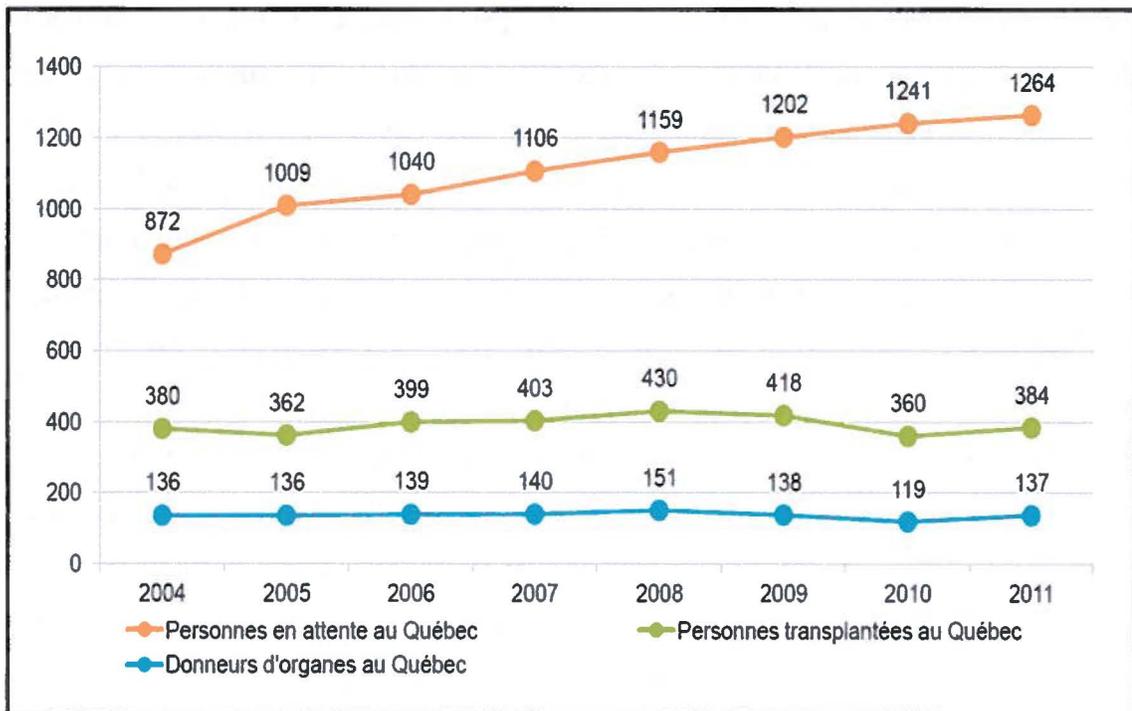


Figure 1 : Bilan de la situation des greffes au Québec jusqu'à 2011 (Québec-Transplant 2011)

Le don d'organes appariés permet à un receveur A, ayant un proche B incompatible souhaitant lui donner un organe, de recevoir une greffe compatible provenant d'un donneur C qui voudrait donner à un receveur D, mais qui ne peut pas pour les mêmes raisons. Ces échanges peuvent comporter deux ou plusieurs couples receveur-donneur permettant ainsi de retirer plusieurs patients de la liste d'attente. Le don altruiste consiste au don volontaire d'un organe par une personne vivante sans rien attendre en retour. Cela fonctionne de la même façon que le don apparié, mais c'est une personne sans relation avec un receveur qui initie cette cascade de dons entre des couples receveur-donneur.

1.2 Historique

Les succès de la transplantation sont phénoménaux depuis l'utilisation de l'immunosuppression. Depuis les dernières dix années, pratiquement tout organe ou tout membre peut se greffer, mais tel n'a pas toujours été le cas. Les premiers rapports de greffe de tissu remontent à 700 ans av. J.-C. par le peuple hindou, où Sushruta un chirurgien indien pratiquait des rhinoplasties à partir de la peau de front des patients, mais le succès ou l'échec de ces opérations n'est pas très bien connu (Sykes, Wood et al. 2008). Par la suite, toutes sortes d'expériences ont été faites à travers les siècles, notamment des autogreffes de peau réussies par le chirurgien italien Gasparo Tagliacozzi vers la fin des années 1500, mais ce n'est que vers la fin des années 1800 que la greffe de peau est devenue une pratique acceptée (Kahan 2003; Sykes, Wood et al. 2008). Par contre, les connaissances à l'époque étaient telles que les chirurgiens ne faisaient pas de différence entre des autogreffes (le donneur et le receveur sont la même personne) et des allogreffes (le donneur et le receveur sont des individus différents de la même espèce) allant même jusqu'à effectuer parfois des xéno-greffes (le donneur et le receveur sont de différentes espèces). Avec les connaissances actuelles, nous savons que ces expériences étaient malheureusement presque toutes vouées à l'échec (figure 2) (Sykes, Wood et al. 2008). La seule exception est la cornée qui est un site immunoprivilégié et où les principaux acteurs du rejet non pas accès. Ce type de greffe a ainsi été réussi au début des années 1900 (Sykes, Wood et al. 2008).

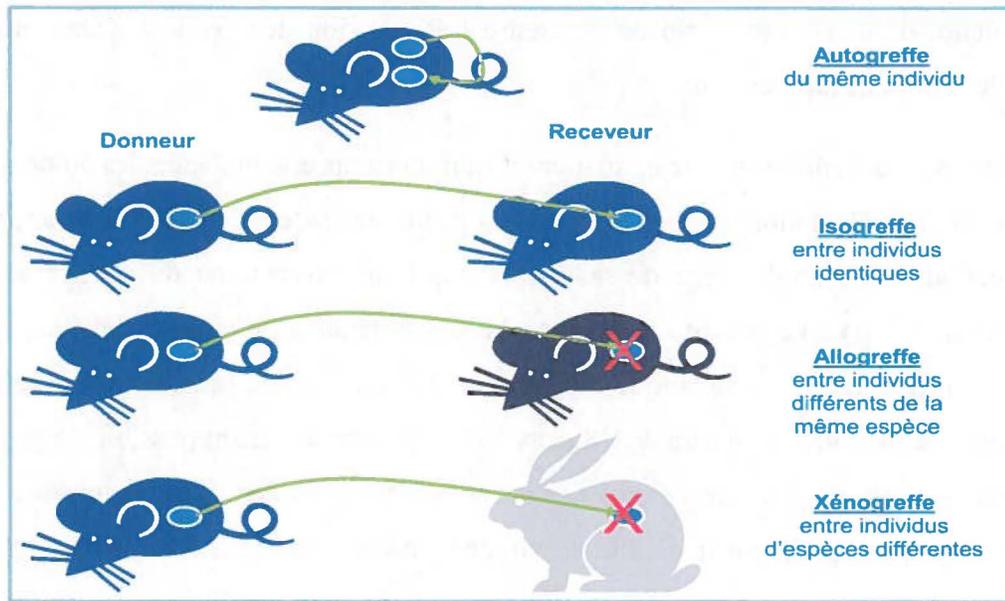


Figure 2 : Type de greffes : autogreffe, isogreffe, allogreffe et xéno greffes (modifiée de (Benjamini, Sunshine et al. 2000)).

La transplantation d'organes solides n'a débuté que dans les années 1900 lorsque les techniques d'anastomose vasculaire ont été bien développées par le Dr Carrel. La première allogreffe rénale chez l'humain a été effectuée en 1936 par le Dr Voronoy, mais le patient est décédé suite à une incompatibilité des groupes sanguins (Sykes, Wood et al. 2008). C'est finalement à Boston en 1954 sous la direction du docteur Joseph Murray (prix Nobel 1990) qu'a eu lieu la première greffe rénale acceptée entre des jumeaux identiques. Le patient transplanté a vécu 9 ans avec son nouveau rein avant qu'il soit atteint de nouveau de glomérulonéphrite et son jumeau donneur a vécu 50 ans avec un rein en moins (Knepper 2001). Plusieurs greffes entre jumeaux ont été effectuées par la suite, mais comme tout le monde ne possède pas un jumeau, il fallait donc trouver un moyen d'empêcher les allogreffes d'être rejetées afin d'étendre cette nouvelle pratique aux individus non génétiquement identiques. Les travaux de Sir Peter Medawar (prix Nobel 1960), qui avait démontré quelques années auparavant que le système immunitaire était définitivement impliqué dans la reconnaissance des allogreffes (Medawar 1944), ont permis aux chercheurs de l'époque de croire qu'il serait possible de manipuler le système

immunitaire d'un receveur afin de permettre l'acceptation des greffes; c'était alors le début de l'immunosuppression.

Avec les progrès de la recherche en matière d'immunosuppression depuis les 50 dernières années, la transplantation d'organes est aujourd'hui considérée comme une approche thérapeutique efficace de soins de santé plutôt qu'une intervention de dernier secours (Commission 2004). La réussite de la transplantation rénale a entraîné le développement de la transplantation pancréatique suivie ensuite par la transplantation cardiaque, hépatique, pulmonaire et intestinale (Murray 1993). Il est maintenant possible de greffer à peu près n'importe quoi que ce soit des organes vitaux ou des tissus composites non vitaux, mais qui améliorent la qualité de vie des patients. En effet, les greffes suivantes ont entre autres été rapportées : la rate (Matarese, Costa et al. 2007), la paroi abdominale (Levi, Tzakis et al. 2003);(Baddon, Jones et al. 2010); la moelle osseuse et les cellules souches du cordon ombilical (Gluckman 2009); le système larynx-pharynx-trachée-glandes thyroïdes (Strome, Stein et al. 2001); des articulations comme le genou (Hofmann, Kirschner et al. 1998) et la cheville; la peau et les muscles (Swearingen, Ravindra et al. 2008); la langue (Birchall 2004); le pénis et l'utérus (Hu, Lu et al. 2006; Petit 2007); des mains entières (Lanzetta, Petruzzo et al. 2007), des portions de visage (Devauchelle, Badet et al. 2006) et même depuis 2008, les deux bras (BBC 2008). Les dates de la première transplantation réussie pour la plupart des organes ou tissus sont rapportées sur la ligne du temps à la figure 3.

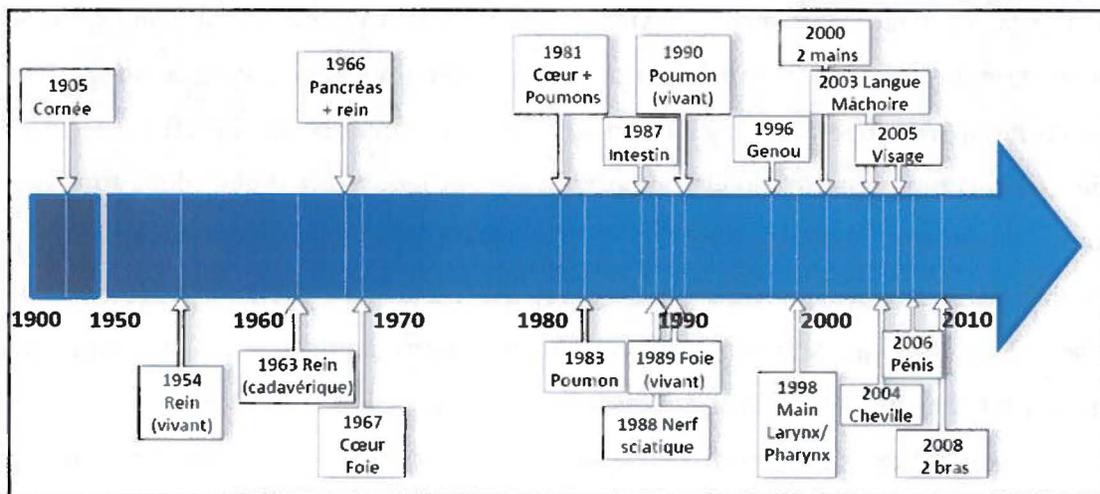


Figure 3 : Historique des succès de la transplantation de 1900 à aujourd'hui.

2. L'immunosuppression

Tel que démontré par Sir Medawar (Medawar 1944), le système immunitaire est la principale barrière à la transplantation. Afin de contourner ce problème, l'immunosuppression a pour but de supprimer un ou plusieurs éléments de réponse du système immunitaire afin d'empêcher les greffons d'être rejetés. Les premiers pas de l'immunosuppression chez l'humain ont débuté dans les années 1950 avec l'usage plutôt infructueux de méthodes non spécifiques telles que l'irradiation totale du corps suivi d'une infusion de cellules de moelle osseuse du donneur (Murray, Merrill et al. 1960). Étonnamment, deux équipes différentes en l'intervalle de quelques semaines ont quand même réussi à greffer des jumeaux non identiques sans qu'il n'y ait rejet suite à une irradiation à plus faible dose combinée à un traitement de cortisone, un corticostéroïde ayant un puissant effet anti-inflammatoire (Merrill, Murray et al. 1960; Hamburger, Vaysse et al. 1962). Les recherches se sont poursuivies et des études expérimentales ont démontré en 1959 que l'usage de la 6-mercaptopurine pouvait supprimer les réponses immunitaires chez le lapin en interférant avec la synthèse de l'ADN dans les cellules en division, car les cellules du système immunitaire sont appelées à se diviser grandement suite à leur activation (Schwartz, Eisner et al. 1959). Des analogues de cette molécule ont été synthétisés afin d'améliorer sa biodisponibilité, la 6-mercaptopurine étant sensible à l'hydrolyse dans l'estomac et ces analogues ont été testés dans un modèle canin de transplantation rénale par Joseph Murray et son équipe. L'azathioprine est ressorti comme le seul candidat potentiel ayant un effet d'inhibition de la synthèse de l'ADN des cellules, prolongeant donc la survie du greffon. L'azathioprine a ainsi marqué les débuts de la transplantation clinique dans les années 1960 (Murray, Merrill et al. 1963). Par la suite, toutes sortes de traitements ont été expérimentés chez les receveurs en combinaison avec l'azathioprine tels que les corticostéroïdes, l'actinomycine C, la radiothérapie, la splénectomie, la déplétion des lymphocytes ou l'injection d'anticorps (Murray, Wilson et al. 1968). Les meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'administration d'azathioprine avec des corticostéroïdes (prednisone) établissant un taux moyen de survie des greffes de rein de 40 à 50%, un an après la transplantation (Kahan 2003; Sayegh and Carpenter 2004). Ce taux ne s'est pas beaucoup amélioré pendant les années 1960 et 1970

principalement dû à la haute mortalité engendrée par l'immunosuppression excessive et non spécifique associée à l'usage à long terme des corticostéroïdes.

Ce n'est qu'à partir des années 1980 que des nouvelles drogues un peu plus sélectives sont apparues. Tout d'abord, la cyclosporine est venue révolutionner le monde de l'immunosuppression reléguant ainsi l'azathioprine au second rang. La cyclosporine bloque la prolifération des lymphocytes T activés en inhibant la calcineurine, une phosphatase impliquée entre autres dans la cascade de signalisation du TCR et l'activation de NFAT. NFAT est un facteur de transcription important pour la transcription de plusieurs gènes de cytokines dont celui de l'IL-2, une cytokine essentielle pour la prolifération des lymphocytes T (Janeway, Travers et al. 2001). Vers le début des années 1990, un nouvel inhibiteur de calcineurine beaucoup plus puissant (50 fois) et moins néphrotoxique a été développé, le tacrolimus (FK506) (Kahan 2003). Ces agents anti-calcineurine sont plus sélectifs comparativement à l'azathioprine qui affecte toutes les cellules en division, car ils empêchent la synthèse des cytokines spécifiquement chez les cellules lymphoïdes. Une autre drogue couramment utilisée en transplantation, le mycophénolate mofétil (MMF), le précurseur de l'acide mycophénolique (MPA) est venu remplacer l'azathioprine suite à son approbation en 1995 par la FDA, car il est aussi un agent antiprolifératif, mais plus sélectif et plus efficace que l'azathioprine (Brazelton and Morris 1996). Finalement, une dernière molécule mise au point dans les années 1980 a été l'anticorps anti-CD3 (OKT3) qui bloque spécifiquement les lymphocytes T (Brazelton and Morris 1996).

Depuis, plusieurs nouvelles molécules sont venues se joindre aux quelques traitements disponibles. Notamment, le sirolimus (rapamycine) et l'everolimus, des agents de structure semblable au tacrolimus, ont fait leur apparition en transplantation (Brazelton and Morris 1996; Halloran 2004). Ces agents bloquent une kinase (mTOR) impliquée dans la cascade de signalisation induite par les molécules de costimulation ou les cytokines plutôt que la calcineurine. Beaucoup d'anticorps sont aussi maintenant disponibles. Ils peuvent servir pour éliminer des populations cellulaires : les anticorps polyclonaux anti-thymocytes éliminent les lymphocytes T, les anticorps monoclonaux anti-CD20 (Rituximab) éliminent les cellules B et les anticorps monoclonaux anti-CD52

déplètent les lymphocytes, monocytes, macrophages, éosinophiles, cellules NK et cellules dendritiques. Ils peuvent aussi être inhibiteurs par exemple, les anticorps monoclonaux anti-CD25 qui bloquent le récepteur de l'IL-2 sur les cellules lymphoïdes (Daclizumab et Basiliximab) (Kahan 2003; Halloran 2004). Les principales stratégies d'immunosuppression sont illustrées à la figure 4 ci-dessous.

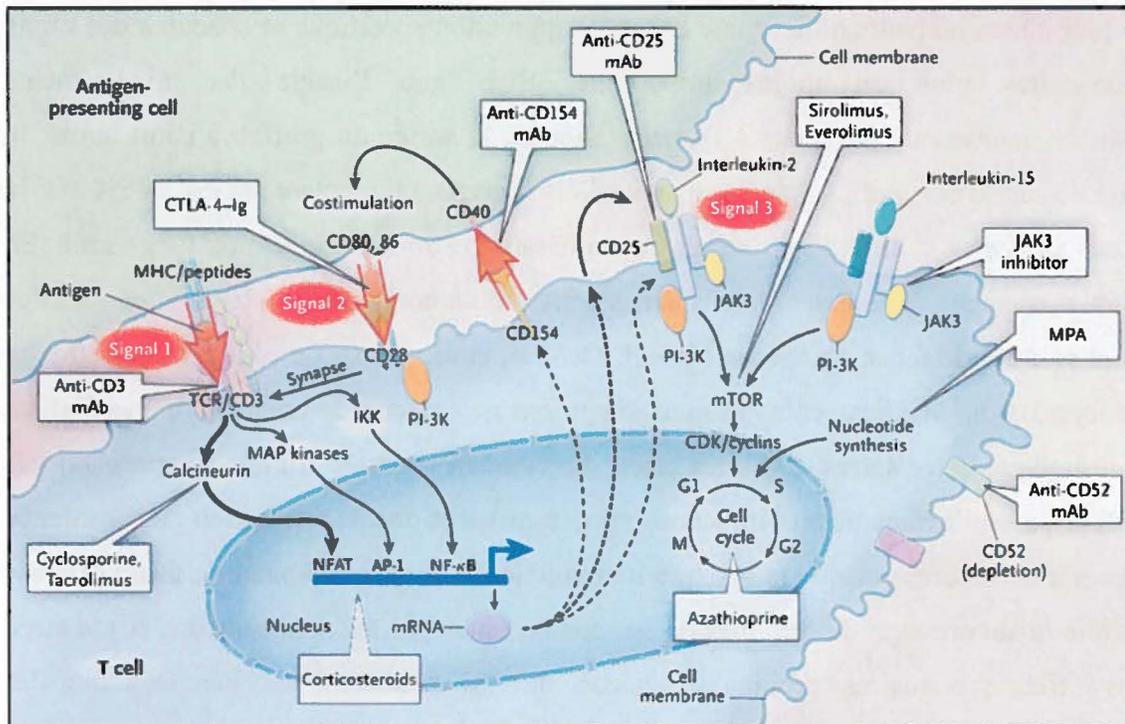


Figure 4 : Les principaux immunosuppresseurs et leur site d'action (modifiée de (Halloran 2004)).

Les stratégies d'immunosuppression utilisent présentement une combinaison de plusieurs des agents mentionnés auparavant et elles varient dans le temps et selon le patient. Le traitement s'effectue en 2 phases. Premièrement, il y a une phase d'induction tout de suite après la transplantation où le patient reçoit une forte dose d'une combinaison d'immunosuppresseurs. Cette combinaison est habituellement composée d'un ou plusieurs anticorps visant à éliminer les cellules du système immunitaire, particulièrement les lymphocytes et d'une triple thérapie comprenant un corticostéroïde, un inhibiteur de calcineurine et une drogue antiproliférative. Par la suite, il y a une phase de maintien où les doses sont réajustées à la baisse et où les médecins essayent souvent d'éliminer ou de limiter l'utilisation des corticostéroïdes et des inhibiteurs de calcineurine. Selon les effets

secondaires rencontrés et les épisodes de rejet, les immunosuppresseurs pourront être remplacés avec d'autres ayant des effets moins toxiques. Par exemple, les inhibiteurs de mTOR sont utilisés pour leur potentiel moins néphrotoxique (Cruzado, Bestard et al. 2009).

Malgré le développement continu de nouveaux agents immunosuppresseurs, jusqu'à ce jour aucun ne peut conférer une immunosuppression spécifique et chacun a des effets secondaires plus ou moins importants. Bien que l'usage des médicaments immunosuppresseurs ait mené à l'amélioration de la survie du greffon à court terme, le taux de survie des greffes de rein un an après la transplantation étant passé de 45% à 95% (Lechler, Sykes et al. 2005), ceci n'a pas amélioré la survie du greffon à long terme. En effet, seulement 20% des greffes rénales sont fonctionnelles après 10 ans, ces greffes étant rejetées de façon chronique (Orloff, DeMara et al. 1995). De plus, l'administration prolongée de médicaments immunosuppresseurs engendre une panoplie d'effets indésirables. Entre autres, il y a les effets directement reliés à l'immunosuppression tels qu'une sensibilité accrue aux infections opportunistes et une augmentation de l'incidence de certains cancers puisque le système immunitaire ne peut fonctionner de façon efficace suite à la suppression de certaines de ses composantes par les médicaments. Il y a aussi des effets secondaires propres à chacun de ces médicaments. Par exemple, les corticostéroïdes peuvent causer entre autres de l'hypertension, de l'ostéoporose, des cataractes, des changements d'humeur, du diabète et un amincissement de la peau (Matas, Kandaswamy et al. 2004). Le tacrolimus et la cyclosporine sont reconnus pour avoir des effets néphrotoxiques et diabétogéniques (Brazelton and Morris 1996) (Halloran 2004). Les agents antiprolifératifs affectent surtout les organes où les cellules se divisent beaucoup, dont la moelle osseuse (suppression immunitaire) et les intestins (diarrhée). Le danger avec l'utilisation d'anticorps est d'induire le syndrome d'hypersécrétion de cytokines où les cellules ciblées par les anticorps s'activent et sécrètent des cytokines de façon incontrôlée. Alors, même si les médicaments immunosuppresseurs ont grandement amélioré la vie des patients transplantés, il reste beaucoup de place à l'amélioration. Pour ce faire, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le rejet de greffe est nécessaire afin de développer soit de meilleures thérapies immunosuppressives, soit une méthode qui favorise le développement de tolérance des greffes.

3. Le complexe majeur d'histocompatibilité

Avant d'aborder les mécanismes impliqués dans le rejet, il faut tout d'abord savoir ce qui cause le rejet. Le rejet de greffe est initié par les cellules du système immunitaire, principalement les lymphocytes T, qui reconnaissent certaines molécules étrangères provenant des cellules du greffon : les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Rogers and Lechler 2001). Ces molécules ont été découvertes lors d'expériences de transplantation de tissu entre individus incompatibles, d'où leur nom (Caballero, Fernandez et al. 2006). En effet, le CMH doit son nom au fait que c'est le principal ensemble (complexe majeur) de gènes impliqués dans la compatibilité des tissus (histocompatibilité), d'autres gènes moins importants étant appelés mineurs. Chez l'humain, le CMH se nomme Human Leukocyte Antigen (HLA), ceci en l'honneur de Jean Dausset (Prix Nobel, 1980) qui fut le premier à parler de groupe d'antigènes à la surface des leucocytes chez l'humain. Chez la souris, le CMH se nomme plutôt H-2 (histocompatibility-2). Le CMH comprend trois classes de gènes (I, II et III) codant pour des protéines aux fonctions diverses, mais les molécules classiques de présentation de l'antigène et les plus importantes pour le rejet sont les molécules codées par les gènes de classes I et II, ces gènes se situant sur le chromosome 6 chez l'humain et sur le chromosome 17 chez la souris.

3.1 Les molécules classiques de CMH de classe I (figure 5a)

Les molécules de classe I sont exprimées sur toutes les cellules nucléées à l'exception des érythrocytes, des cellules endothéliales de la cornée, des cellules épithéliales pancréatiques et salivaires, des cellules du trophoblaste et des cellules embryonnaires au début du développement. Leur expression est plus forte au niveau des lymphocytes et des macrophages (Chatenoud and Bach 2008). Chez l'humain, les molécules de classe I sont appelées HLA-A, B et C alors que chez la souris ce sont H-2 K, D et L (L étant parfois absentes chez certaines lignées de souris). Les molécules de classe I sont composées d'une chaîne lourde alpha toujours associée à la β 2-microglobuline (β 2m). La fonction des molécules du CMH de classe I est de présenter des antigènes aux lymphocytes T CD8+.

3.2 Les molécules du CMH de classe II (figure 5b)

Les molécules de classe II sont exprimées de façon constitutive à la surface des cellules présentatrice de l'antigène tels que les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les monocytes/macrophages. Leur expression peut être régulée à la hausse par l'IFN- γ . L'IFN- γ peut aussi induire l'expression des molécules du CMH de classe II chez certains autres types cellulaires tels que les lymphocytes T activés, les cellules endothéliales et les kératinocytes de la peau chez l'humain par exemple (Espinosa and Chillet 2006) (Kindt, Goldsby et al. 2008). Chez l'humain, les molécules de classe II sont appelées HLA-DP, DQ, DR. Chez la souris, les molécules de classe II sont I-A et I-E (I-E étant parfois absentes). Les molécules de classe II sont composées d'une chaîne alpha et d'une chaîne bêta, chacune codée par un gène différent et elles présentent des antigènes aux lymphocytes T CD4+.

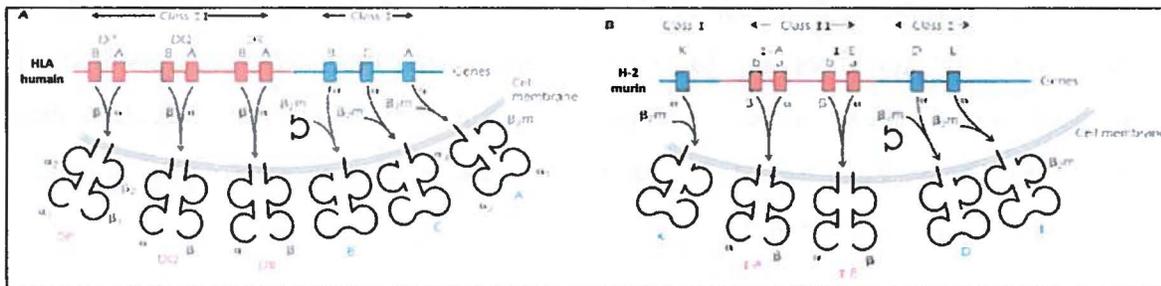


Figure 5 : Les molécules d'histocompatibilité chez l'humain (A) et la souris (B) (modifiée de (Benjamini, Sunshine et al. 2000))

3.3 Génétique du CMH

Les gènes codant le CMH possèdent 4 caractéristiques génétiques fondamentales pour expliquer leur grande diversité. Tout d'abord, le CMH est polygénique, c'est-à-dire que plusieurs gènes codent pour les molécules du CMH : 3 pour la classe I (HLA-A, B, C) et au moins 6 pour la classe II (HLA-DPA, DPB, DQA, DQB, DRA, DRB), car selon le gène DRB présent, d'autres gènes supplémentaires de DRB peuvent être exprimés. Ensuite, chaque gène est hautement polymorphique donc plusieurs allèles sont possibles à chaque locus à l'exception du gène DRA qui a très peu d'allèles. Les différents allèles

sont exprimés sous la forme d'un chiffre à la suite de la molécule chez l'humain, par exemple HLA-A*01:01. Chez la souris, les allèles sont plutôt notés sous la forme d'une lettre en exposant : H-2 K^P ou tout simplement H-2^P pour décrire un haplotype particulier (ici toutes les molécules expriment l'allèle p). De plus, les gènes sont transmis en haplotype c'est-à-dire que nous recevons une copie de l'ensemble des gènes du CMH du père et une copie de l'ensemble des gènes du CMH de la mère, car les gènes du CMH sont très liés et ils ségrègent en bloc lors de la méiose. Finalement, l'expression des gènes du CMH est codominante, alors nous exprimons à la surface de nos cellules les molécules codées par les deux haplotypes transmis (paternel et maternel). Ces phénomènes participent tous à rendre la combinaison des molécules de chaque individu (à l'exception des jumeaux identiques) pratiquement unique.

4. L'alloréactivité

Nous savons maintenant que ce sont les molécules étrangères du CMH qui lorsque reconnues par les lymphocytes T entraînent une forte réponse qui se traduit *in vitro* par la réaction lymphocytaire mixte et *in vivo* par la destruction des cellules du donneur (Porrett, Lee et al. 2008) et le rejet de la greffe (Sherman and Chattopadhyay 1993). Initialement, il était accepté que la reconnaissance des molécules du CMH se produisait par un seul mécanisme, l'alloreconnaissance directe, par lequel les lymphocytes T reconnaissent des déterminants peptidiques sur les molécules entières du CMH à la surface des cellules transplantées du donneur (Benichou 1999). Par contre au début des années 1980, Lechler et al. ont proposé un mécanisme alternatif qui allait être accepté plus tard comme la voie d'alloreconnaissance indirecte dans laquelle les lymphocytes T restreints au soi reconnaissent des peptides provenant de molécules du CMH du donneur qui ont été apprêtées et présentées par des CPA du soi (Lechler and Batchelor 1982; Benichou 1999). Bien que ces deux voies ne soient pas mutuellement exclusives, la contribution relative de chacune des voies dans le processus de rejet est toujours mal définie.

4.1 La voie directe

Dans la voie directe, qui est une voie unique à la transplantation, le lymphocyte T du receveur reconnaît directement une molécule intacte du CMH allogénique à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) du donneur (figure 6a). En utilisant un modèle de souris receveuses SCID ou déficientes pour le gène RAG1 (souris sans lymphocytes) reconstituées avec des lymphocytes T CD4+, il a été observé que des greffes de cœur de souris donneuses déficientes en CMH II n'étaient pas rejetées tandis que des greffes de cœur de souris normales étaient rejetées démontrant ainsi hors de tout doute l'implication de la présence des molécules du CMH dans la voie directe (Pietra, Wiseman et al. 2000). Il est suggéré que la voie directe soit responsable de la forte réponse immunitaire observée tôt dans le rejet de greffe puisque que la fréquence des précurseurs des cellules T alloréactives est de 100 à 1000 fois plus élevée que la fréquence de précurseurs de lymphocytes T spécifiques pour n'importe quel complexe CMH du soi/peptide étranger (Matzinger and Bevan 1977; Liu, Sun et al. 1993). Cette

fréquence de précurseurs peut représenter jusqu'à 10% du répertoire des lymphocytes (Matzinger and Bevan 1977; Lechler, Batchelor et al. 1991; Suchin, Langmuir et al. 2001).

La voie directe est souvent associée au rejet aigu par la rapidité et la vigueur de sa réponse, mais cette réponse diminue avec le temps, car les cellules stimulatrices essentielles à l'activation des lymphocytes T viennent à manquer. En effet, il est suggéré que durant les premières semaines suivant la transplantation, les CPA passagères du greffon migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur pour y activer les lymphocytes T par la voie directe via leur expression de molécules étrangères du CMH et leur expression de molécules de costimulation et elles vont éventuellement mourir (Lechler and Batchelor 1982). Lorsque ces CPA ont migrés hors du greffon, les cellules du tissu de la greffe ne peuvent pas activer les lymphocytes T bien qu'elles expriment des molécules du CMH, car elles ne possèdent pas de molécules de costimulation. Il est même suggéré qu'elles pourraient favoriser la tolérance et en effet il est observé que la fréquence des lymphocytes T alloréactifs pour la voie directe diminue avec le temps (Game and Lechler 2002). La nécessité des cellules dendritiques du donneur a été vérifiée entre autres dans des modèles animaux en utilisant des greffons vidés de leur CPA. La survie permanente de greffes rénales dans un modèle de rat a été observée lorsque les greffons étaient au préalable « stationnés » dans un receveur intermédiaire, le temps que les CPA migrent hors du greffon (Lechler and Batchelor 1982). Si le receveur recevait par la suite une injection de cellules dendritiques du donneur, le greffon était rejeté (Lechler and Batchelor 1982). Donc, les CPA du donneur permettent à la voie directe de jouer un rôle majeur dans le rejet aigu et l'empêchent de contribuer à la dysfonction chronique du greffon.

4.2 La voie indirecte

Dans la voie indirecte, qui représente la voie classique de présentation des antigènes, le lymphocyte T du receveur reconnaît un antigène provenant d'une molécule du complexe majeur ou mineur d'histocompatibilité du donneur qui a été captée, dégradée et

présentée sous forme d'allopeptide par une CPA du receveur (figure 6b). En effet, il a été démontré que ce phénomène de présentation de peptides dérivés du CMH se produit de façon courante *in vivo* (Shoskes and Wood 1994). Par ailleurs, les lymphocytes T dans la voie indirecte reconnaissent seulement quelques déterminants dominants et le répertoire du TCR est plus limité (Benichou and Thomson 2009). Il a été démontré que les lymphocytes T spécifiques pour la voie indirecte représentent seulement 10% des lymphocytes T totaux allospécifiques après le rejet d'une greffe de peau (Benichou, Valujskikh et al. 1999). Bien que la voie directe ait été la seule voie associée au rejet pendant longtemps, il existe maintenant plusieurs évidences que la voie indirecte a un rôle important à jouer dans le rejet de greffe pouvant même mener à elle seule au rejet en absence de la voie directe (Reed, Noorchashm et al. 2003). En effet, en utilisant un modèle de greffe de peau incompatible pour les molécules du CMH I, avec des souris donneuses déficientes pour les molécules du CMH de classe II et des souris receveuses sans lymphocytes T CD8+ (laissant comme seule possibilité la reconnaissance indirecte de peptides provenant de molécules du CMH de classe I qui sont apprêtées et présentées par les CPA du soi aux lymphocytes T CD4+), il a été observé qu'il n'y avait pas de rejet par la voie directe, mais que la voie indirecte était toujours disponible et conduisait à un rejet (Auchincloss, Lee et al. 1993).

Par opposition à la voie directe qui est impliquée seulement au début du rejet, la voie indirecte pourrait être impliquée tout au long du rejet et elle serait particulièrement importante pour la dysfonction chronique du greffon. En effet, tandis que dans la voie directe la source de stimulation des lymphocytes T s'estompe avec le temps; dans la voie indirecte, les peptides stimulateurs peuvent être générés continuellement à partir des molécules du CMH solubles ou de cellules mortes du greffon (Suciu-Foca, Liu et al. 1997). La voie indirecte reste donc la seule voie disponible pour le rejet une fois que les leucocytes passagers du donneur ont quitté le greffon (Benichou and Thomson 2009). L'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans cette voie est particulièrement importante sachant que la voie indirecte est la voie responsable de la dysfonction chronique du greffon et que les immunosuppresseurs ont moins d'effets sur

cette forme de rejet qui demeure une cause majeure de la perte d'organes transplantés (Gokmen, Lombardi et al. 2008).

Il est à noter que la voie indirecte est aussi impliquée dans la reconnaissance d'autres molécules que celles du CMH. En effet, bien que des incompatibilités au niveau des molécules du CMH entre deux individus entraînent une forte réponse du système immunitaire, un rejet de greffe pourrait survenir aussi même lorsque deux individus sont compatibles pour les molécules du CMH. Ceci est causé par la reconnaissance indirecte d'antigènes mineurs d'histocompatibilité qui sont des peptides dérivés de protéines polymorphiques entre différents individus. Chez la souris, il est estimé qu'il existe environ quarante antigènes mineurs d'histocompatibilité (Rogers and Lechler 2001). La reconnaissance des antigènes mineurs d'histocompatibilité engendre une réponse moins forte que celle engendrée dans la voie indirecte par des peptides provenant des molécules du CMH du donneur (Gould and Auchincloss 1999), mais elle peut devenir importante lors de transplantations de moelle osseuse où même si toutes les molécules du CMH sont normalement compatibles, des incompatibilités entre le donneur et le receveur peuvent exister à ce niveau et entraîner la maladie du greffon contre l'hôte (Sykes, Wood et al. 2008).

4.3 La voie semi-directe

Récemment, une troisième voie de présentation d'allopeptides a été décrite : la voie semi-directe. Dans cette voie, des complexes entiers peptides-CMH du donneur sont acquis par les CPA du soi par des contacts cellule-cellule ou par l'ingestion d'exosomes (Gokmen, Lombardi et al. 2008) (figure 6c). L'étude initiale avait en effet démontré que des cellules dendritiques du receveur pouvaient acquérir des complexes peptides-CMH de cellules dendritiques du donneur (Herrera, Golshayan et al. 2004). Ceci se produisait principalement par un contact intime entre les cellules dendritiques, mais le transfert de molécules du CMH était aussi possible par l'acquisition de molécules du CMH solubles ou d'exosomes contenant les molécules du CMH. Ils ont de plus démontré que ces CD pouvaient activer autant *in vitro* qu'*in vivo*, des lymphocytes T spécifiques de ces

molécules du CMH, acquises du donneur. Cette voie permet donc à une CPA du soi d'exprimer en même temps sur la même cellule une molécule du CMH du soi avec un peptide dérivé d'une molécule du CMH du donneur (activant ainsi un lymphocyte T par la voie indirecte) et une molécule du CMH du donneur (activant ainsi un lymphocyte T par la voie directe). Ceci est particulièrement important, car cela permettrait à une cellule T CD8⁺ avec une allospécificité directe de recevoir de l'aide liée d'une cellule T CD4⁺ allospécifique pour la voie indirecte, car les deux cellules T pourraient reconnaître chacun leur molécule du CMH respectif à la surface de la même cellule dendritique dans un modèle cellulaire de ménage à trois. La voie semi-directe apporterait une réponse à un problème longtemps irrésolu quant à savoir comment les cellules T CD8⁺ spécifiques de la voie directe peuvent être activées par des cellules T CD4⁺ spécifiques de la voie indirecte dans un modèle à seulement trois cellules plutôt que quatre, tel que suggéré par certaines études (Lee, Grusby et al. 1994). Tout récemment, une équipe a d'ailleurs fait la preuve de la coexpression de molécules du CMH du soi présentant des peptides dérivés du donneur et de molécules du CMH I ou II du donneur à la surface de CPA du receveur dans un modèle murin de greffe de reins (Brown, Sacks et al. 2011).

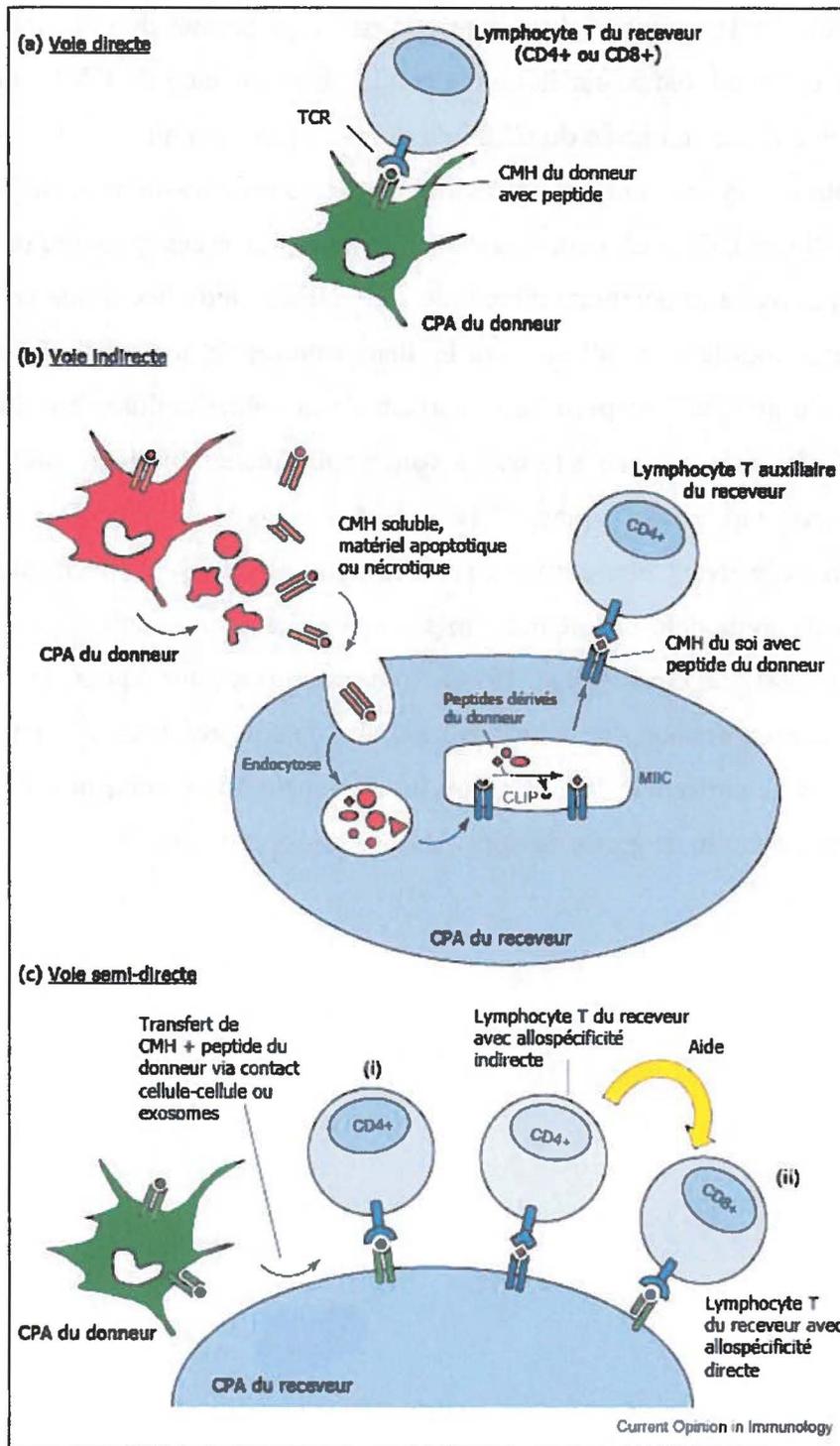


Figure 6 : Les trois voies d'alloreconnaissance (modifiée de (Gokmen, Lombardi et al. 2008))

5. Alloréactivité versus restriction au CMH du soi

Tel que mentionné précédemment, les lymphocytes T dans la voie directe reconnaissent les molécules du CMH allogéniques à la surface des CPA du donneur, et ce, en très grand nombre. Comment concilier ce phénomène avec le fait que normalement les lymphocytes T reconnaissent seulement des antigènes présentés par des CPA via le CMH du soi, ceci étant démontré en 1974 par Peter Doherty et Rolf Zinkernagel (Prix Nobel, 1996) (Zinkernagel and Doherty 1974). Suite à leur développement dans la moelle osseuse, les précurseurs de lymphocytes T migrent vers le thymus pour amorcer leur maturation et leur éducation. Ils passent à travers une série d'étapes durant lesquelles ils acquièrent certaines molécules telles que leur récepteur de cellules T (TCR). Ensuite, l'étape clé est la sélection thymique lors de laquelle le TCR doit reconnaître les molécules du CMH du soi présentant un peptide, c'est la restriction au soi (sélection positive). S'il reconnaît ce complexe, le lymphocyte T survit et passe ensuite au test de tolérance du soi (sélection négative) où des peptides du soi lui sont présentés par les molécules du CMH des CPA et s'il les reconnaît trop fortement, il est éliminé (Janeway, Travers et al. 2001).

5.1 Le biais génétique

Avant la découverte du rôle des molécules du CMH dans la présentation antigénique, la raison pour laquelle autant de lymphocytes T peuvent reconnaître des molécules du CMH allogéniques était mystérieuse. En effet, le système immunitaire n'a pas de raison d'avoir développé une réponse pour se défendre contre des organes transplantés. Avec la compréhension que les lymphocytes T reconnaissent un peptide présenté par une molécule de CMH du soi, il est devenu plus facile de concevoir pourquoi l'alloréactivité existe. Plusieurs évidences telles que l'utilisation de souris déficientes en CMH pour la maturation des thymocytes suggèrent que le TCR a une affinité intrinsèque (encodée dans ses gènes) pour les molécules du CMH avant même la sélection thymique (Zerrahn, Held et al. 1997). La haute fréquence de cellules T alloréactives reflèterait ainsi leur engagement à reconnaître des molécules du CMH en général (Janeway, Travers et al. 2001). En effet, le processus de sélection positive vise à sélectionner des lymphocytes qui reconnaissent des molécules du CMH du soi, mais comme l'affinité requise entre le TCR

et le complexe peptide-CMH à cette étape est moins élevée que lors de la sélection négative, il est possible que certains TCR alloréactifs survivent à cette sélection par une reconnaissance croisée de faible affinité avec le CMH du soi. Par la suite, ces lymphocytes T alloréactifs survivent à la sélection négative, car seulement les lymphocytes T autoréactifs contre les peptides du soi sont éliminés lors de cette sélection. Les lymphocytes T du soi ne sont jamais testés contre d'autres molécules du CMH, car ces dernières ne sont pas exprimées dans ce contexte physiologique (Sykes, Wood et al. 2008). Donc, la caractéristique intrinsèque des lymphocytes T à reconnaître des molécules du CMH et l'absence d'une restriction stricte aux molécules du CMH du soi expliquent la présence de cellules alloréactives. Pour expliquer leur si grande fréquence, deux hypothèses mutuellement non exclusives sont proposées, des preuves venant appuyer chacune des théories (Lechler, Batchelor et al. 1991).

5.2 La haute fréquence des déterminants (dominance peptidique)

Dans le premier modèle, aussi appelé le modèle des multiples complexes binaires, il est suggéré que les lymphocytes T spécifiques pour les molécules du CMH allogéniques soient influencés par le peptide présenté par ces molécules. Le TCR reconnaîtrait donc principalement le peptide présenté par la molécule de CMH allogénique, c'est la dominance peptidique (Matzinger and Bevan 1977) (figure 7c). Comme les molécules du CMH de la CPA allogénique expriment de nombreux peptides endogènes qui ne sont pas nécessairement les mêmes que ceux présentés par les molécules du CMH du soi pour lesquels les lymphocytes T sont tolérants, ceci crée un grand nombre de déterminants antigéniques à la surface des CPA allogéniques et explique pourquoi un grand nombre de lymphocytes T alloréactifs peuvent être activés (Sykes, Wood et al. 2008) (figure 7e).

5.3 La haute densité des déterminants (dominance du CMH)

Ce modèle est plutôt basé sur le fait que le TCR de la cellule T reconnaîtrait principalement des polymorphismes dans les séquences en acides aminés ou une conformation de la molécule du CMH allogénique qui est présente à haute densité sur la

CPA, indépendamment du peptide présenté par le CMH (Bevan 1984; Game and Lechler 2002) (figure 7b). Normalement lors d'une infection, la densité du complexe peptide étranger-CMH sur une CPA du soi est extrêmement faible, car ce complexe se retrouve exprimé parmi tous les autres complexes peptides endogènes-CMH à la surface de cette même CPA et les lymphocytes T qui reconnaissent le peptide étranger doivent être très spécifiques. Par contre, dans le cadre de la transplantation, si on considère les molécules du CMH sur les CPA allogéniques comme des particules étrangères reconnues par les lymphocytes T, la densité de ces molécules est extrêmement élevée puisqu'un nombre élevé de molécules du CMH est exprimé sur une CPA et que toutes ces molécules peuvent potentiellement être reconnues comme étrangères (figure 7d). Ceci pourrait activer par réaction croisée un grand nombre de lymphocytes T avec des TCR de plus faible affinité, d'où la fréquence élevée observée de précurseurs (Lechler, Lombardi et al. 1990; Sykes, Wood et al. 2008).

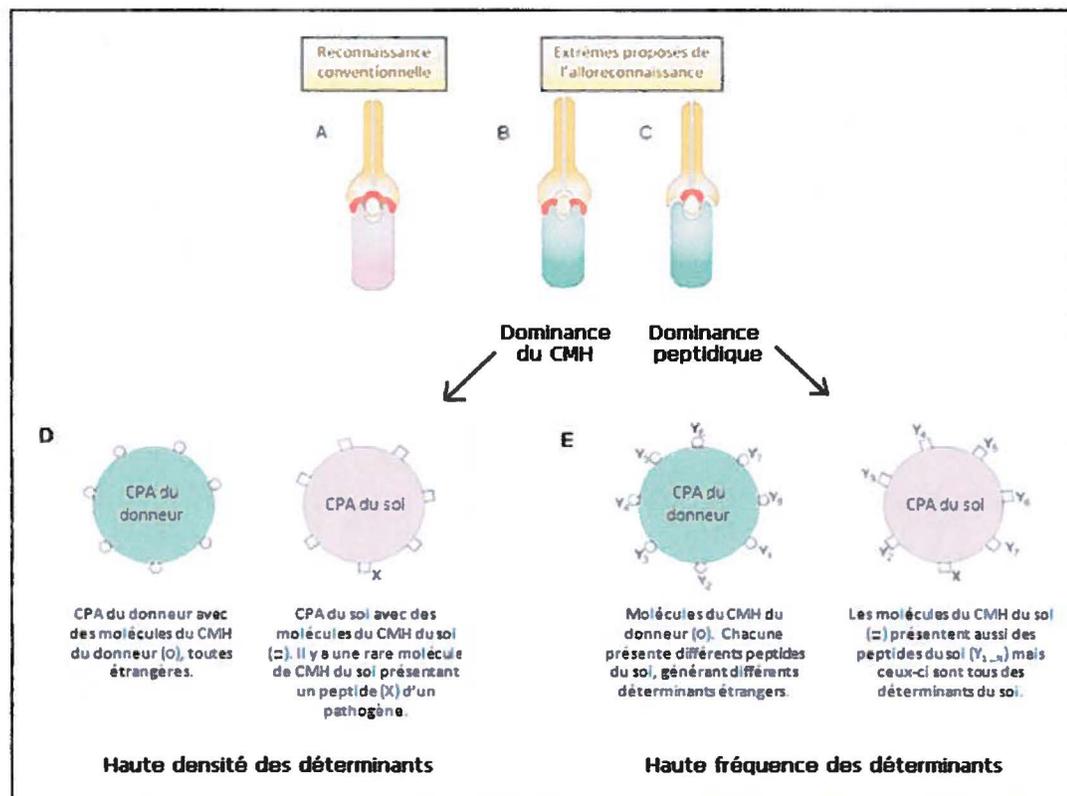


Figure 7 : Hypothèses pour expliquer le grand nombre de lymphocytes T alloréactifs : modèle de la dominance peptidique ou de la dominance du CMH (modifiée de (Sykes, Wood et al. 2008) et (Felix and Allen 2007))

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. The second part outlines the procedures for handling discrepancies and errors, including the steps to be taken when a mistake is identified. The third part provides a detailed breakdown of the financial data, including a summary of income and expenses. The final part concludes with a statement of the total balance and a recommendation for future actions.

6. Mécanismes du rejet

Plusieurs études ont montré un rôle majeur des lymphocytes auxiliaires T CD4+ et des lymphocytes effecteurs T CD8+ dans le rejet. En effet, les individus qui n'ont pas de lymphocytes T tels que les humains atteints du syndrome de DiGeorge, les souris athymiques « nude », les souris « SCID » ou les souris déficientes pour les gènes de recombinaison RAG1 ou RAG2 ne peuvent pas rejeter une greffe. Néanmoins, plusieurs autres mécanismes autant au niveau du système immunitaire inné qu'adaptatif peuvent contribuer au rejet. Dans cette section, le processus à l'origine des signaux inflammatoires, soit l'ischémie et la reperfusion, sera d'abord décrit. Ensuite seront abordées les différentes populations de lymphocytes T si importantes au rejet. Finalement, les autres populations cellulaires pouvant influencer le rejet seront aussi expliquées.

6.1 L'ischémie et la reperfusion

L'ischémie se définit par l'arrêt de l'apport sanguin dans un organe. Conséquemment, les cellules de cet organe sont en hypoxie, c'est-à-dire en manque d'oxygène. À l'opposé, la reperfusion est la restauration de la circulation sanguine dans l'organe et s'en suit la réoxygénation des tissus. Ce phénomène d'ischémie et reperfusion peut survenir de façon naturelle suite à une crise cardiaque ou lors d'interventions chirurgicales où la circulation sanguine doit momentanément être interrompue. Lors de transplantation d'organes solides, ce phénomène est donc inhérent à la procédure chirurgicale pour prélever l'organe du donneur et le transplanter chez le receveur, et ce, malgré les techniques de préservation pour prévenir les dommages dans le greffon (Eltzschig and Eckle 2011; Hosgood, Nicholson et al. 2012). Le phénomène d'ischémie et reperfusion participe grandement à l'initiation des réponses immunitaires dans le greffon et il survient, peu importe s'il y a compatibilité ou non entre le donneur et le receveur (Wood and Goto 2012). Il est même suggéré selon le modèle de signaux de danger de Matzinger (Matzinger 1994) que les dommages subis par les tissus suite à l'ischémie et la reperfusion seraient plus favorables à entraîner le rejet aigu que des incompatibilités au niveau des molécules du CMH. En effet, le pronostic de patients greffés avec un organe

prélevé chez un donneur vivant incompatible est meilleur que celui d'un patient greffé avec un organe d'un donneur cadavérique compatible, car le temps d'ischémie et reperfusion est mieux contrôlé lors d'un don avec un donneur vivant qu'avec un donneur cadavérique qui a subi une mort neurologique ou un arrêt circulatoire ayant potentiellement endommagé les organes (Kim, Bedi et al. 2008).

Les dommages causés par l'ischémie et la reperfusion sont doubles. Tout d'abord, l'hypoxie causée par l'ischémie entraîne un stress cellulaire qui endommage les endothéliums et les rend plus perméables; déclenche des cascades de signalisation qui favorise l'expression de gènes inflammatoires et enclenche des programmes de mort cellulaire (apoptose, nécrose, autophagie) (Eltzschig and Eckle 2011). Lors de la mort des cellules, il y a une libération de molécules endogènes telles que des espèces réactives oxygénées et des protéines de choc thermique (Wood and Goto 2012). Ces molécules, regroupées sous l'appellation de motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMP : damage-associated molecular patterns), sont reconnues par des récepteurs (PRR : pathogen-associated recognition receptor) qui sont exprimés à la surface des cellules du système immunitaire inné (Zhang and Mosser 2008; Chadha, Heidt et al. 2011). Contrairement à ce qu'il serait attendu, la phase de reperfusion qui rétablit la circulation et ainsi l'oxygénation contribue à exacerber les dommages de l'ischémie. En effet, la circulation sanguine rétablie amène aussi les cellules du système immunitaire inné qui peuvent répondre aux signaux inflammatoires générés lors de l'ischémie et participer à amplifier la réponse inflammatoire. Ceci a entre autres, pour effet de stimuler la migration et l'activation des cellules dendritiques du donneur et du receveur pour initier la réponse alloréactive par les lymphocytes T (Chadha, Heidt et al. 2011).

6.2 Les lymphocytes T CD4+

De nombreuses populations cellulaires sont impliquées dans le processus de rejet, mais les lymphocytes T CD4+ ont été identifiés pour y jouer un rôle essentiel (Hall 1991). En effet, des études ont montré que les lymphocytes T CD4+ peuvent mener au rejet de

greffe de cœur et de peau à eux seuls en absence de lymphocytes T CD8+ (Ito, Minagawa et al. 1999; Nozaki, Rosenblum et al. 2008). D'autres études ont même suggéré qu'il ne pouvait y avoir rejet en absence de lymphocytes T CD4+ dans des modèles de greffes de cœur de souris déficientes pour la molécule CD4 (KO) ou qui ont été déplétées de leurs cellules T CD4+ (Bishop, Chan et al. 1993; Krieger, Yin et al. 1996). Depuis, de nouvelles études ont démontré que le rejet peut survenir en leur absence selon le modèle utilisé, le type de greffe utilisé et le nombre d'incompatibilités entre le donneur et le receveur, mais que leur présence reste toujours favorable au rejet (Haskova, Usiu et al. 2000; Jones, Turvey et al. 2001; Youssef, Otley et al. 2004; Porrett, Lee et al. 2008). En effet, les lymphocytes T CD4+ sont essentiels et suffisants pour rejeter les greffes de cœur et de cornée tandis que les greffes de poumons peuvent survenir sans lymphocytes T CD4+. Les greffes de peau, qui sont les plus immunogéniques, pourraient être rejetées autant par les lymphocytes T CD4+ seuls que les lymphocytes T CD8+ seuls (Vu, Amanullah et al. 2004; Youssef, Otley et al. 2004; Gelman, Okazaki et al. 2008).

Les lymphocytes T CD4+, une fois activés de façon directe par une cellule dendritique du donneur ou de façon indirecte par une cellule dendritique du receveur présentant un peptide du donneur, peuvent se différencier en 3 types de lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2 et Th17) selon les cytokines présentes dans l'environnement dans lequel ils se trouvent durant l'activation, le type de CPA qui les activent, la quantité d'antigènes et le temps de stimulation (Rothoef, Gonschorek et al. 2003).

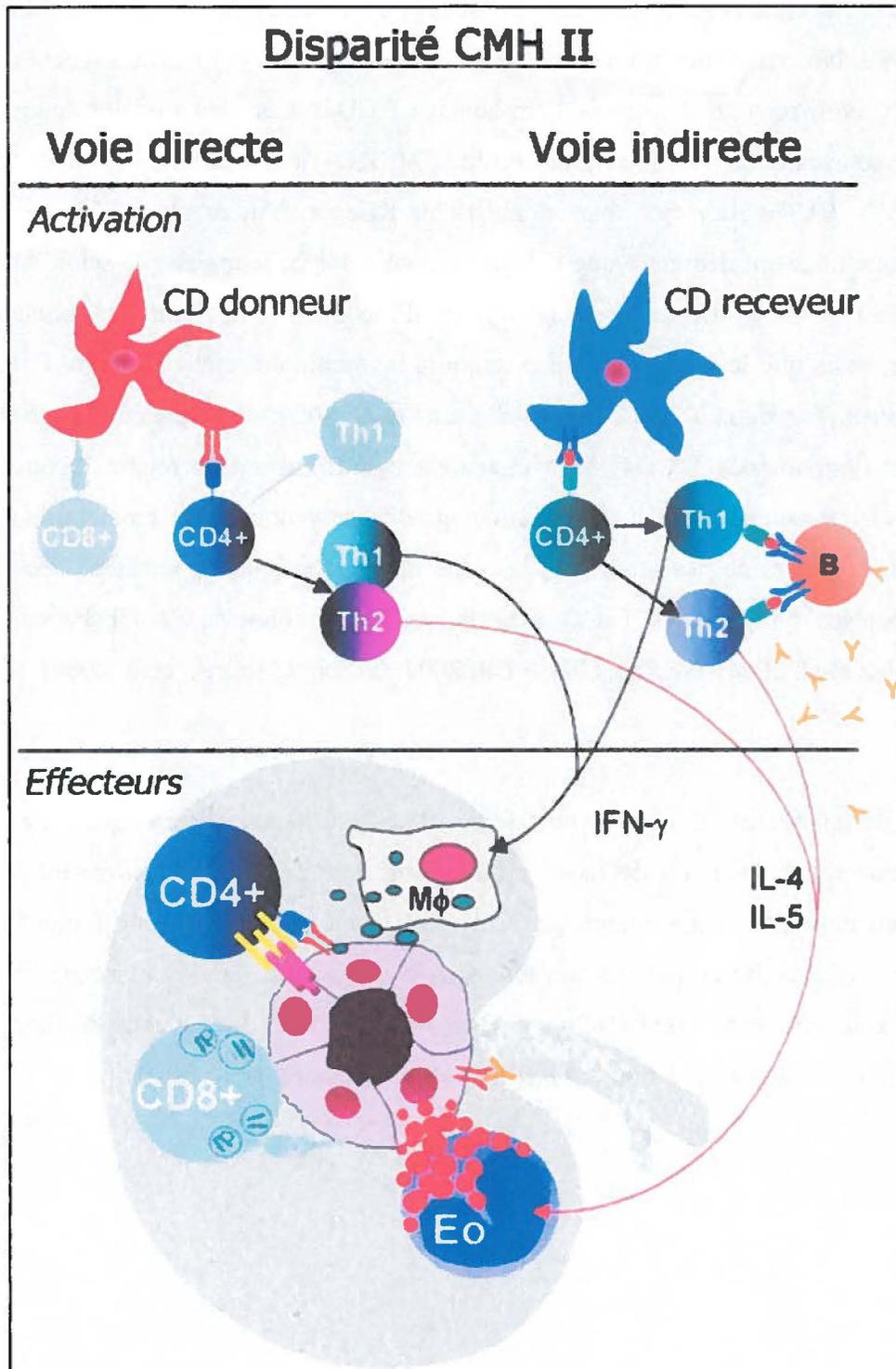


Figure 8 : Implication des lymphocytes T CD4+ dans le rejet de greffe (modifiée de (Le Moine, Goldman et al. 2002).

6.2.1 Les lymphocytes CD4+ Th1

Les lymphocytes T CD4+ se différencient en Th1 si de l'IL-12 ou de l'IFN- γ est présent dans le milieu. L'IL-12 est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques tandis que l'IFN- γ provient des cellules NK et des lymphocytes T CD4+ déjà activés. Une fois activés, les lymphocytes Th1 sécrètent de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2 ce qui résulte en l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, l'hypersensibilité de type retardée (DTH), l'activation des macrophages et une production d'anticorps opsonisants de type IgG2a qui favorisent la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Piccotti, Chan et al. 1997; Lakkis 1998) (figure 8). L'IFN- γ sécrété par lymphocytes Th1 inhibe la prolifération et la différenciation des lymphocytes Th2 (Lakkis 1998).

De plus, les lymphocytes CD4+ Th1 peuvent devenir cytotoxiques via l'expression de FasL qui est inductible quatre ou cinq heures après leur activation (Kagi, Ledermann et al. 1996). La liaison de FasL avec son récepteur Fas, qui est constitutivement exprimé à la surface de la plupart des cellules, déclenche une cascade de caspases qui mène à l'apoptose de la cellule cible (Le Moine, Goldman et al. 2002). Il a été démontré que l'interaction Fas-FasL peut avoir un rôle à jouer dans le rejet, car lors de greffes de peau entre souris incompatibles au niveau des molécules du CMH de classe II, deux mécanismes effecteurs ont été observés soient l'interaction Fas-FasL et le recrutement d'éosinophiles (Le Moine, Surquin et al. 1999).

6.2.2 Les lymphocytes CD4+ Th2

Les lymphocytes T CD4+ se différencient en Th2 si de l'IL-4 est présente dans le milieu. La source de l'IL-4 reste encore nébuleuse quoique une nouvelle population cellulaire, les nuocytes, a récemment été découverte et elle pourrait être à l'origine de la production de l'IL-4 (Neill, Wong et al. 2010). Sinon, les basophiles, les mastocytes, les macrophages, les cellules NKT, les lymphocytes $\gamma\delta$, les éosinophiles et/ou les lymphocytes Th2 eux-mêmes peuvent sécréter de l'IL-4 (Benichou, Fedoseyeva et al. 1994; Aloisi and Pujol-Borrell 2006; Min 2010; Spencer and Weller 2010). Les

lymphocytes Th2 sécrètent surtout de l'IL-4, IL-5 et IL-13, ce qui favorise l'activation des éosinophiles et une production d'anticorps neutralisants (Tesar, Chalasani et al.) et d'IgE par les lymphocytes B lors d'une réponse immunitaire contre un antigène microbien (Le Moine, Goldman et al. 2002). De plus, l'IL-4 inhibe la production d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 (Lakkis 1998).

Certaines études ont montré que dans un contexte où les molécules de classe I et II du CMH sont incompatibles, les lymphocytes T CD8+ activés vont empêcher la différenciation des lymphocytes Th2 via leur production d'IFN- γ et donc favoriser une réponse de type Th1. Par contre, en leur absence ou si seulement les molécules du CMH de classe II sont incompatibles, les lymphocytes T CD4+ vont se différencier en un profil mixte Th1 et Th2 (figure 8) (Le Moine, Goldman et al. 2002). Mentionnons que dans le modèle d'étude utilisé au laboratoire (qui sera présenté plus loin), il n'y pas de lymphocytes T CD8+ présents.

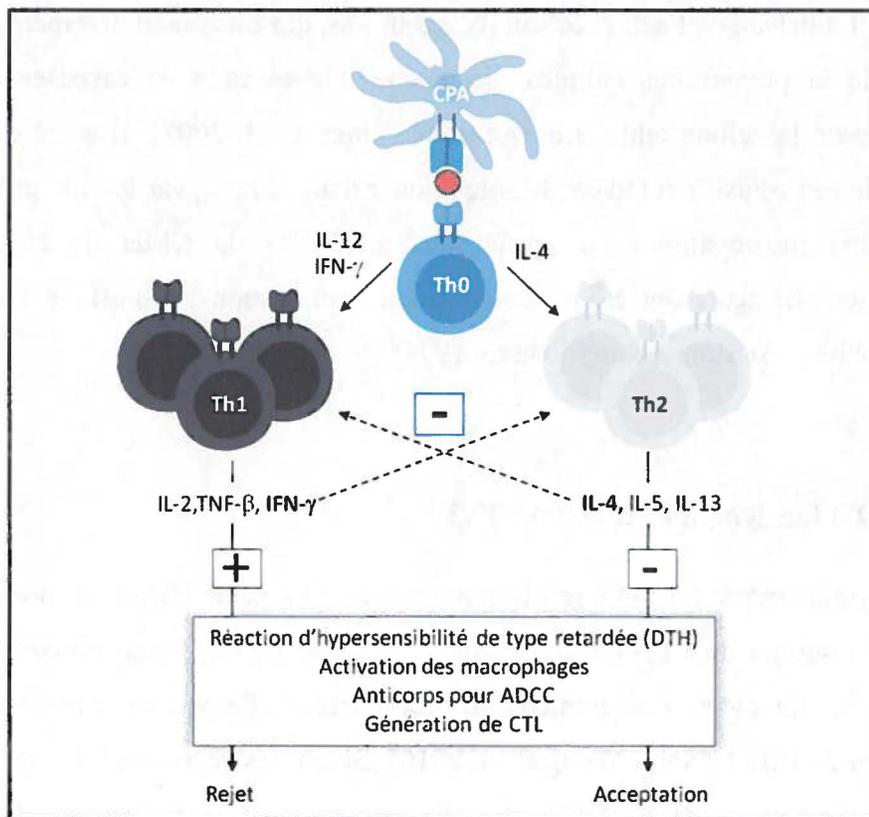


Figure 9 : Différenciation des lymphocytes T CD4+ auxiliaires en Th1 ou Th2 et leurs effets respectifs (modifiée de (Lakkis 1998)).

6.2.3 Le paradigme Th1-Th2 et les réponses allogéniques (figure 9)

Il est généralement accepté que les lymphocytes Th1 favorisent le rejet en initiant les mécanismes mentionnés précédemment. Au contraire, le rôle des lymphocytes Th2 est plus nébuleux dans le cadre de la transplantation (Tay, Plain et al. 2009). Puisque les lymphocytes Th2 sont antagonistes au développement des lymphocytes Th1 et que ceux-ci entraînent le rejet, il a été postulé initialement que favoriser le développement d'une réponse Th2 entraînerait l'acceptation des greffes en supprimant la réponse DTH et la sécrétion de l'IFN- γ par les lymphocytes Th1 (Piccotti, Chan et al. 1997). En effet, les premières expériences effectuées dans le domaine ont démontré que l'expression intragrefe des cytokines de type Th1 était souvent associée au rejet aigu tandis que l'expression intragrefe de cytokines de type Th2 corrélait avec l'induction d'un état de tolérance qui favorisait l'acceptation des greffes (Piccotti, Chan et al. 1997; Shirwan 1999). De nouvelles observations ont par la suite démontré que les cytokines Th2 ne seraient pas indispensables pour induire la tolérance : des études ont démontré que des souris IL-2 et IL-4 doubles déficientes peuvent rejeter une allogreffe avec la même vigueur que les souris de type sauvage (Strom, Roy-Chaudhury et al. 1996; Lakkis 1998; Antonysamy, Fanslow et al. 1999). De plus, les cytokines Th2 seraient peut-être impliquées dans le rejet (Shirwan 1999). En effet, des études menées dans un modèle de greffes rénales et hépatiques ont montré une association entre le rejet des greffes et la présence de cytokines Th2, plus particulièrement l'IL-5, accompagnée par un influx d'éosinophiles (Piccotti, Chan et al. 1997). L'équipe d'Orosz a étudié directement la question en différenciant des lymphocytes Th2 *in vitro* pour les transférer *in vivo* dans un modèle de greffes cardiaques chez des souris SCID. Les souris greffées ont rejeté leur greffe avec une cinétique comparable à celles reconstituées avec des lymphocytes Th1 (VanBuskirk, Wakely et al. 1996). Zelenika et al. ont montré que les lymphocytes Th1 autant que Th2 pouvaient aussi conduire au rejet dans un modèle de greffes de peau incompatibles pour l'antigène mâle (H-Y) (Zelenika, Adams et al. 1998). Par contre, une autre étude a démontré que le transfert adoptif d'une lignée cellulaire de type Th2 pouvait prolonger la survie de greffe de peau (Maeda, Takata et al. 1994). Plus récemment, Csencsits et al ont étudié le rôle des Th2 plus particulièrement dans la voie indirecte dans un modèle de greffe cardiaque en déplaçant les lymphocytes T CD8⁺ et en utilisant des

souris donneuses qui n'expriment pas de molécules CMH de classe II pour s'assurer que les lymphocytes T CD4⁺ répondent seulement par la voie indirecte (Csencsits, Wood et al. 2005). Ils ont observé que les lymphocytes Th2 peuvent provoquer le rejet aigu par la voie indirecte si des souris BALB/c sont greffées avec des cœurs de souris C57BL/6 déficients en CIITA, mais pas l'inverse. La contribution des lymphocytes Th2 au rejet étant toujours nébuleuse, le premier objectif de mon projet était donc d'établir leur rôle dans le rejet avec l'aide du modèle de greffe de peau du laboratoire.

6.2.4 Les lymphocytes CD4⁺ Th17

Plus récemment, il a été découvert que les lymphocytes T auxiliaires peuvent se différencier en un 3^e type de lymphocytes T auxiliaires : les Th17 (Harrington, Hatton et al. 2005; Park, Li et al. 2005; Wynn 2005). Les lymphocytes T naïfs se différencient en Th17 en présence de TGF- β et d'IL-6 (ou IL-21 chez la souris ou IL-1 β chez l'humain) et l'IL-23 agit comme un agent de stabilisation du phénotype. Les lymphocytes Th17 sécrètent principalement de l'IL-17A, mais aussi de l'IL-17F, IL-21 et IL-22 (figure 10). Bien que ces lymphocytes T auxiliaires semblent la principale source d'IL-17, d'autres cellules telles que les lymphocytes T $\gamma\delta$, les lymphocytes T CD8⁺, les cellules NKT ainsi que les cellules inductrices de tissus lymphoïdes (LTi) peuvent aussi sécréter cette cytokine.

L'interleukine 17 favorise l'inflammation en induisant entre autres la production de chimiokines, cytokines, facteurs de croissance, peptides antimicrobiens et métalloprotéases par des cellules de type myéloïde ou mésenchymateux (cellules dendritiques, macrophages, cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes et ostéoblastes) (figure 11). Son action inflammatoire est principalement causée par le recrutement et l'expansion des neutrophiles. Elle a ainsi un rôle physiologique à jouer dans la défense contre certaines infections bactériennes extracellulaires et fongiques (Xu and Cao 2010). Par contre, lorsque la quantité d'IL-17 est mal contrôlée, son effet inflammatoire peut être impliqué dans certaines maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde; sclérose en plaques) ainsi que dans le rejet de greffe (Afzali, Lombardi et al. 2007; Chen and Wood 2007).

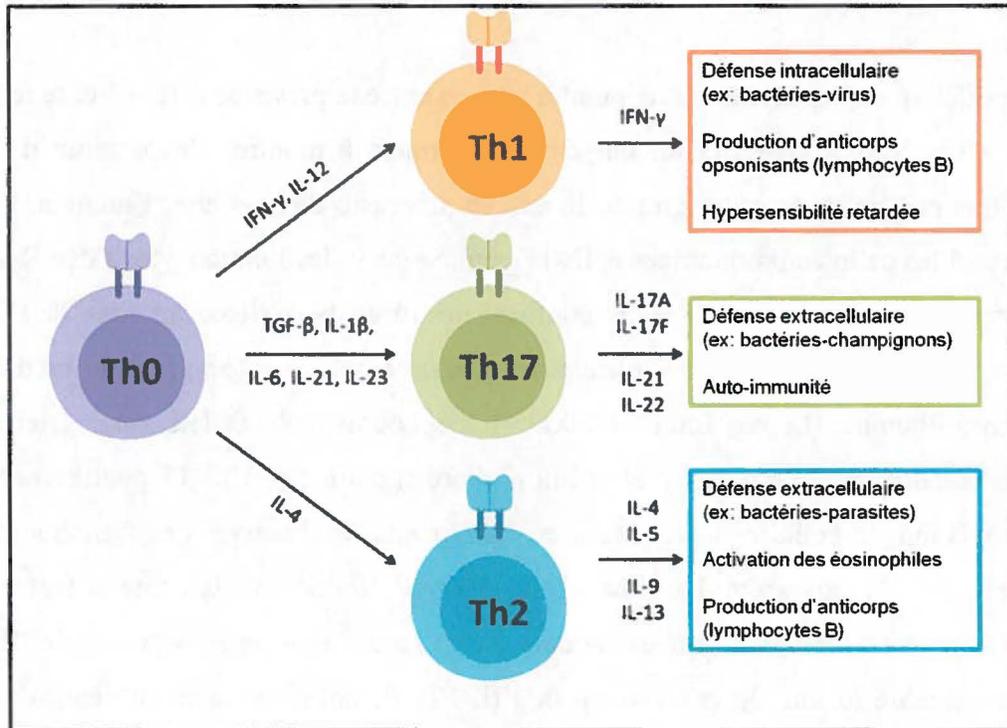


Figure 10 : Différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en auxiliaires Th1, Th2 et Th17 et leurs effets respectifs (modifiée de (Chadha, Heidt et al. 2011)).

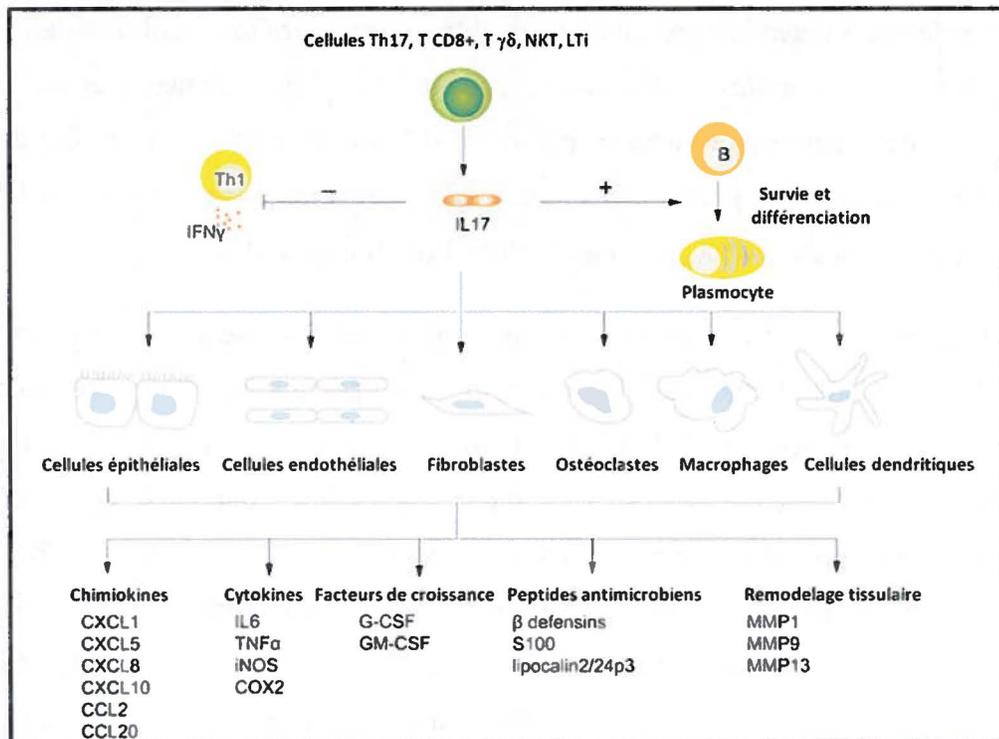


Figure 11 : Les fonctions biologiques de l'IL-17 (modifiée de (Xu and Cao 2010)).

En effet, quelques études ont démontré un lien entre la présence d'IL-17 et le rejet de greffe. Cees Van Kooeten et al. ont été les premiers à montrer l'expression d'IL-17 (ARNm et protéines) dans des greffes de rein en processus de rejet chez l'humain. Ils ont caractérisé les cellules productrices d'IL-17 comme étant des lymphocytes (Van Kooten, Boonstra et al. 1998). Loong et al ont confirmé ces résultats en détectant aussi de l'IL-17 dans les cellules mononucléées infiltrant des greffes rénales rejetées dans un modèle de rat et chez l'humain (Loong, Lin et al. 2000; Hsieh, Loong et al. 2001; Loong, Hsieh et al. 2002). Par ailleurs, Antonysamy et al ont d'abord montré que l'IL-17 peut mener à la différenciation de cellules dendritiques en CPA capables d'activer des lymphocytes T allogéniques (Antonysamy, Fanslow et al. 1999). Ils ont par la suite effectué des transplantations cardiaques dans un modèle murin en utilisant un antagoniste de l'IL-17 (une protéine de fusion : Ig et récepteur de l'IL-17). Ils ont observé une absence de rejet aigu, mais l'apparition de la dysfonction chronique du greffon chez les souris traitées avec l'antagoniste en comparaison avec les souris témoins (Tang, Subbotin et al. 2001). Une étude similaire, utilisant un antagoniste de l'IL-17 dans un modèle de greffes de cœur chez le rat, a obtenu des résultats semblables, c'est-à-dire un retard dans le rejet de greffe chez les rats traités avec l'antagoniste de l'IL-17 (Li, Simeoni et al. 2006). Néanmoins, deux équipes ont démontré que l'IL-17 pouvait aussi avoir un rôle dans la dysfonction chronique du greffon dont l'une d'elles démontrant que la source de l'IL-17 était les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Faust, Lu et al. 2009; Itoh, Nakae et al. 2010).

L'IL-17 peut causer des dommages aux greffons en favorisant le recrutement des neutrophiles. En effet, l'étude de Vanaudenaerde et al., comme plusieurs autres études, a démontré la présence de l'IL-17 ainsi que de neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires de patients ayant subi une transplantation pulmonaire et manifestant un épisode de rejet (Vanaudenaerde, Dupont et al. 2006; Chadha, Heidt et al. 2011). À l'inverse, lors de greffes cardiaques de souris IL-17^{-/-}, un délai de l'infiltration de neutrophiles et des lymphocytes ainsi que des chimiokines CXCL1 et CXCL2 dans le greffon est observé en comparaison avec les souris de type sauvage, suggérant un rôle

important à jouer pour IL-17 dans l'initiation de la réponse inflammatoire précédant le rejet de greffe (Gorbacheva, Fan et al. 2010).

Malgré l'accumulation de preuves démontrant un rôle de l'IL-17 dans le rejet de greffe, bien peu d'études ont caractérisé directement la présence de lymphocytes Th17 dans les greffes. Yuan et al. est une des rares équipes à s'être attardée sur ce point. Étonnamment, ils ont montré que des souris déficientes pour T-bet (le facteur de transcription essentiel pour la différenciation en lymphocytes Th1) développaient un rejet cardiaque accéléré accompagné d'une inflammation sévère, la présence de neutrophiles et une infiltration de lymphocytes T CD4+ sécrétant de l'IL-17 (Yuan, Paez-Cortez et al. 2008). Toutefois, la présence de lymphocytes Th17 n'est pas détectée dans les greffons chez les souris de type sauvage, probablement dû à l'effet inhibiteur de T-bet sur la différenciation des lymphocytes Th17 soulevant la question du rôle des lymphocytes Th17 dans un contexte physiologique. D'autres études seront requises afin d'éclaircir l'implication des lymphocytes Th17 dans le rejet de greffe.

6.3 Les lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ ont aussi un rôle très important à jouer dans le rejet de greffe surtout à titre de cellules effectrices qui reconnaissent les cellules du greffon exprimant des molécules étrangères du CMH de classe I. En effet, les lymphocytes T CD8+ seuls peuvent aussi mener au rejet de greffe de peau, mais pas de cœur. Par contre, ils n'ont jamais été démontrés comme étant essentiels à un quelconque type de rejet (Bishop, Chan et al. 1993; Krieger, Yin et al. 1996; Vu, Amanullah et al. 2004; Youssef, Otley et al. 2004; Jones, Carvalho-Gaspar et al. 2006; Porrett, Lee et al. 2008). D'ailleurs, le modèle de greffe de peau utilisé au laboratoire n'implique pas la participation des lymphocytes T CD8+ pour conduire au rejet. Les lymphocytes T CD8+ ont besoin d'IL-2 pour être activés. Initialement, il était suggéré que l'activation des lymphocytes T CD8+ nécessitait absolument l'aide des lymphocytes T CD4+ (Zhang, Zhang et al. 2009). Par contre, de nouvelles études ont démontré que les lymphocytes T CD8+ pouvaient être activés en absence de lymphocytes T CD4+. La nécessité ou non de l'aide des CD4+

dépendrait plutôt du niveau de costimulation induit chez la CPA par l'antigène, qu'il soit microbien ou tissulaire (Hernandez, Shen et al. 2007). Une fois activés, les lymphocytes T CD8+ détruisent les cellules du greffon via des mécanismes de cytotoxicité tels que l'interaction de FasL avec Fas et surtout par la sécrétion de perforines et granzymes. Il est suggéré que les lymphocytes T CD8+ ont un rôle dominant dans le rejet des cellules allogéniques exprimant des molécules du CMH de classe I, car des expériences utilisant des souris déficientes en perforines dans un modèle de greffe de cœur ont démontré qu'il y avait un retard significatif dans le rejet lorsque le donneur et le receveur étaient incompatibles au niveau des molécules du CMH de classe I seulement (Schulz, Schuurman et al. 1995).

6.4 Les lymphocytes T régulateurs

Bien que les médicaments immunosuppresseurs soient de plus en plus efficaces pour prévenir le rejet aigu, le problème de la dysfonction chronique du greffon subsiste toujours sans compter la toxicité et les effets secondaires de ces médicaments. C'est pourquoi beaucoup de recherches sont faites afin de trouver une stratégie qui pourrait directement induire la tolérance, c'est-à-dire un état où le système immunitaire ne répond pas contre un antigène spécifique (dans le cas de la transplantation, un alloantigène), mais répond contre d'autres antigènes (antigènes microbiens). Une de ces stratégies pourrait être l'utilisation des lymphocytes T régulateurs. Bien que leur existence soit connue depuis longtemps, les lymphocytes T régulateurs ont été caractérisés officiellement en 1995 par le groupe de Sakaguchi et il est reconnu que ces lymphocytes T régulateurs ont un rôle primordial dans la suppression des réponses immunitaires contre les antigènes du soi ou étranger et donc dans la prévention des maladies auto-immunes (Mills 2004). Il est aussi reconnu qu'ils ont un certain rôle à jouer dans l'induction de la tolérance lors d'une greffe et leur utilisation est une avenue prometteuse (Wood and Sakaguchi 2003; Kang, Tang et al. 2007).

Il existe plusieurs types de lymphocytes T régulateurs impliqués dans la tolérance périphérique et la nomenclature varie selon la littérature, mais ils peuvent être divisés principalement en deux groupes selon leur expression de FOXP3 (figure 12).

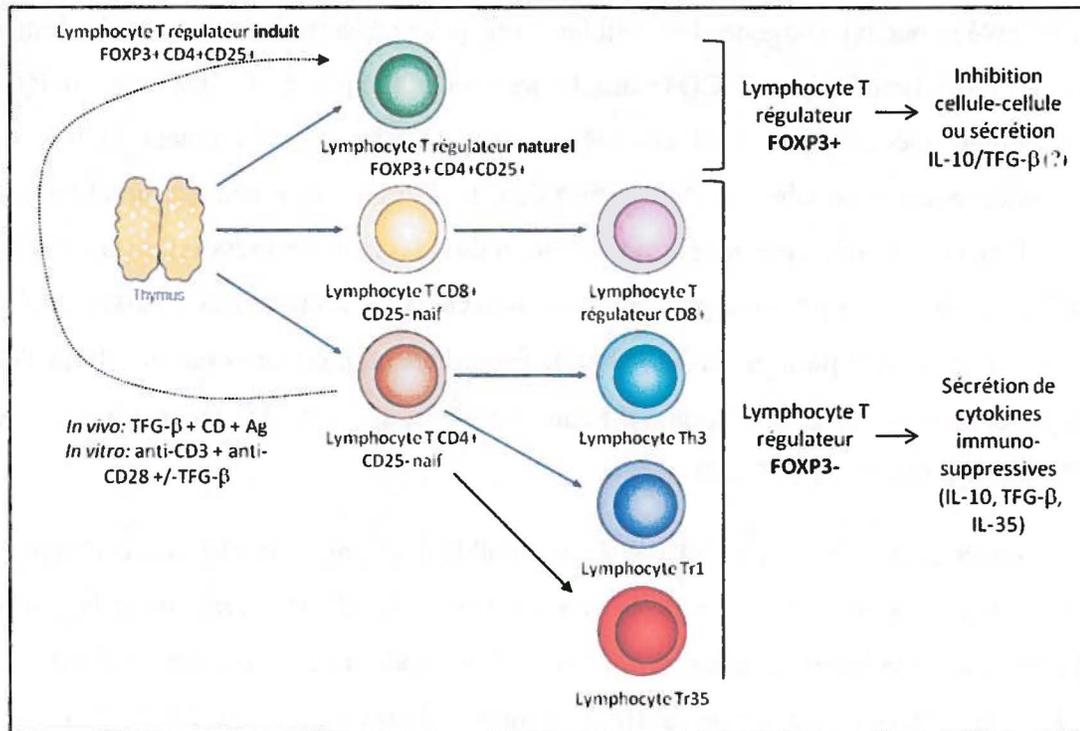


Figure 12 : Les différents sous-types de lymphocytes T régulateurs (modifiée de (Mills 2004)).

6.4.1 Les lymphocytes T régulateurs FOXP3+ (Treg)

Les lymphocytes T régulateurs FOXP3+ peuvent être CD4+ ou CD8+, mais les CD4+FOXP3+ ont un rôle beaucoup plus important pour le maintien de la tolérance immunologique et ils sont plus connus et mieux caractérisés. Ce sont ces lymphocytes T régulateurs qui sont qualifiés de « Treg » dans la littérature. Les Treg « naturels » sont issus du thymus suite à une sélection positive du TCR, mais le reste du mécanisme de sélection est encore controversé (Leguern 2011). Ils expriment constitutivement les marqueurs CD4, CD25, CTLA-4 et GITR, mais aucun n'est exclusif à ce type cellulaire. Le gène codant pour le facteur de transcription FOXP3 est essentiel pour leur développement et leur fonction (Gorantla, Schneeberger et al. 2010). Il peut d'ailleurs servir de marqueur spécifique pour ces cellules lorsqu'un marquage intracellulaire est possible. Les cellules ont besoin des cytokines IL-2 et de TGF-β pour leur maintien et leur fonctionnement. Dans la périphérie, les cellules Treg représentent 5 à 10 % du répertoire des lymphocytes (Kang, Tang et al. 2007; Spoerl and Li 2011). Lorsqu'elles

sont stimulées par un antigène, les cellules Treg peuvent supprimer la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD4+ auxiliaires ou des lymphocytes CD8+ cytotoxiques par différents mécanismes, mais ces mécanismes ne sont pas clairement définis. La suppression pourrait se faire par l'utilisation de CTLA-4 lors d'un contact direct entre la cellule Treg et la cellule cible ou par un contact indirect, via la suppression de la CPA par la cellule Treg. La suppression pourrait aussi passer par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- β ou par la sécrétion de perforines et granzymes par la cellule Treg (Wing, Fehervari et al. 2006; Gorantla, Schneeberger et al. 2010; Dummer, Carpio et al. 2012; Gregori, Goudy et al. 2012).

Plusieurs études ont montré qu'il était impossible d'obtenir une tolérance d'allogreffe chez des souris préalablement déplétées en cellules CD4+CD25+ Treg avant la greffe, indiquant que les cellules Treg naturelles ont un rôle important à jouer dans l'induction de la tolérance dans ces modèles de greffe (Gorantla, Schneeberger et al. 2010). Les effets causés par les cellules Treg sur les cellules T alloréactives résultent en l'inhibition de la production de cytokines, la diminution de l'expression des molécules de costimulation, l'inhibition de la prolifération, l'induction de l'anergie ou la délétion de ces cellules effectrices (Wood and Sakaguchi 2003). Un des mécanismes d'action des cellules Treg lors de la transplantation est la suppression croisée. Cette propriété est intéressante dans l'optique d'un traitement pour générer des cellules Treg car une cellule T régulatrice activée par un seul alloantigène du donneur peut ensuite supprimer des lymphocytes T alloréactifs (CD4+ ou CD8+) reconnaissant le même alloantigène ou des alloantigènes différents du donneur, pourvu que les CPA expriment l'alloantigène pour lequel la cellule T régulatrice est spécifique (figure 13).

Par ailleurs, il a été démontré que les lymphocytes naïfs (cellules T CD4+ CD25-) en périphérie peuvent devenir des lymphocytes CD4+CD25+ qui expriment FOXP3 lors d'une stimulation antigénique en présence de TGF- β (Wood and Sakaguchi 2003; Gorantla, Schneeberger et al. 2010). Dans ce cas, ils sont appelés des lymphocytes T régulateurs « induits ». Les lymphocytes Treg peuvent aussi être induits *in vitro* par la stimulation de cellules T CD4+CD25- avec des anticorps anti-TCR et anti-CD28 en

présence (ou non) de TGF- β (Kang, Tang et al. 2007; Gorantla, Schneeberger et al. 2010).

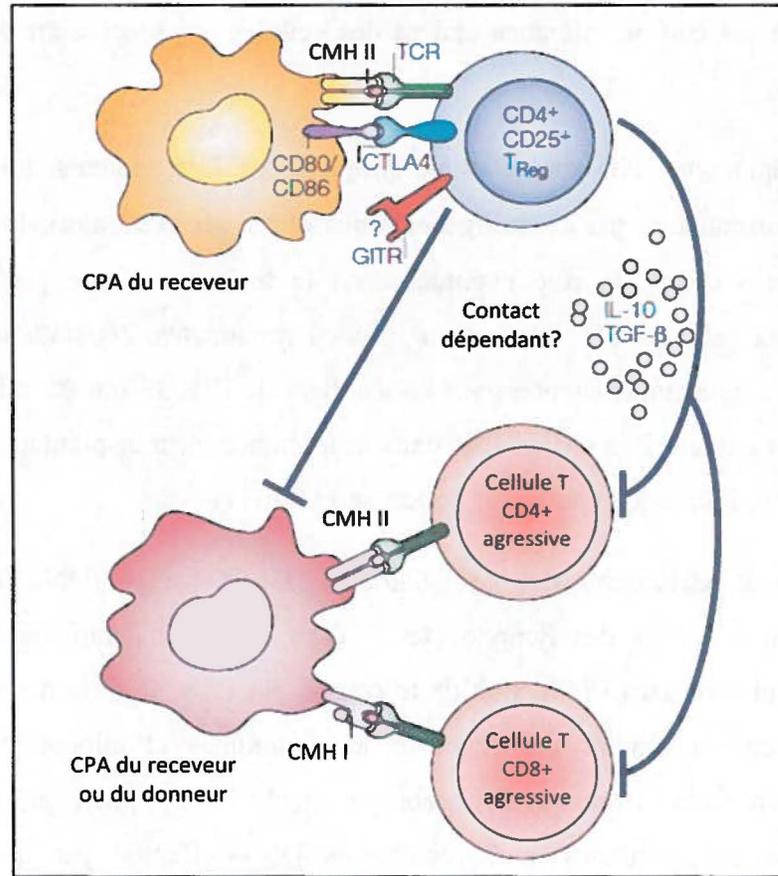


Figure 13 : Le mode d'action des lymphocytes T régulateurs dans la transplantation (modifiée de (Wood and Sakaguchi 2003)).

6.4.2 Les lymphocytes T régulateurs FOXP3-

Il existe plusieurs autres types de lymphocytes T régulateurs, mais qui n'expriment pas FOXP3 et dont certains sont plus ou moins bien connus (figure 12). Leur rôle dans la transplantation n'est pas toujours établi alors ils seront décrits brièvement. Tout d'abord, les Tr1 sont des lymphocytes régulateurs qui sont induits en périphérie par une stimulation antigénique et qui effectuent leur action suppressive en sécrétant principalement de l'IL-10 (Groux 2003; Wing, Fehervari et al. 2006; Gorantla, Schneeberger et al. 2010). Ils ont été découverts chez un patient SCID (sans lymphocytes)

ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques et n'ayant subi aucun épisode de la maladie du greffon (GVHD), c'est-à-dire une attaque des cellules du receveur par les lymphocytes T du donneur provenant du greffon. Il a été découvert que les cellules responsables de cet état de tolérance étaient des cellules qui sécrétaient de l'IL-10, les Tr1.

Les lymphocytes Th3 sont d'autres lymphocytes T régulateurs qui sont générés surtout lors de stimulation par des antigènes oraux et qui sécrètent alors du TGF- β , mais aucune étude n'a décrit un rôle éventuel dans la tolérance d'une greffe (Gorantla, Schneeberger et al. 2010). Récemment, les lymphocytes régulateurs Tr35, des lymphocytes aux propriétés suppressives et sécrétant de l'IL-35 ont été décrits. Ils sont encore bien peu caractérisés et leur rôle dans la tolérance en transplantation n'a pas été examiné (Newell, Phippard et al. 2011; Spoerl and Li 2011).

Finalement, les lymphocytes T régulateurs CD3+CD4-CD8- (DN : double négatif) qui représentent 1 à 5 % des lymphocytes T dans les tissus lymphoïdes secondaires peuvent jouer un rôle dans l'induction de tolérance. En effet, il a été démontré que ces lymphocytes peuvent inhiber des réponses auto-immunes et alloréactives de façon spécifique à l'antigène (Gorantla, Schneeberger et al. 2010; Spoerl and Li 2011). La suppression par les lymphocytes T régulateurs DN s'effectue par la sécrétion de perforines et granzymes (Gorantla, Schneeberger et al. 2010; Spoerl and Li 2011).

6.4.3 Les lymphocytes T régulateurs dans la transplantation

L'idée d'utiliser les lymphocytes T régulateurs pour induire un état permanent de tolérance à une allogreffe est très attrayante. Plusieurs études ont déjà démontré l'implication de différents sous-types de lymphocytes T régulateurs dans l'induction de tolérance dans diverses pathologies et/ou modèles de transplantation (Gorantla, Schneeberger et al. 2010). Par contre, aucune étude n'a encore démontré que le transfert de cellules T régulatrices peut induire une tolérance allospécifique dans un contexte véritable, c'est-à-dire chez un individu ayant subi aucune manipulation de son système immunitaire et recevant une greffe totalement allogénique. Plusieurs stratégies sont en

cours d'expérimentation pour profiter du rôle des différents lymphocytes T régulateurs dans l'induction de tolérance (principalement les lymphocytes Treg naturels ou induits et les lymphocytes Tr1).

Comme le résultat d'une greffe, tolérance vs rejet, semble être déterminé par la balance entre la quantité de cellules T régulatrices et de cellules T alloréactives et que le nombre de cellules T alloréactives est énormément plus élevé que le nombre de cellules T régulatrices, les stratégies en développement tentent donc de réduire le nombre de cellules T alloréactives et d'augmenter le nombre de cellules T régulatrices. D'ailleurs, certaines études ont essayé d'induire la tolérance en administration seulement des lymphocytes T régulateurs générés *in vitro* à des receveurs lors de transplantation, mais presque toutes ces expériences se sont avérées un échec (Leguern 2011). Un premier axe de recherche vise à stimuler le développement des lymphocytes T régulateurs naturels *in vivo* par l'administration de certains traitements immunosuppresseurs avec ou sans l'administration conjointe d'alloantigènes. Un autre axe de recherche travaille à induire *in vitro* des lymphocytes T régulateurs spécifiques d'un alloantigène à partir de lymphocytes T isolés chez un patient pour ensuite les lui réinjecter lors de la transplantation (Wood and Sakaguchi 2003).

Plusieurs facteurs sont à prendre en considération lors du développement de ces stratégies afin d'en arriver à les utiliser un jour chez l'humain, en voici quelques-uns. En ce qui concerne l'utilisation des traitements immunosuppresseurs, il faut bien caractériser leurs effets sur les cellules T régulatrices. Les traitements immunosuppresseurs de la classe des inhibiteurs de la calcineurine comme la cyclosporine et le tacrolimus empêchent la production d'IL-2 qui est nécessaire au développement des cellules T alloréactives, mais cette cytokine est aussi indispensable pour les cellules T régulatrices (Gorantla, Schneeberger et al. 2010; Dummer, Carpio et al. 2012). Ce type d'immunosuppresseurs serait donc à proscrire dans une thérapie impliquant des lymphocytes T régulateurs. D'autres traitements immunosuppresseurs, tels que le MMF (mycophénolate mofetil), n'influencent pas le fonctionnement des lymphocytes T régulateurs et vont même dans le sens opposé, c'est-à-dire qu'une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs est observée lors de leur utilisation (Gorantla,

Schneeberger et al. 2010). Ils sont donc à considérer pour aller de l'avant avec l'usage des lymphocytes T régulateurs.

Dans l'optique de générer ou d'amplifier des lymphocytes T régulateurs *in vitro*, plusieurs points sont à vérifier. Tout d'abord, il est difficile d'isoler des cellules T régulatrices, car leur nombre est faible et il n'existe pas de marqueurs extracellulaires spécifiques à ces cellules bien que la combinaison de plusieurs marqueurs augmente de plus en plus le degré de pureté lors de l'isolement (Newell, Phippard et al. 2011; Tang, Bluestone et al. 2012). Ce problème pourrait être contourné en prélevant des cellules T CD4⁺CD25⁻ et en les différenciant *in vitro* comme il a déjà été démontré. Dans les deux cas, il faudrait s'assurer que ces cellules survivent et migrent vers le greffon suite à la réinjection chez le patient. De plus, il faut qu'elles conservent leur propriété suppressive *in vivo* et qu'elles ne changent pas de phénotype lorsqu'elles sont exposées aux différentes molécules inflammatoires dans le greffon, car certaines études démontrent que les lymphocytes T régulateurs autant naturels qu'adaptatifs possèdent une certaine plasticité (Spoerl and Li 2011; Tang, Bluestone et al. 2012). En effet, certains lymphocytes T régulateurs peuvent être redifférenciés en lymphocytes Th17 en présence de TGF- β et d'IL-6. L'IL-6, une cytokine inflammatoire, est notamment sécrétée suite aux dommages causés par la chirurgie lors d'une greffe (Kang, Tang et al. 2007; Gorantla, Schneeberger et al. 2010).

Finalement, il est à noter que la plupart des études présentes sont effectuées sur des modèles murins. Les lymphocytes T régulateurs de la souris et de l'humain sont assez semblables, mais il existe certaines différences. Par exemple, chez l'humain les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ activés (CD25⁺) expriment aussi temporairement FOXP3 rendant la distinction entre une cellule alloréactive activée et une cellule Treg très difficile (Newell, Phippard et al. 2011). De plus amples connaissances sur les cellules Treg humaines sont donc requises pour établir des protocoles de tolérance impliquant les cellules Treg en transplantation.

6.5 Les lymphocytes B, les anticorps et le rejet humoral

Il est reconnu que les anticorps produits par les lymphocytes B peuvent jouer un rôle important dans le rejet de greffe (décrit plus loin). Les anticorps préformés ont un rôle majeur dans le rejet hyperaigu tandis que les anticorps synthétisés suite à la transplantation ont un rôle important dans le rejet chronique, mais il a aussi été démontré qu'ils peuvent avoir une influence sur le rejet aigu même s'ils ne sont pas le principal mécanisme impliqué (Le Moine, Goldman et al. 2002). En effet, des souris déficientes en lymphocytes B sont capables de rejeter leur greffon de façon aigu, mais de l'artériosclérose typique du rejet chronique ne se développe pas dans ces souris (Arakelov and Lakkis 2000). Les anticorps préformés causent le rejet hyperaigu presque instantanément en favorisant la coagulation et le blocage des vaisseaux sanguins car ils sont présents en très grand nombre. Par contre au niveau du rejet aigu, ils peuvent participer au rejet en causant des dommages à l'endothélium par les mécanismes décrits auparavant. Finalement dans le rejet chronique, ils vont initier une cascade d'événements qui conduit à la prolifération du muscle lisse de l'intima et donc à une éventuelle occlusion des vaisseaux sanguins (Terasaki and Cai 2005). De plus en plus d'évidences suggèrent aussi que les lymphocytes B eux-mêmes peuvent intervenir dans le processus du rejet, indépendamment des anticorps (Zarkhin, Li et al. 2008; Clatworthy 2011). En effet, les lymphocytes B sont présents parmi les cellules infiltrant le greffon (Kamoun 2006). Ils sont des CPA efficaces qui reconnaissent des molécules étrangères du CMH via leur immunoglobuline (Ig) de surface. Ils internalisent ces molécules allogéniques, les dégradent en allopeptides et les chargent sur leurs propres molécules du CMH de classe II pour les présenter aux lymphocytes T CD4+ de la voie indirecte (Montgomery, Cozzi et al. 2011; Redfield, Rodriguez et al. 2011). Cette interaction entre les lymphocytes B et T fournit les signaux de costimulation nécessaires pour la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et la production d'anticorps. Du même coup, en agissant comme CPA, les lymphocytes B participent à l'initiation de la réponse alloréactive indirecte par les lymphocytes T CD4+. Par ailleurs, les lymphocytes B sécrètent des cytokines inflammatoires et des chimiokines et participent au développement des tissus lymphoïdes (Zarkhin, Li et al. 2008). Toutefois, de nouvelles études démontrent qu'il existe aussi des lymphocytes B de type régulateur qui sécrètent de l'IL-10 et qui sont bénéfiques pour

l'induction d'une tolérance dans la greffe (Clatworthy 2011; Redfield, Rodriguez et al. 2011). Cette nouvelle population explique pourquoi, dans certains modèles, le rejet de greffe est retardé lorsque les receveurs sont dépourvus de lymphocytes B alors que dans d'autres modèles, le rejet est accéléré (Redfield, Rodriguez et al. 2011). D'éventuelles stratégies visant à empêcher le rejet induit par les lymphocytes B devront cibler spécifiquement les populations de lymphocytes B effecteurs et maintenir les lymphocytes B régulateurs.

Il est connu depuis longtemps que les lymphocytes T ont un rôle primordial à jouer dans le rejet de greffe, mais il a fallu plusieurs années avant que soit reconnu le fait que les anticorps contribuent de façon significative au rejet de greffe, autant aigu que chronique (Colvin and Smith 2005). Le rejet causé par la présence d'anticorps chez le receveur est qualifié de rejet humoral. Ces anticorps, communément appelés « anticorps anti-donneur », sont produits suite à la reconnaissance d'antigènes incompatibles exprimés par les cellules de l'organe transplanté. Les principaux alloantigènes reconnus par ces anticorps anti-donneur sont les molécules du CMH, mais cela peut aussi être les antigènes du système ABO lors d'une transplantation entre individus de groupes sanguins incompatibles ou de façon plus rare, des antigènes mineurs de compatibilité exprimés par les cellules endothéliales (Montgomery, Cozzi et al. 2011).

Les anticorps anti-donneur peuvent être préformés (receveur sensibilisé) ou synthétisés *de novo* suite à la transplantation. Les anticorps préformés sont générés suite à des transfusions sanguines, des grossesses ou des transplantations antérieures (Colvin and Smith 2005). En grand nombre, ces anticorps causent un rejet très rapide (rejet hyperaigu) des greffes vascularisées, car ils réagissent avec les antigènes du donneur exprimés sur les cellules endothéliales de la greffe immédiatement après la transplantation. Les anticorps synthétisés après la transplantation causent un rejet un peu moins rapide (rejet aigu) car ils doivent être synthétisés, donc les lymphocytes B doivent reconnaître un alloantigène, le présenter aux lymphocytes T pour être activés et se différencier en plasmocytes. Donc, les anticorps préformés en petite quantité ou synthétisés *de novo* sont impliqués dans le rejet aigu et chronique (Colvin and Smith 2005; Kamoun 2006). Par exemple, il a été démontré que la présence d'anticorps anti-HLA est un facteur de risque très associé avec

un éventuel rejet de greffe (Kamoun 2006; Ganji and Harririan 2012). Les mécanismes par lesquels les anticorps participent au rejet sont décrits dans le paragraphe suivant.

Dans le rejet humoral, les anticorps du receveur ont pour cible les molécules allogéniques à la surface des cellules endothéliales du donneur. Leurs effets primaires sont donc d'endommager les cellules endothéliales et secondairement, les dommages causés par la liaison des anticorps sur les endothéliums conduisent aux événements qui sont responsables des différents types de rejet (figure 14) (Colvin and Smith 2005). Les anticorps peuvent endommager les cellules endothéliales par quatre moyens différents (Cai and Terasaki 2005). Les trois premiers moyens impliquent des molécules de la cascade du complément activées par les anticorps.

- Moyen numéro 1 : l'activation du complément consiste en une cascade enzymatique qui résulte en la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) qui crée un pore dans la membrane de la cellule cible causant ainsi la lyse de la cellule (figure 15) (Cai and Terasaki 2005; Colvin and Smith 2005).
- Moyen numéro 2 : lors de la cascade enzymatique, plusieurs fragments protéiques avec des fonctions inflammatoires et chimiotactiques sont libérés tels que les fragments C3a et C5a. Les neutrophiles et les macrophages, qui possèdent des récepteurs pour ces fragments, sont attirés par chimiotactisme et peuvent causer des dommages à l'endothélium en relâchant des molécules toxiques et/ou inflammatoires (Cai and Terasaki 2005; Colvin and Smith 2005).
- Moyen numéro 3 : le fragment C3b qui est présent sur les cellules endothéliales pendant l'activation du complément est une opsonine, c'est-à-dire qu'il favorise la phagocytose. Les macrophages possèdent un récepteur pour le fragment C3b et peuvent donc phagocyter les cellules endothéliales (Cai and Terasaki 2005).

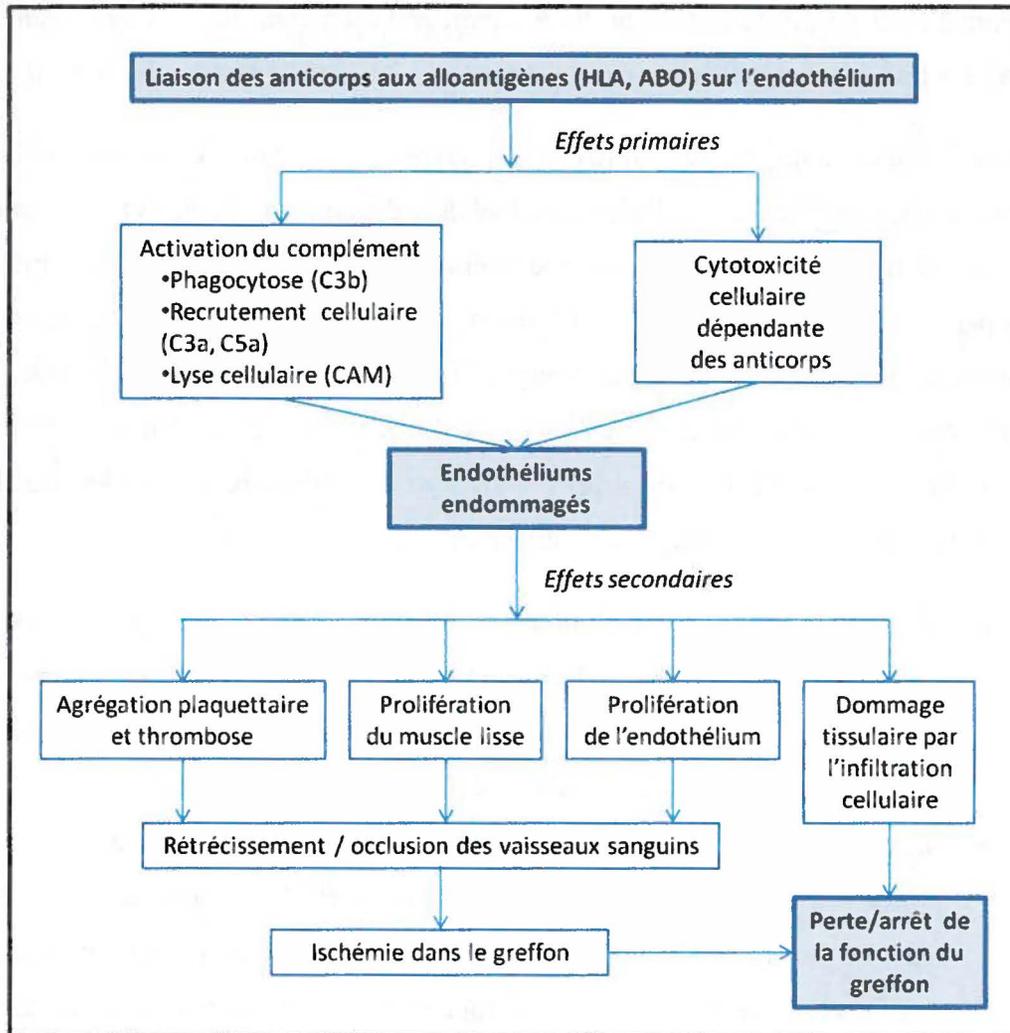


Figure 14 : Mécanismes du rejet humoral déclenchés par la liaison des anticorps aux alloantigènes sur les cellules endothéliales (modifiée de (Cai and Terasaki 2005)).

Finalement, les anticorps fixés sur les cellules endothéliales peuvent activer les macrophages et les cellules NK par la liaison entre la portion Fc de l'anticorps et les récepteurs FcγRIII exprimés sur ces cellules (Cai and Terasaki 2005; Colvin and Smith 2005). Cette liaison induit la lyse des cellules cibles, mécanisme connu sous le nom de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Arakelov and Lakkis 2000).

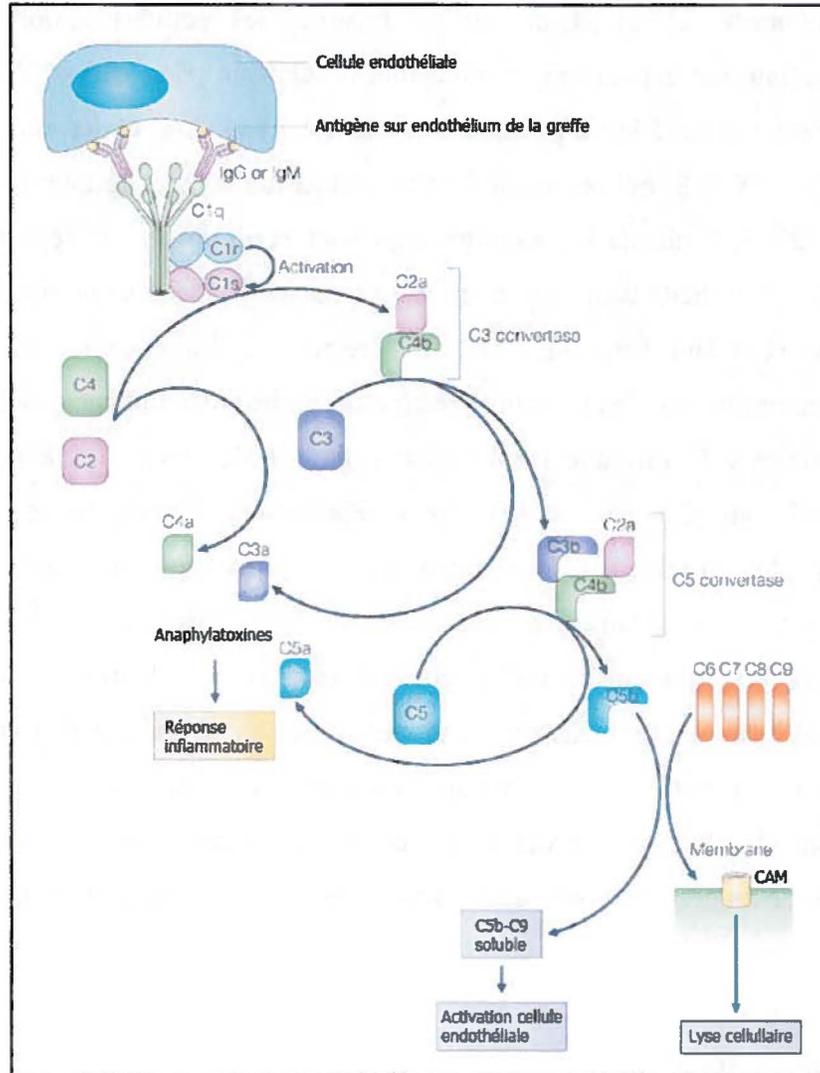


Figure 15 : Activation du complément par les anticorps liés sur les cellules endothéliales et leurs effets (modifiée de (Colvin and Smith 2005)).

Les cellules endothéliales endommagées et activées par la liaison des anticorps et du complément à leur surface causent les effets suivants. Premièrement, les cellules endothéliales activées libèrent une substance (facteur de von Willebrand) qui favorise l'agrégation plaquettaire, ce qui crée une thrombose, c'est-à-dire la formation de caillots qui obstruent les vaisseaux sanguins et mène à l'arrêt de la fonction du greffon (Cai and Terasaki 2005). Ce mécanisme est particulièrement important lorsqu'il y a une grande quantité d'anticorps préformés et il est à l'origine du rejet hyperaigu

(Montgomery, Cozzi et al. 2011). Ensuite, les cellules endothéliales activées augmentent leur expression de molécules d'adhésion (E-sélectine, VCAM1, ICAM1) et sécrètent des cytokines proinflammatoires (IL-1 et IL-6) et des chimiokines (CCL2, CCL5 et CXCL8) qui recrutent de plus en plus de cellules immunitaires (Colvin and Smith 2005). Puisque les endothéliums sont compromis, les cellules immunitaires peuvent plus facilement migrer du sang vers les tissus pour détruire les cellules du greffon (Cai and Terasaki 2005). La destruction des endothéliums causée par ce recrutement de cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages, cellules NK) et par le complément ainsi que l'infiltration cellulaire des tissus est à l'origine du rejet humoral aigu (Cai and Terasaki 2005). Finalement, les cellules endothéliales et les cellules des muscles lisses sous-adjacentes (exposées lors du bris des endothéliums) dans la paroi vasculaire sont stimulées à proliférer (Colvin and Smith 2005). Cette prolifération cellulaire entraîne graduellement une réduction de la lumière des vaisseaux et une éventuelle occlusion des vaisseaux ce qui crée de l'ischémie dans les tissus et la perte de la fonction de l'organe (Cai and Terasaki 2005). Cet épaissement des parois vasculaires est particulièrement présent dans la dysfonction chronique du greffon et sera décrit plus en détail dans la section sur les types de rejet.

6.6 Les macrophages

Depuis bien longtemps, les macrophages et les lymphocytes T ont été identifiés comme les cellules qui infiltraient majoritairement le greffon lors d'un rejet aigu via une réponse semblable à l'hypersensibilité de type retardé (DTH) (Wyburn, Jose et al. 2005). Bien que moins nombreuses, certaines études ont aussi montré leur implication dans le rejet chronique (Magil 2009).

Les macrophages détectés dans les greffons lors du rejet de greffe sont issus de deux sources. D'abord, les monocytes du sang sont une source importante de macrophages lors du rejet aigu (Magil 2009). Ils y sont attirés, entre autres, par la chimiokine CCL2 (anciennement MCP-1 : monocyte chemotactic peptide-1) qui voit son expression augmentée dans les greffons lors du rejet aigu (Magil 2009). D'autres protéines

chimiotactiques, telles que C5a libérée lors de l'activation du complément, peuvent aussi avoir un rôle dans l'infiltration du greffon par les macrophages (Wyburn, Jose et al. 2005; Magil 2009). D'autre part, il a été démontré que l'accumulation de macrophages peut aussi être le résultat d'une prolifération des macrophages résidents sous l'influence du facteur de croissance M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), car l'expression de ce facteur est augmentée dans le rejet de greffe de rein (Wyburn, Jose et al. 2005; Magil 2009).

Dans la greffe, l'activation des macrophages peut se faire de différentes façons selon les cytokines présentes. L'activation classique des macrophages (macrophages M1, figure 16) requiert la présence d'IFN- γ (produits par les lymphocytes Th1 et les cellules NK) et l'engagement de récepteurs tels que les TLR (toll-like receptors) qui reconnaissent des molécules relâchées lors du stress oxydatif subi par les cellules lors de la greffe (Zhang and Mosser 2008). Donc, la procédure chirurgicale en soit ainsi que l'ischémie et reperfusion (pour les organes solides) qui suit peuvent déclencher un processus inflammatoire avec l'activation de macrophages par la reconnaissance de DAMP (Wyburn, Jose et al. 2005).

Les macrophages activés de façon classique sécrètent des médiateurs tels que de l'oxyde nitrique (NO), des espèces oxygénées, des enzymes protéolytiques, des chimiokines et des cytokines (Arakelov and Lakkis 2000; Magil 2009). Tous ces facteurs participent à la réponse innée qui crée de l'inflammation. Le NO est cytotoxique à haute concentration et il a un effet vasodilatateur qui crée l'œdème caractéristique de la réaction d'hypersensibilité de type retardé (DTH) (Le Moine, Goldman et al. 2002). Toutefois, la production de NO n'est pas aussi importante par les macrophages humains en comparaison avec les macrophages murins (Neill, Wong et al. 2010). Les espèces oxygénées et les enzymes protéolytiques causent directement des dommages aux tissus (Magil 2009). Finalement, les différentes cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α et IFN- γ) sécrétées favorisent entre autres, l'activation des cellules endothéliales et immunitaires, l'expression de molécules d'adhésion et la production de plus de cytokines et de chimiokines par les cellules dans le tissu (Wyburn, Jose et al. 2005). Des études menées par Jose et al. ont montré que suite à la déplétion des macrophages dans un

modèle de greffes rénales chez le rat, il y a avait diminution de la perte de fonction de l'organe, de la production de NO et des signes histologiques du rejet et ce, sans que la réponse des lymphocytes ne soit perturbée (Jose, Ikezumi et al. 2003). Ceci démontre donc que les macrophages causent des dommages tissulaires importants lors du rejet aigu. Leur présence en grand nombre lors des premiers jours suivant la greffe est associée avec un mauvais pronostic pour l'acceptation du greffon. De plus, une infiltration importante de macrophages lors du rejet aigu a été montrée comme étant une prédiction du développement d'une dysfonction chronique du greffon (Magil 2009).

Les macrophages M1 activés peuvent aussi participer à l'immunité adaptative en sécrétant de l'IL-12 qui favorise la différenciation des lymphocytes auxiliaires vers un type Th1. Ils peuvent, dans certaines conditions, agir en tant que CPA pour activer les lymphocytes T naïfs, mais les cellules dendritiques sont les principales CPA pour l'activation des lymphocytes naïfs (Wyburn, Jose et al. 2005). Les macrophages présentent plutôt l'antigène aux lymphocytes effecteurs qui sécrètent de l'IFN- γ , ce qui renforce l'activité microbicide des macrophages (Abbas and Litchman 2009).

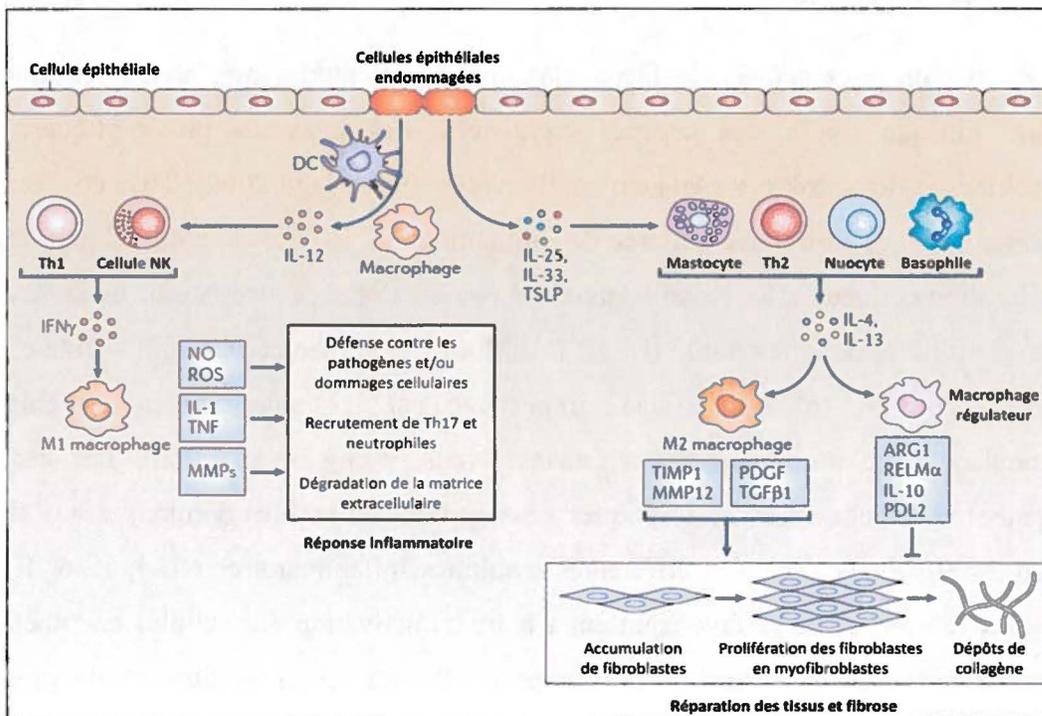


Figure 16 : Les types de macrophages et leurs rôles dans l'inflammation, la réparation des tissus et la fibrose (adaptée de (Murray and Wynn 2011)).

Les macrophages peuvent aussi avoir un phénotype plutôt anti-inflammatoire pour la réparation des tissus et éventuellement la fibrose (macrophage M2, figure 16). En effet, ces macrophages en présence d'IL-4 et/ou IL-13 ne produisent pas de NO empêchant ainsi leur fonction cytotoxique (Wyburn, Jose et al. 2005). Les macrophages M2 sécrètent différents facteurs de croissance et cytokines tels que le TGF- β (tumor growth factor), le PDGF (platelet-derived growth factor) et le FGF (fibroblast growth factor) qui stimulent la croissance des cellules épithéliales et des fibroblastes pour régénérer les tissus endommagés (Magil 2009; Murray and Wynn 2011). Cette fonction physiologique peut devenir pathologique et causer de la fibrose si elle devient incontrôlée. L'IL-13 fait augmenter la synthèse de collagène par les fibroblastes et peut donc participer au développement de la fibrose (Abbas and Litchman 2009; Murray and Wynn 2011). De plus, les macrophages M2 sécrètent des métalloprotéinases et leurs inhibiteurs qui contribuent au remodelage tissulaire (Murray and Wynn 2011). En résumé, les macrophages M2 peuvent jouer un rôle dans le développement de la dysfonction chronique du greffon qui est accompagnée de fibrose tissulaire s'ils sont mal contrôlés. Finalement, ce sont les macrophages régulateurs qui, avec leurs fonctions suppressives, peuvent mettre fin au processus de réparation tissulaire (figure 16) (Murray and Wynn 2011; Oberbarnscheidt, Zecher et al. 2011). En effet, quelques études démontrent que ces macrophages ont un rôle à jouer dans l'induction de la tolérance, entre autres en inhibant les cellules responsables de la réparation tissulaire et en limitant ainsi le développement de la fibrose par les macrophages M2 (Murray and Wynn 2011; Oberbarnscheidt, Zecher et al. 2011).

6.7 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes du sang et ils constituent généralement notre première ligne de défense lors d'infections. Dans le cadre de la transplantation, le stress cellulaire oxydatif induit par le phénomène d'ischémie et reperfusion induit la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF- α par les tissus endommagés du greffon. Ces cytokines stimulent entre autres les cellules endothéliales à produire des chimiokines telles que CXCL1, CXCL2 et CXCL8 qui

attirent les neutrophiles. Les neutrophiles sont détectés dans le greffon quelques heures après la transplantation. Les neutrophiles participent à l'inflammation en sécrétant plus de cytokines inflammatoires et produisent des lésions tissulaires en relâchant des radicaux libres oxygénés et des enzymes protéolytiques. Finalement, ils peuvent aussi causer la mort cellulaire par l'expression de FasL et par ADCC (Buonocore, Surquin et al. 2004).

Les neutrophiles peuvent aussi participer aux réponses adaptatives. En effet, par la sécrétion de chimiokines, ils attirent et activent des cellules présentatrices de l'antigène et influencent donc indirectement l'activation des lymphocytes T (Buonocore, Surquin et al. 2004). Ils peuvent aussi directement activer les lymphocytes T, car il a été démontré qu'ils sont capables de présenter des antigènes via leurs molécules du CMH (Culshaw, Millington et al. 2008; Muller, Munder et al. 2009). Selon les chimiokines et cytokines qu'ils sécrètent, ils influencent aussi le recrutement et la différenciation des lymphocytes T auxiliaires (Buonocore, Surquin et al. 2004) (figure 17).

Les neutrophiles sont souvent observés dans des biopsies de greffons rejetés suggérant ainsi qu'ils pourraient avoir un rôle dans le rejet. En effet, il a été observé que l'infiltration des neutrophiles était atténuée et que le rejet était retardé dans un modèle murin de transplantation cardiaque où les souris recevaient de l'anti-CXCL1 (Morita, Miura et al. 2001). De plus, une étude sur le rôle de l'IFN- γ dans un modèle murin de greffe de cœur en présence ou en absence d'IFN- γ , a fait ressortir la contribution des neutrophiles, car en absence d'IFN- γ , ceux-ci causent de la fibrose et accélèrent même le rejet (Miura, El-Sawy et al. 2003). Dans un modèle de greffe de peau incompatible pour les molécules du CMH de classe II, il a été observé que dans les greffons rejetés de souris receveuses déficientes en IL-4, il y avait plutôt une importante infiltration de neutrophiles par opposition à une infiltration d'éosinophiles lorsque l'IL-4 est présente (Surquin, Le Moine et al. 2005).

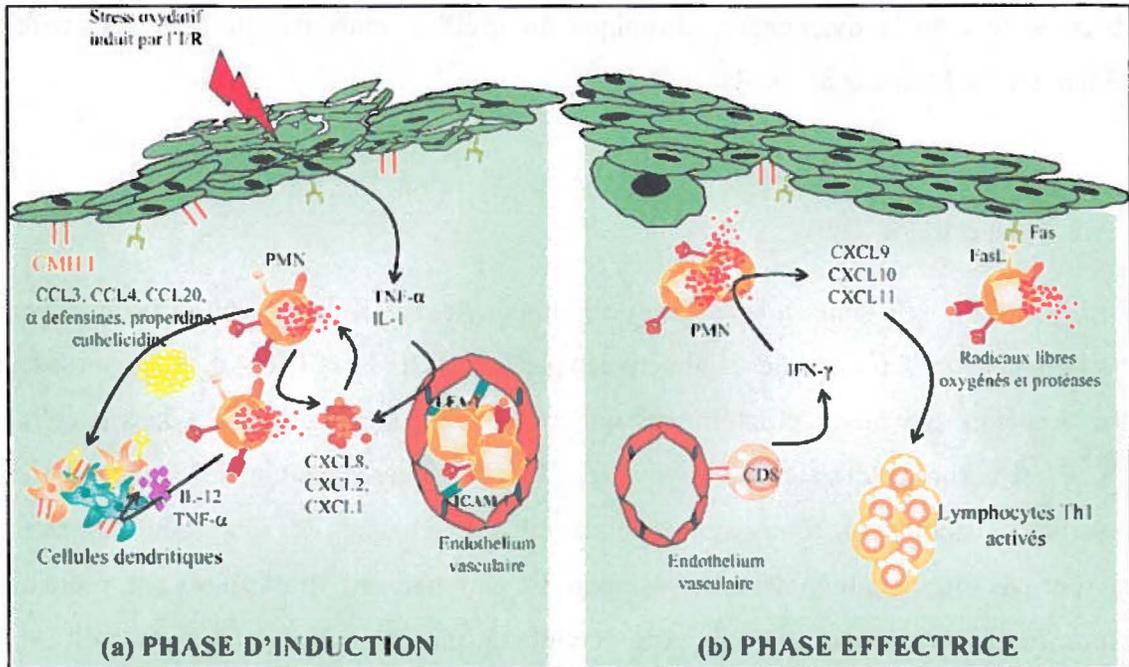


Figure 17 : Rôle des neutrophiles dans la phase d'induction (a) et la phase effectrice (b) du rejet des allogreffes (Surquin, Le Moine et al. 2005).

6.8 Les éosinophiles

Tel que mentionné précédemment, en absence de lymphocytes T CD8⁺ ou de leur action, les lymphocytes T CD4⁺ pourront se différencier en Th1 et Th2. Les lymphocytes Th2, par leur sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 vont favoriser la prolifération, le recrutement et l'activation des éosinophiles. Les éosinophiles activés sécrètent des granules qui contiennent des composés hautement toxiques tels que la protéine basique majeure (MBP), la neurotoxine dérivée des éosinophiles (EDN), la myeloperoxydase éosinophilique (Haskova, Usiu et al.) et la protéine cationique éosinophilique (ECP) qui mènent ultimement à la mort des cellules. Il a été démontré que les éosinophiles peuvent causer le rejet à eux seuls en absence des mécanismes de cytotoxicité des lymphocytes T (CD8⁺ et CD4⁺) et qu'ils nécessitent l'aide de l'IL-4 ou l'IL-5, car la neutralisation de l'IL-4 retarde le rejet et celle de l'IL-5 prévient le rejet (Le Moine, Surquin et al. 1999; Le Moine, Goldman et al. 2002). De plus, ils pourraient avoir un rôle partiel dans la dysfonction chronique du greffon, car il a été montré que l'injection d'anti-IL-5 ou l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-5 entraînait une diminution de la fibrose

observée lors de la dysfonction chronique du greffon, mais pas de la vasculopathie (Goldman, Le Moine et al. 2001)

6.9 Les cellules NK

Les cellules NK sont un sous-type de lymphocytes qui n'expriment aucun marqueur des lymphocytes T ou B. Elles sont activées par l'IL-2, IL-15 et l'IFN- α . Elles possèdent des récepteurs activateurs et inhibiteurs qui envoient des signaux opposés dans la cellule NK. C'est la somme des signaux envoyés par les ligands de la cellule cible qui détermine le sort que la cellule NK réservera à la cellule cible. Les ligands des récepteurs activateurs ne sont pas tous très bien caractérisés, mais ils comprennent entre autres des protéines exprimées lors d'infections ou de stress cellulaire, par exemple les protéines MICA et MICB. Par contre, les ligands inhibiteurs sont mieux connus. Parmi eux, on retrouve les molécules du CMH de classe I du soi (Kindt, Goldsby et al. 2008). C'est pourquoi les cellules infectées par un virus ou les cellules tumorales, qui ont tendance à diminuer leur expression de molécules du CMH de classe I pour ne pas être reconnues par les CTL, sont la cible des cellules NK. Lors d'une transplantation, comme les cellules du greffon n'expriment pas de molécules du CMH du soi, elles peuvent être reconnues par les cellules NK comme des cellules étrangères et détruites par la sécrétion de perforines et granzymes. Les cellules NK possèdent aussi des récepteurs Fc pour les anticorps donc elles peuvent tuer les cellules recouvertes d'anticorps par ADCC (Arakelov and Lakkis 2000).

Même si les cellules NK semblent avoir un effet dans le rejet, aucune étude n'a démontré que les cellules NK seules peuvent mener au rejet d'organes solides jusqu'à maintenant (Kim, Bedi et al. 2008). En effet, Kitchens et al. ont démontré que chez les souris RAG $-/-$ (déficientes en lymphocytes T et B) des greffes de peau ou de cœur ne sont pas rejetées (Kitchens, Uehara et al. 2006). Les cellules NK semblent par contre posséder un double rôle, car elles pourraient aussi favoriser la tolérance (LaRosa, Rahman et al. 2007). Une étude menée par Yu et al. a montré que les cellules NK étaient critiques pour induire la tolérance en réduisant la survie et la dissémination des CPA du donneur à travers le receveur (Yu, Xu et al. 2006). Le rôle des cellules NK reste donc à clarifier.

7. Types de rejet

Cliniquement, le rejet peut être classé en trois catégories selon la vitesse à laquelle il est induit : hyperaigu, aigu ou chronique. Bien évidemment, les mécanismes cellulaires impliqués dans chaque type de rejet sont différents d'où la raison pour laquelle les traitements immunosuppresseurs ont des effets différents sur le rejet aigu par rapport au rejet chronique. Les mécanismes d'action immunologiques impliqués dans chacun des types de rejet seront rappelés brièvement dans cette section puisqu'ils ont déjà été décrits en détail dans leur section respective.

7.1 Le rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu se produit dans les minutes ou les heures suivant le rétablissement de la circulation sanguine dans un organe vascularisé. Comme mentionné précédemment, il est dû à la présence d'anticorps préformés chez le receveur qui se lient aux antigènes incompatibles exprimés sur les endothéliums de l'organe transplanté. Ceci active la cascade du complément qui endommage les endothéliums qui relâchent à leur tour un facteur favorisant l'agrégation plaquettaire et la coagulation (figure 18a). En très peu de temps, les vaisseaux sanguins sont endommagés et bouchés par thrombose ce qui crée de l'œdème et des hémorragies dans le tissu transplanté et l'arrêt de la fonction du greffon s'en suit (Cai and Terasaki 2005). Il n'y a aucun moyen pour arrêter ce rejet une fois le processus déclenché. Par contre, ce type de rejet est plutôt rare de nos jours avec les programmes de dépistage des anticorps chez les receveurs ainsi que les greffes entre individus de groupe sanguin compatible. De plus, un test de compatibilité croisée (*crossmatch*) est effectué avant chaque greffe. Dans ce test, les lymphocytes du donneur sont mis en présence du sérum des receveurs potentiels afin de déterminer s'il y a dans le sérum des receveurs des anticorps qui réagissent contre les cellules du donneur ce qui est une contre-indication à la greffe (Benjamini, Sunshine et al. 2000; Janeway, Travers et al. 2001; Sykes, Wood et al. 2008).

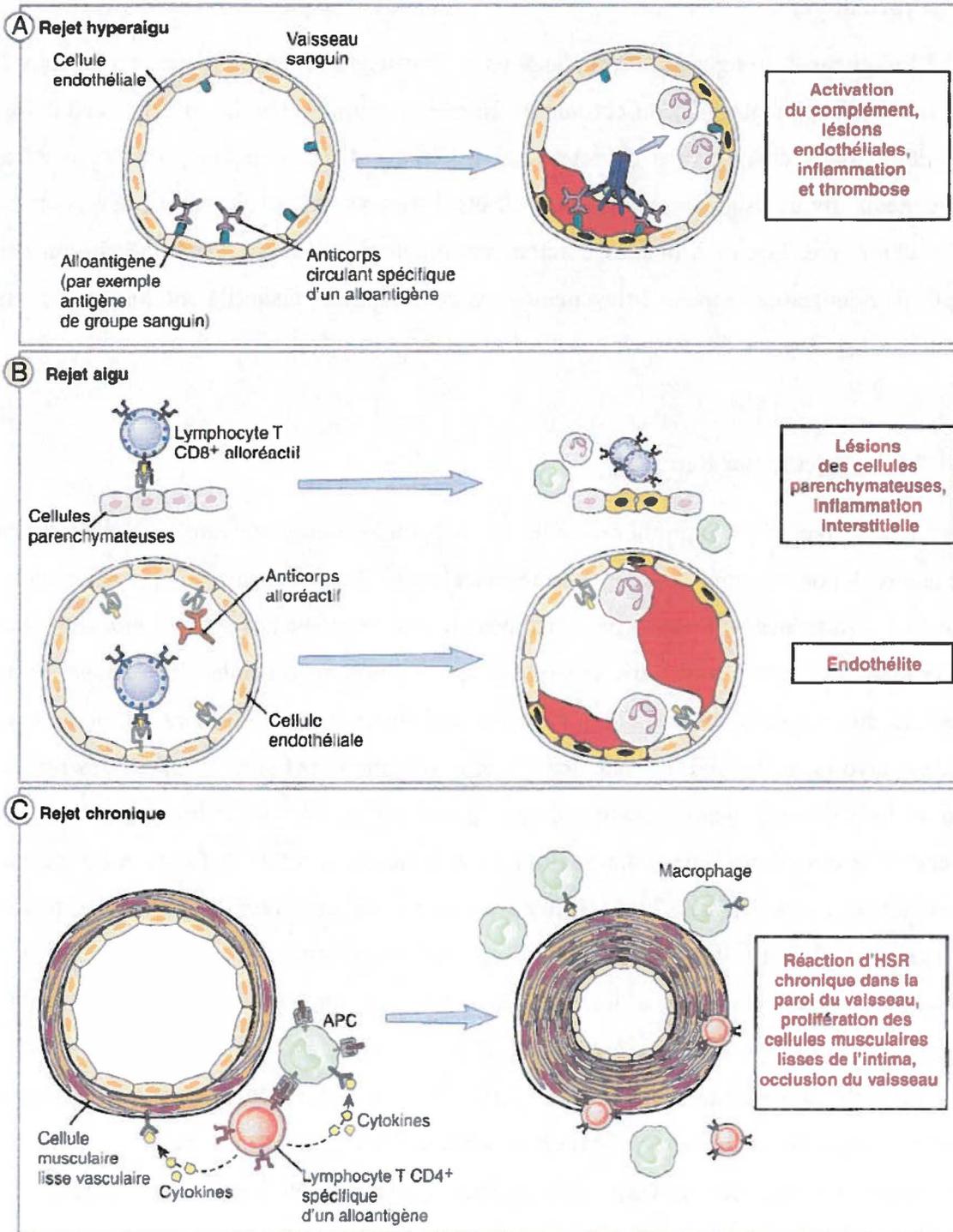


Figure 18 : Les 3 types de rejet de greffe et leurs mécanismes (modifiée de (Abbas and Litchman 2009)).

7.2 Le rejet aigu

Le rejet aigu survient de quelques jours à quelques années après la transplantation. Il est caractérisé par une infiltration de cellules mononucléées dans le greffon. Plusieurs études ont montré un rôle majeur des lymphocytes auxiliaires T CD4+ de type Th1 et des lymphocytes effecteurs T CD8+ dans ce rejet, particulièrement des lymphocytes spécifiques pour la voie directe qui s'attaquent aux cellules du parenchyme de la greffe (figure 18b). Par contre, l'arrivée des médicaments immunosuppresseurs qui ciblent surtout les lymphocytes T a permis de très bien contrôler ce type de rejet. Présentement, 80% des transplantés ont toujours une allogreffe viable 2 ans après la transplantation (Fritsche, Dragun et al. 2004).

Néanmoins, plusieurs autres types cellulaires autant au niveau du système immunitaire inné (neutrophiles, macrophages, éosinophiles, cellules NK) qu'adaptatif peuvent contribuer au rejet. De plus, il est reconnu que le rejet humoral par les anticorps contribue au rejet aigu, particulièrement en initiant une réaction cytotoxique dirigée contre les endothéliums (figure 18b). En effet, il a été observé que les anticorps peuvent mener au rejet aigu chez 6,7% des patients ayant reçu une greffe rénale via l'activation du complément et la lyse des cellules endothéliales tel que décrit dans la section 6.5 (Colvin and Smith 2005; Terasaki and Cai 2005).

7.3 Le rejet chronique et la dysfonction chronique du greffon

Le rejet chronique, causé par des mécanismes cellulaires et humoraux, se traduit par une altération progressive du greffon qui se déroule sur plusieurs mois ou plusieurs années et conduit à une perte éventuelle des fonctions du greffon. Strictement parlant, le rejet d'un organe signifie sa destruction par le système immunitaire. Comme il a été observé que des mécanismes non immunitaires participent aussi à endommager un organe à long terme, le terme « dysfonction chronique du greffon » a été retenu lorsque l'on fait référence à la perte de fonction du greffon, indépendamment de la cause (Moll and Pascual 2005). Par opposition au rejet aigu, qui est bien contrôlé par les médicaments immunosuppresseurs, la dysfonction chronique du greffon est peu influencée par ceux-ci

et très peu d'amélioration a été apportée au taux de survie des greffons à long terme. La demi-vie d'une greffe rénale est de 12 ans et celle du cœur de 10 ans (Choy 2010). La dysfonction chronique du greffon représente donc l'obstacle majeur à la survie d'une greffe.

Les caractéristiques morphologiques causées aux greffons par le système immunitaire incluent principalement deux événements. Premièrement, une artériopathie (ou vasculopathie), c'est-à-dire un épaissement de l'intima des parois vasculaires suite à la prolifération des cellules du muscle lisse qui mène à l'obstruction des vaisseaux, avec une présence de cellules mononucléées (Moll and Pascual 2005). Deuxièmement, une fibrose tissulaire suite aux remplacements des tissus détruits par les cellules immunitaires (Abbas and Litchman 2009). Dans le cas de la transplantation rénale, on parle plus spécifiquement de glomérulopathie, c'est-à-dire un dédoublement de la lame basale de la membrane glomérulaire, l'unité de filtration du rein ainsi qu'un épaissement des membranes des capillaires péri-tubulaires (Moll and Pascual 2005).

Les mécanismes exacts causant la détérioration chronique du greffon ne sont pas encore bien établis, mais des études suggèrent que les dommages causés à l'organe dès le moment de la transplantation soient à l'origine des mécanismes de destruction du greffon (Ganji and Harririan 2012). En effet, il a été observé que le système immunitaire inné, activé par les dommages subis par le greffon avant la transplantation ou par le phénomène d'ischémie et reperfusion qui survient pendant la transplantation, amorcerait la lente destruction du greffon (Kamoun 2006). Telles que décrites auparavant, les cellules endothéliales endommagées expriment des molécules d'adhésion et relâchent des cytokines (CXCL2 et CXCL8) qui attirent entre autres, des neutrophiles et macrophages. Ces derniers sécrètent à leur tour, avec les cellules endothéliales, d'autres cytokines (CCL2 et CCL5) qui attirent les lymphocytes T. Les cytokines libérées par toutes ces populations cellulaires contribuent à faire proliférer les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse de l'intima à l'origine de la vasculopathie (figure 18c) (Mitchell and Libby 2007). De plus, les lymphocytes T activés par la voie indirecte (la seule voie disponible après un certain temps) peuvent aider les lymphocytes B à produire des

anticorps qui peuvent participer au rejet (Joosten, van Kooten et al. 2003; Thaumat 2012). Les anticorps activent l'endothélium directement ou par l'activation du complément. Les fragments libérés lors de l'activation du complément et les cellules endothéliales activées, qui expriment des molécules d'adhésion et sécrètent des cytokines et chimiokines, attirent plus de cellules immunitaires et créent plus d'inflammation (Thaumat 2012). Les cellules monocytaires, lymphocytaires et les anticorps peuvent donc endommager les parois vasculaires et créer de l'inflammation, mais ils peuvent aussi infiltrer les tissus et causer des dommages au parenchyme (Mitchell and Libby 2007). Le rejet chronique est une série de dommages et de réparations des tissus de la greffe. L'accumulation de ces dommages dans le greffon va se traduire par de la fibrose graduelle et la perte à long terme de la fonction de l'organe transplanté (Shirwan 1999; Joosten, van Kooten et al. 2003).

En plus des mécanismes immunologiques, des facteurs non immunologiques prennent part dans la dysfonction de la greffe. Certains facteurs associés au donneur influencent la qualité de l'organe, comme son âge, son état de santé avant le décès, la cause du décès, la présence de certains virus comme les virus BK et le cytomégalovirus. D'autres facteurs sont plutôt reliés au receveur et à la transplantation, par exemple son état de santé (présence d'hypertension ou hyperlipidémie), la toxicité des médicaments immunosuppresseurs et le développement d'infections virales suite à l'état d'immunosuppression induit par les médicaments (Kamoun 2006).

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. The second part outlines the procedures for handling discrepancies and errors, including the steps to be taken when a mistake is identified. The third part provides a detailed breakdown of the financial data, including a summary of income and expenses. The final part concludes with a statement of the total balance and a recommendation for future actions.

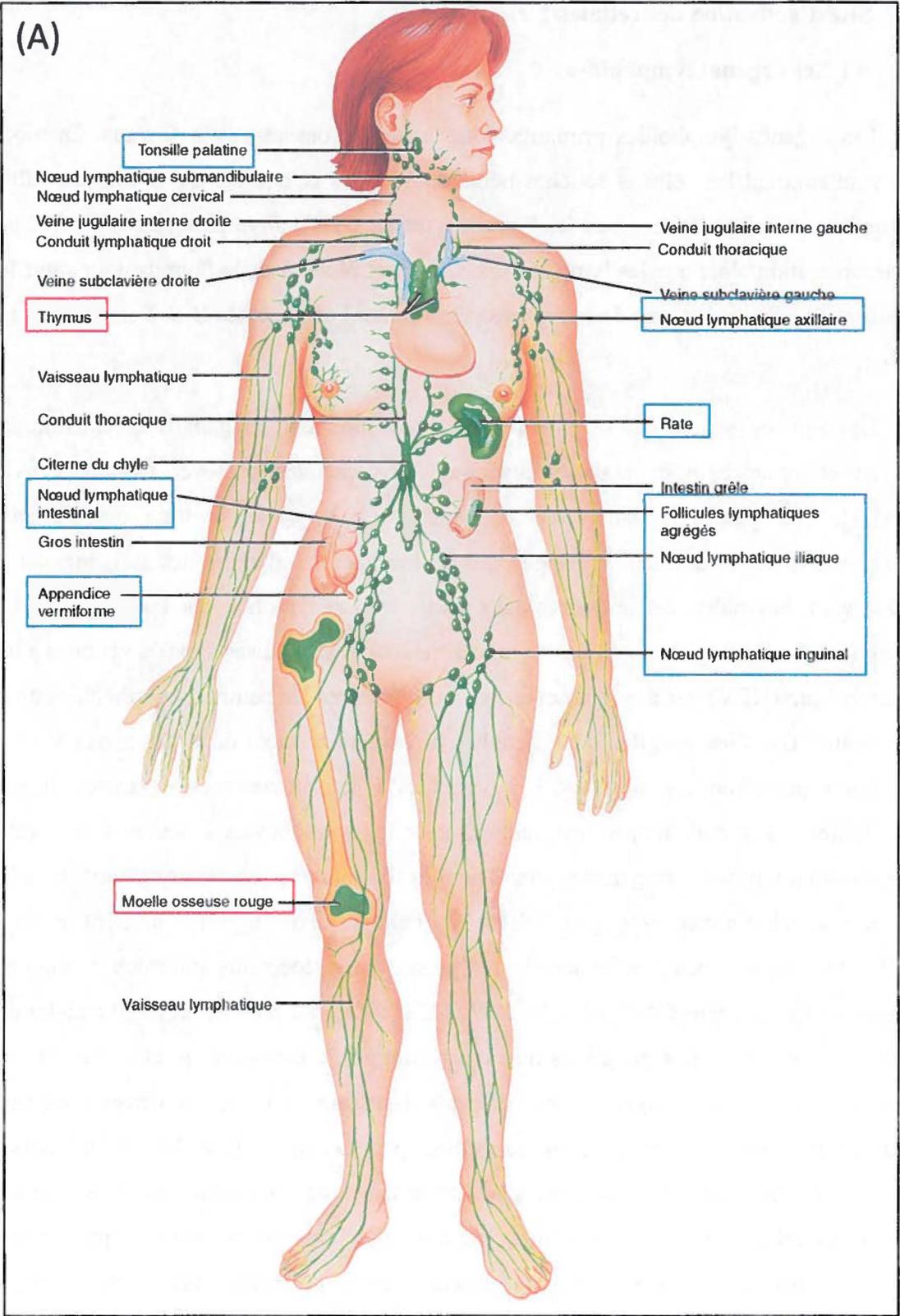
8. Site d'activation des cellules T effectrices

8.1 Les organes lymphoïdes

Les organes lymphoïdes primaires sont la moelle osseuse et le thymus. La moelle osseuse contient les cellules souches hématopoïétiques et elle génère toutes les cellules sanguines et immunitaires, dont les lymphocytes B et T. Les lymphocytes B y effectuent leur maturation alors que les lymphocytes T migrent plutôt vers le thymus pour subir leur maturation. Ensemble, ces deux organes génèrent les lymphocytes B et T matures (figure 19A).

Les organes lymphoïdes secondaires (OLS) comprennent les ganglions lymphatiques, la rate et les autres tissus associés aux muqueuses (plaques de Peyer, tonsilles, GALT, BALT). Les ganglions sont situés à travers tout le corps le long des vaisseaux lymphatiques et ils drainent la lymphe qui contient potentiellement des antigènes ou des CPA ayant internalisé des antigènes dans les tissus. Les lymphocytes T arrivent dans les ganglions par le sang et migrent à travers les vaisseaux spécialisés appelés veinules à haut endothélium (HEV) par des interactions spécifiques avec les cellules endothéliales de ces vaisseaux. Dans les ganglions, les lymphocytes se concentrent dans des zones T où les CPA leur présentent les antigènes. Les lymphocytes B sont eux aussi organisés en zones (ou follicules) B, mais ils peuvent interagir avec les lymphocytes T activés à la frontière entre les deux zones. Les lymphocytes B activés forment des centres germinatifs où a lieu la production d'anticorps (figure 19B). Les cellules dans les OLS migrent entre les différentes zones sous l'influence de l'expression de récepteurs pour les chimiokines présentes (notamment CXCL13, CXCL19 et CXCL21). La rate est un organe abdominal qui est l'équivalent des ganglions au niveau sanguin, c'est-à-dire qu'elle filtre le sang pouvant contenir des antigènes. Les différents tissus associés aux muqueuses sont situés aux portes d'entrée des micro-organismes, par exemple dans les épithéliums et muqueuses digestives, respiratoires, génitales et urinaires. Ensemble, les OLS jouent un rôle essentiel pour l'activation et la prolifération des lymphocytes naïfs en procurant un environnement propice aux interactions et à la présentation antigénique entre les CPA, les lymphocytes T et les lymphocytes B (Janeway, Travers et al. 2001; Abbas and Litchman 2009; Marieb and Hoehn 2010).

(A)



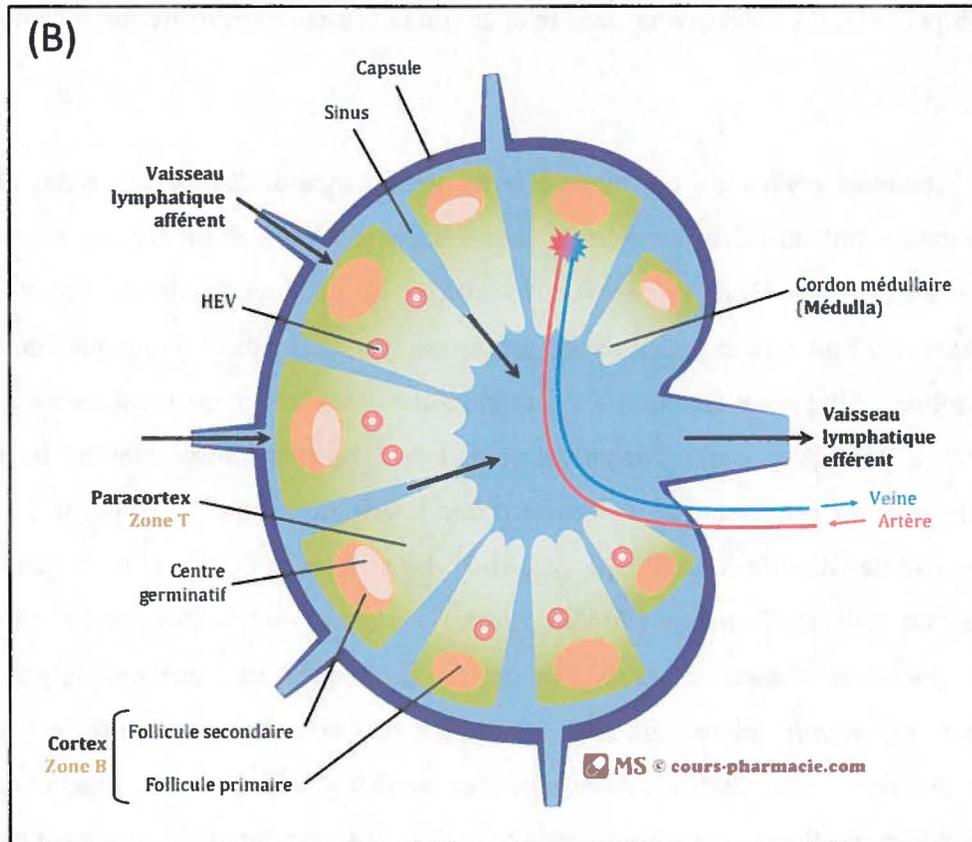


Figure 19 : (A) Les organes lymphoïdes primaires (rouge), les organes secondaires (bleu) et le réseau lymphatique (vert), (Image adaptée de (Marieb and Hoehn 2010)). (B) La structure d'un ganglion lymphatique (image modifiée de (Simon 2009)).

8.2 Les organes lymphoïdes secondaires et l'initiation des réponses alloréactives

La deuxième problématique de mon projet de doctorat concerne le site d'activation des lymphocytes T lors d'une transplantation. Il est connu que les lymphocytes T sont normalement activés dans les OLS lors de réponses immunitaires contre un pathogène (Janeway, Travers et al. 2001). Jusqu'à tout récemment, les études suggéraient que les OLS soient aussi le site d'activation pour les lymphocytes T alloréactifs, autant par la voie directe qu'indirecte. En effet, suite à la transplantation les CPA du donneur migrent vers les OLS du receveur pour activer directement les lymphocytes allospécifiques (figure 20a). Par la suite, les CPA du donneur commencent à disparaître et il reste seulement la voie de reconnaissance indirecte. Dans cette voie, les lymphocytes T allospécifiques reconnaissent des peptides dérivés des molécules du CMH du donneur qui sont amenés

aux OLS par les CPA du receveur dans le cadre de la présentation restreinte au soi (figure 20b).

Les premières études qui ont mené à la reconnaissance de l'importance des OLS en transplantation ont utilisé le modèle de souris *aly/aly*. L'idée d'utiliser ces souris pour l'étude du rôle des OLS est survenue suite à la découverte de la mutation *aly* (*alymphoblastic*) qui induit l'absence de ganglions lymphatiques et de plaques de Peyers chez la souris. Une première équipe a démontré que ces souris ne peuvent pas rejeter une allogreffe de peau (Miyawaki, Nakamura et al. 1994). Pour la transplantation, ils avaient utilisé de la peau provenant de la queue d'une souris donneuse d'haplotype H-2^d, les souris receveuses *aly/aly* étant d'haplotype H-2^b. Le groupe de Lakkis et al. a, quant à lui, démontré en utilisant le même modèle de souris *aly/aly*, que la rate ou les ganglions lymphatiques sont nécessaires au rejet de greffes cardiaques. En l'absence de ganglions, chez les souris *aly/aly* splénectomisées, les greffes sont acceptées pour plus de 160 jours (Lakkis, Arakelov et al. 2000). Ils ont aussi réalisé des greffes de peau, mais avec de la peau provenant du thorax. Une absence de rejet chez les souris *aly/aly* greffées a aussi été observée. Toutefois, une précédente étude effectuée dans les mêmes conditions expérimentales a pourtant obtenu des résultats contraires (Luo, Tanaka et al. 1999). En effet, mis à part l'haplotype différent de la peau de la souris donneuse, le modèle de souris utilisée est le même. Étrangement cette étude n'a jamais été mentionnée par la suite dans les discussions (Luo, Tanaka et al. 1999).

8.3 La contribution des OLS pour l'activation des lymphocytes T lors d'un rejet de greffe : des études contradictoires! (Tableau I)

L'étude initiale qui est venue mettre en doute la nécessité des OLS pour initier le rejet de greffe a été réalisée par Zhou et al (Zhou, Hwang et al. 2003). Ils ont utilisé le modèle de la souris déficiente pour la lymphotoxine alpha ($LT\alpha^{-/-}$) ou pour le récepteur de la lymphotoxine bêta ($LT\beta R^{-/-}$). Ces souris sont dépourvues de ganglions, de plaques de Peyer et elles ont une rate dysfonctionnelle, car la signalisation par les lymphotoxines est indispensable pour la formation des OLS. Lorsque greffées avec de la peau de queue

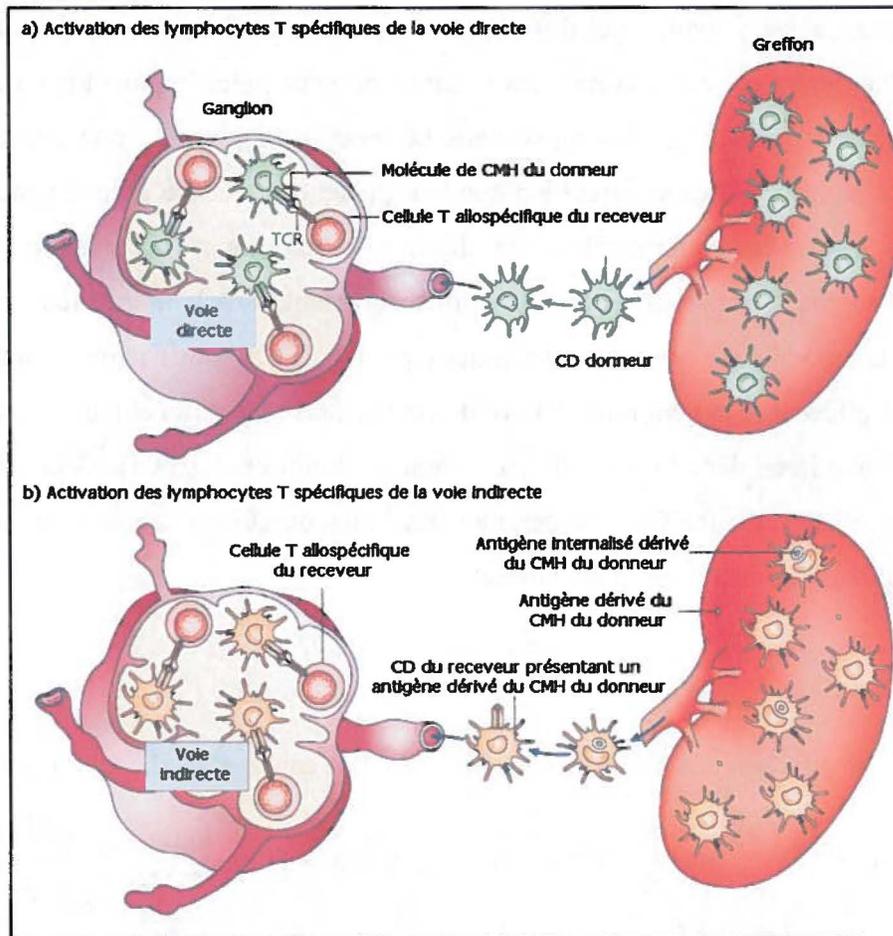


Figure 20 : Hypothèse de l'activation des lymphocytes T alloréactifs par la voie directe (a) ou indirecte (b) (modifiée de (Turka and Lechler 2009)).

de souris donneuses d'haplotype H-2^d ou H-2^k, les souris receveuses $LT\beta R^{-/-}$ (H-2^b) ont rejeté leur greffe, qu'elles soient splénectomisées ou non, quoique le rejet était un peu retardé lorsqu'elles étaient splénectomisées. Une série de greffes de cœur (H-2^d) a aussi été effectuée sur les souris receveuses $LT\alpha^{-/-}$ ou $LT\beta R^{-/-}$ splénectomisées ou non et toutes les souris pouvaient rejeter leur allogreffe, avec un certain délai dans la cinétique de rejet chez les souris splénectomisées. Par la suite, plusieurs autres études sont venues appuyer ces observations. Entre autres, deux études utilisant le modèle de la souris *aly/aly*, mais avec des paramètres différents tels qu'un donneur d'haplotype différent ou la peau du donneur d'origine différente, ont démontré un rejet en absence d'OLS (Sugito, Koshinaga et al. 2005; Yamanokuchi, Ikai et al. 2005). Plus récemment, Gelman et al. ont démontré

qu'il pouvait aussi y avoir rejet des poumons en absence d'OLS en utilisant le modèle *aly/aly*. Par contre, ils ont confirmé les résultats obtenus précédemment par Lakkis et al., à savoir que le cœur n'est pas rejeté dans ce modèle. Il semble donc que les OLS ne soient pas indispensables au rejet bien que leur présence améliore grandement les risques de rejet, car dans certains modèles, leur absence se traduit par l'acceptation de la greffe. Des études précédentes dans notre laboratoire abondent dans le même sens. En effet, en utilisant un modèle de souris transgéniques pour le TCR, nous avons montré que les cellules T effectrices étaient tout d'abord détectées dans le greffon et par la suite détectées dans les ganglions, dans la voie directe (Baratin, Bonin et al. 2004). Ceci est en accord avec l'hypothèse que les OLS ne seraient pas indispensables à l'initiation des réponses allogéniques, du moins pour la voie directe.

Tableau 1 : Résumé des études contradictoires sur la contribution des OLS lors du rejet

Étude	Receveur	Donneur	Greffe	Rejet (MST*)	Rejet avec splénectomie (MST*)
Miyawaki et al. 1994	<i>Aly/aly</i>	H-2d	Peau de queue	NON	
Luo et al. 1999	<i>Aly/aly</i>	H-2k	Peau de tronc	OUI (18.7)	
Lakkis et al. 2000	<i>Aly/aly</i>	H-2d	Peau de tronc	NON	NON
		H-2k	Coeur	OUI (23)	NON
Zhou et al. 2003	<i>LTβR^{-/-}</i>	H-2d	Peau de queue	OUI (8)	OUI (17)
		H-2k			OUI (11)
	<i>LTα^{-/-}</i>	H-2d	Coeur	OUI (11)	OUI (retard)
		H-2d	Coeur	OUI (26)	OUI (50)
Sugito et al. 2005	<i>Aly/aly</i>	H-2k	Peau d'oreille	OUI (22.2)	OUI (16.6)
Yamanokuchi et al. 2005	<i>Aly/aly</i>	H-2d	Peau de queue	OUI (19.5)	OUI (91) 60% de rejet
Gelman et al. 2009	<i>Aly/aly</i>	H-2k	Poumon		OUI (7)
			Coeur		NON

*MST (*mean survival time*): représente le temps de survie moyen de la greffe en jours lorsque connu.

8.4 Initiation de réponses immunitaires hors des OLS

Si la réponse immune n'est pas initiée dans les OLS comme suggéré antérieurement, cela implique que les lymphocytes sont activés ailleurs et plusieurs questions restent donc en suspens, entre autres, le lieu de l'activation. Les lymphocytes pourraient être activés soit dans un autre organe, soit directement dans le greffon. Peu importe l'organe, les réponses immunitaires ont normalement besoin d'un lieu bien organisé pour se développer, donc cela suggère aussi que des structures spéciales pourraient se développer pour supporter l'activation et la prolifération des cellules effectrices dans l'organe en question.

8.4.1 La moelle osseuse comme SLO

En fait, de multiples études démontrent maintenant que l'activation des cellules T peut se faire en dehors des OLS (Lund, Partida-Sanchez et al. 2002; Feuerer, Beckhove et al. 2003; Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno et al. 2004; Klein and Crispe 2006; Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno et al. 2006). Entre autres, la moelle osseuse a été démontrée par plusieurs comme pouvant jouer le rôle d'organe lymphoïde secondaire (Tripp, Topham et al. 1997; Feuerer, Beckhove et al. 2003; Clay, Rodrigues et al. 2004; Di Rosa and Pabst 2005). Par exemple, en utilisant des souris *aly/aly* splénectomisées reconstituées avec des cellules T transgéniques pour le TCR (OT-I or OT-II), Feuerer et al. ont démontré la migration de cellules T naïves dans la moelle osseuse, la formation de complexes multicellulaires entre les cellules T et des CD, l'expression du marqueur d'activation précoce CD69 sur les cellules T et l'expansion clonale des cellules T suite à la stimulation avec le peptide OVA (Feuerer, Beckhove et al. 2003). Bien que la moelle osseuse ne contient pas de compartiments B et T comme les ganglions, elle semble capable de supporter la rencontre entre les CD et les lymphocytes T afin de mener à leur activation. Elle peut donc être un site potentiel d'activation en absence d'OLS tel que dans le modèle de greffe de peau utilisé au laboratoire. Les lymphocytes T peuvent d'ailleurs recirculer quotidiennement entre le sang et la moelle osseuse (figure 21).

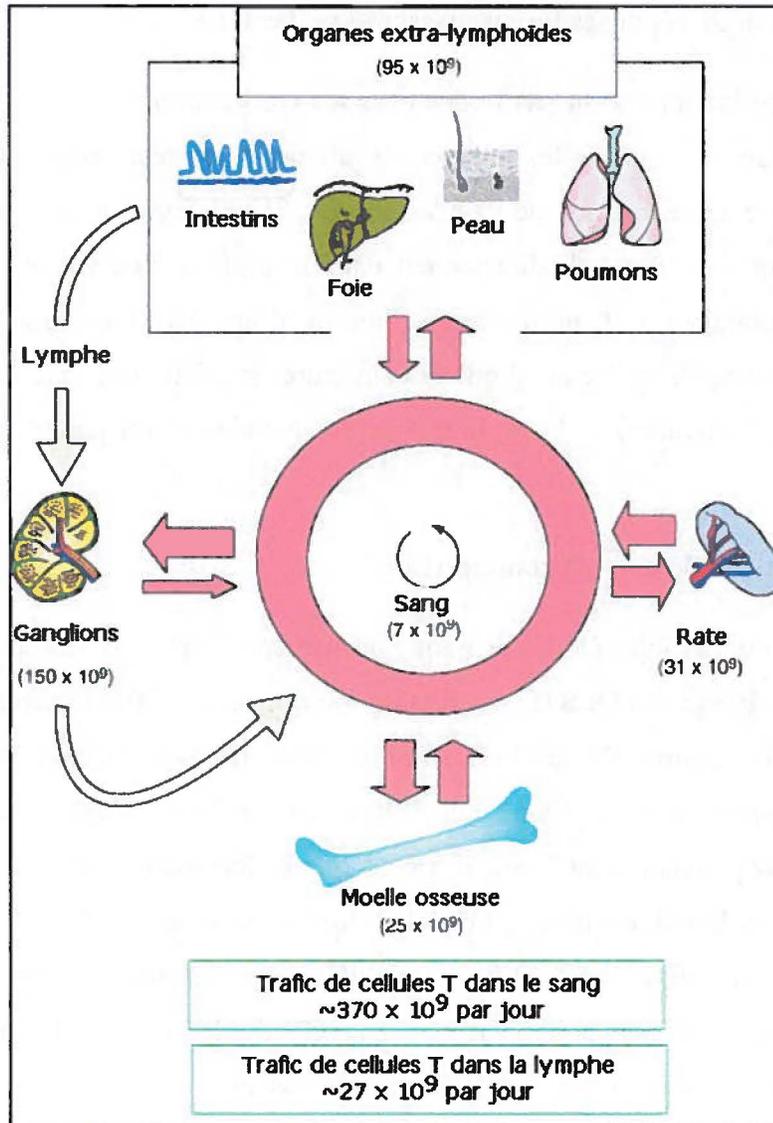


Figure 21 : Circulation des lymphocytes T dans le sang et à travers les organes (modifiée de (Di Rosa and Pabst 2005)).

8.4.2 Le greffon comme site d'activation

Afin de servir de site d'activation potentiel, le greffon devrait posséder deux caractéristiques. Tout d'abord, il doit exprimer des alloantigènes ce qui n'est pas un problème puisque que toutes les cellules expriment des molécules du CMH de classe I et les CPA expriment des molécules du CMH de classe II à leur surface. Ensuite, pour activer les lymphocytes T, il faut que les cellules qui expriment les molécules du CMH

expriment aussi des molécules de costimulation. Dans le cadre d'une transplantation, les CPA et les cellules endothéliales peuvent exprimer des molécules de costimulation suite à leur activation par la réponse inflammatoire déclenchée par la procédure chirurgicale.

Dans la voie directe, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du greffon seraient d'excellentes candidates, car elles sont les premières cellules rencontrées par les lymphocytes T du receveur suite à la greffe, elles expriment des molécules du CMH de classe I et II et certaines molécules de costimulation suite à leur activation. D'ailleurs, Kreisel et al. ont démontré que les cellules endothéliales peuvent directement activer des cellules T CD8+ ce qui entraîne le rejet de greffes cardiaques dans un modèle murin (Kreisel, Krupnick et al. 2002). Par contre, ils ont aussi démontré que les cellules endothéliales ne sont pas efficaces pour activer les lymphocytes T CD4+ naïfs même si elles semblent posséder tout le nécessaire. Néanmoins, d'autres études ont montré que les cellules endothéliales peuvent à tout le moins jouer un rôle dans le recrutement et l'entrée des lymphocytes T dans les tissus (Kapessidou, Habran et al. 2006).

Une autre source éventuelle de CPA serait les cellules d'origine épithéliale. En effet, il a été démontré, dans un modèle d'inflammation chronique de la peau, que les kératinocytes résidants peuvent activer et être la cible des lymphocytes T CD4+ autoréactifs (Fan, Busser et al. 2003). Donc, lors de conditions d'inflammation chronique, les kératinocytes peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes et activer des lymphocytes T qui sont normalement restreints à circuler entre le sang et les OLS. Ceci pourrait être transposé dans un modèle de greffe de peau, car au moment de la greffe, la procédure chirurgicale induit des dommages qui créent un certain niveau d'inflammation.

Au niveau de la voie indirecte, il a été montré que les cellules endothéliales du receveur qui viennent en partie remplacer celles du donneur dans les vaisseaux de la greffe, peuvent être à l'origine de l'activation des lymphocytes T CD4+ (Kapessidou, Habran et al. 2006). En effet, les lymphocytes T de la voie indirecte sont restreints par le soi et sont donc capables de reconnaître des peptides étrangers présentés par une CPA du soi. On sait maintenant que les cellules endothéliales des vaisseaux dans la greffe de peau du donneur sont majoritairement remplacées suite à la transplantation de la façon suivante (Capla, Ceradini et al. 2006). Tout d'abord, au moment de la greffe, les vaisseaux du

receveur et ceux du donneur sont séparés, il n'y a aucune circulation dans la greffe (figure 22a). Dès le 3^e jour, la vascularisation par les cellules endothéliales du receveur commence à être détectée dans le greffon et le nombre de cellules endothéliales du donneur commence à diminuer, et ça, de la périphérie de la greffe vers le centre. Entre la 1^e et 2^e semaine, il y a une intense croissance des vaisseaux sanguins provenant du donneur, une régression de ceux du donneur et de nombreuses anastomoses sont observées (figure 22b). Vers la 3^e semaine, la revascularisation s'achève. Il reste éventuellement une petite partie des vaisseaux du donneur au centre de la greffe (figure 22c). Il est donc logique de croire que les lymphocytes T dans la voie indirecte vont être activés plus tardivement dans le greffon, car ils doivent attendre quelques jours avant que des cellules endothéliales du receveur soient présentes et puissent les activer.

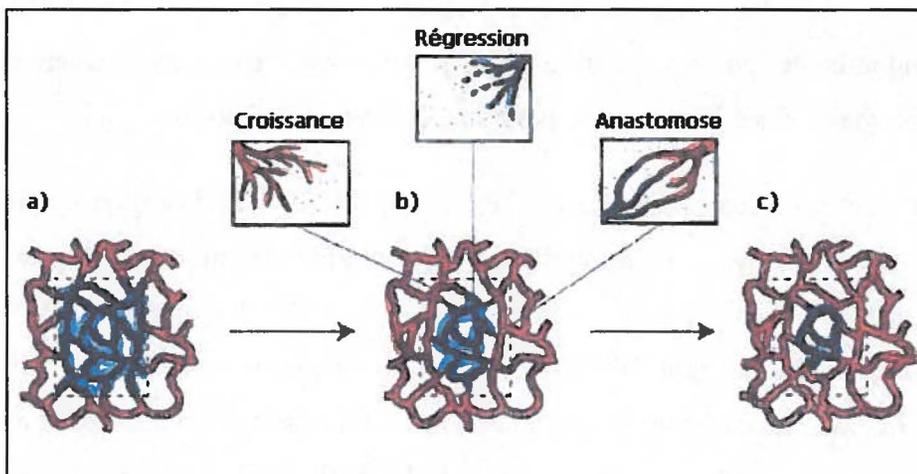


Figure 21: Revascularisation d'une greffe de peau avec les vaisseaux sanguins du receveur en rouge et ceux du donneur en bleu (modifiée de (Capla, Ceradini et al. 2006)).

À ces deux possibilités s'ajoute aussi l'hypothèse de la formation de structures lymphoïdes au sein même de la greffe pour supporter l'activation cellulaire. En effet, la néogenèse de structures lymphoïdes a été observée dans le cadre de plusieurs maladies auto-immunes, maladies inflammatoires ou lors de rejets chroniques (Baddoura, Nasr et al. 2005; Aloisi and Pujol-Borrell 2006; Pabst 2007). Plus particulièrement, une lymphangiogenèse et une formation de structures lymphoïdes ectopiques ont été observées dans des biopsies de patients greffés rénaux ou cardiaques (Jonigk, Lehmann et al. 2007; Stuht, Gwinner et al. 2007; Soong, Pathak et al. 2010). Ces formations

lymphoïdes, aussi appelées organes lymphoïdes tertiaires (Motallebzadeh, Bolton et al. 2008), sont des structures similaires aux OLS. En effet, elles contiennent des zones de follicules B avec des centres germinatifs, des zones de lymphocytes T avec des CD et des veinules à haut endothélium (HEV). Toutefois elles sont un peu différentes, car elles ne sont pas encapsulées et elles permettent ainsi une entrée rapide des lymphocytes T et des cytokines (Aloisi and Pujol-Borrell 2006; Motallebzadeh, Bolton et al. 2008). L'induction des OLT dans la peau a été rapportée et des études récentes ont démontré que les OLT peuvent générer des lymphocytes T effecteurs qui conduisent au rejet de greffe de peau (Cupedo, Jansen et al. 2004; Nasr, Reel et al. 2007).

8.5 La formation des organes lymphoïdes tertiaires

Un des événements clés dans l'induction de tissus lymphoïdes ectopiques est la voie de signalisation enclenchée par la liaison de la molécule lymphotoxine- β à son récepteur (le récepteur de la lymphotoxine- β ou LT β R), une voie de signalisation aussi utilisée lors de la formation des organes lymphoïdes durant l'embryogenèse. (Cupedo, Jansen et al. 2004; Drayton, Liao et al. 2006). Lors de la formation des OLS pendant l'embryogenèse, les cellules inductrices LT sont les premières à exprimer la lymphotoxine- β et déclencher la cascade de signalisation. Par contre, lors de la genèse d'organes lymphoïdes ectopiques chez l'adulte, il semblerait que ces cellules ne soient pas indispensables et les lymphocytes T et B activés, qui expriment aussi la lymphotoxine- β , pourraient déclencher la cascade de signalisation par le récepteur de la lymphotoxine- β exprimé par les cellules stromales (figure 23a) (Carragher, Rangel-Moreno et al. 2008).

Cette signalisation induit ensuite deux événements principaux. Premièrement, cela induit la production de chimiokines telles que CCL19, CCL21 et CXCL13 qui sont responsables de la migration et de la compartimentalisation des cellules lymphoïdes dans les organes lymphoïdes (figure 23b) (Mebius 2003). Les chimiokines CCL19 et CCL21 sont responsables de la migration des CD et des lymphocytes T qui expriment le récepteur CCR7. La chimiokine CXCL13, quant à elle, est responsable de la migration des

lymphocytes B et de leur compartimentalisation en zones de cellules B via l'expression du récepteur CXCR5.

Deuxièmement, la signalisation par le récepteur de la lymphotoxine- β induit l'expression de veinules à haut endothélium (HEV) et de molécules d'adhésion à leur surface (figure 23c). Ces vaisseaux spécialisés sont normalement retrouvés dans les ganglions lymphatiques et autres tissus lymphoïdes et ils permettent l'entrée des lymphocytes T qui arrivent par le sang. Une des molécules d'adhésion exprimée par les HEV suite à la signalisation est l'adressine des ganglions (PNAd). Ces adressines se retrouvent spécifiquement exprimées par les HEV des ganglions, mais on les retrouve aussi dans les tissus lymphoïdes ectopiques (Bistrup, Tsay et al. 2004). Elles sont normalement reconnues par le CD62L exprimé par les lymphocytes T naïfs favorisant ainsi leur migration aux ganglions. Leur présence dans une greffe laisserait présager la présence de HEV et donc de tissus lymphoïdes ectopiques. Un autre indice indirect de la présence de HEV dans la greffe serait la présence de l'enzyme N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransférase-2 (GlcNAc6ST-2), car cette enzyme est spécifiquement exprimée dans les cellules des HEV où elle participe à la synthèse des adressines (Uchimura and Rosen 2006). Avec l'expression de ces chimiokines et des molécules d'adhésion qui attirent et permettent l'arrivée des lymphocytes, la table est mise pour recréer un environnement lymphoïde pouvant aider à supporter l'activation des lymphocytes T au sein même d'un greffon.

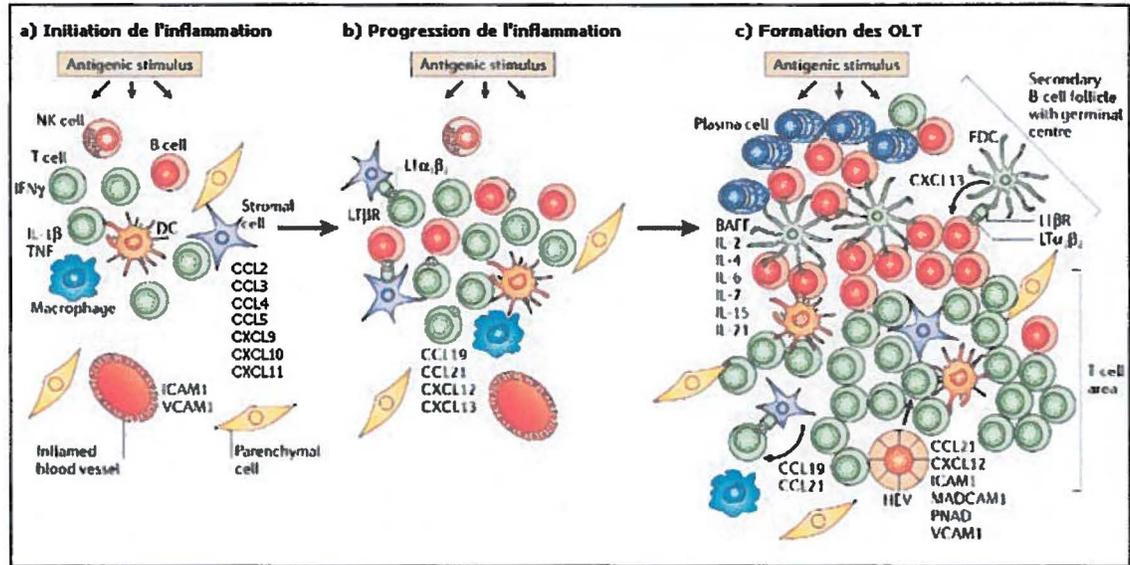


Figure 22: Les étapes de la formation d'organes lymphoïdes tertiaires dans le cadre d'une inflammation chronique, processus qui serait semblable pour la formation des OLT dans le cadre d'un rejet de greffe (adaptée de (Aloisi and Pujol-Borrell 2006)).



Figure 1. A grid of points showing the distribution of data points across the study area. The points are arranged in a regular pattern, indicating a systematic sampling or measurement process.

9. Les objectifs de mon projet de thèse

Tel que mentionné au cours de l'introduction, mon projet de thèse a voulu répondre à deux questions qui étaient sujettes à controverse dans le domaine de la transplantation.

9.1 Quels types de lymphocytes T auxiliaires (Th1 ou Th2) induisent le rejet?

Tout d'abord, on sait que les lymphocytes Th1 sont capables d'induire le rejet. Par contre, il existe des études contradictoires quant à savoir si les lymphocytes Th2 sont aussi capables d'induire le rejet ou si elles semblent plutôt favoriser l'induction d'une tolérance. Pour ce faire, j'ai réalisé des études *in vivo* avec le modèle murin de greffe de peau du laboratoire (décrit plus bas) dans lequel des populations de lymphocytes Th1 ou Th2 étaient transférées. Les propriétés de notre modèle m'ont aussi permis d'étudier la contribution de ces deux populations de lymphocytes T auxiliaires séparément dans chacune des deux voies d'alloréactivité, ce qui n'avait jamais été fait auparavant. Les résultats de ces études sont détaillés dans le chapitre II, section article I : Skin graft rejection in both direct and indirect pathways induced by Th2 cells.

9.2 Quel est le site d'activation des lymphocytes T lors du rejet de greffe?

La deuxième partie de mon projet de doctorat voulait apporter sa part d'information sur un sujet assez débattu, c'est-à-dire la contribution des organes lymphoïdes secondaires pour mener au rejet de greffe. Pour ce faire, j'ai réalisé des études *in vivo* avec le modèle murin de greffe de peau du laboratoire modifié pour l'absence d'organes lymphoïdes secondaires (décrit plus bas) afin de nous éclairer sur la question. Les propriétés de notre modèle m'ont permis d'étudier si la présence des OLS est nécessaire ou non dans chacune des voies d'alloréactivité individuellement. Cette particularité du modèle revêt une importance particulière, car les études du laboratoire nous portaient à croire que le site d'activation dans chaque des deux voies pourrait être différent. Les résultats de ces études sont détaillés dans le chapitre II, section article II: Formation of Lymphoid Structures in Skin Allografts Following Direct or Indirect Pathways Alloreactivity.

Enfin, bien que nous ayons un portrait général des phénomènes impliqués dans le rejet, les mécanismes précis par lesquels les lymphocytes T CD4+ opèrent et leur contribution exacte dans chacune des voies d'alloréactivité ne sont pas clairement définis (Benichou 1999). Ceci est principalement dû à un manque de modèles expérimentaux adéquats permettant d'étudier à la fois les deux voies d'alloréactivité tout en considérant chaque voie séparément (Bradley 1996; Sayegh and Carpenter 1996; Benichou, Valujskikh et al. 1999). Je me suis donc brièvement attardée à caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans le rejet de greffe dans chacune des voies. Ces résultats sont détaillés dans le chapitre II, section résultats complémentaires.

10. Le modèle murin de greffe de peau

10.1 La double spécificité du lymphocyte T 2.102

Notre laboratoire a développé un modèle murin de rejet greffe de peau unique nous permettant d'étudier à la fois la voie directe et indirecte à l'aide d'un même clonotype de cellules T, le clone de cellule T CD4+ 2.102 (Grakoui, Donermeyer et al. 1999; Sauve, Baratin et al. 2004). En effet, le clone 2.102 reconnaît la molécule du CMH murin de classe II I-E^p par la voie directe (figure 24a) (Daniel, Grakoui et al. 1998). De plus, il reconnaît par la voie indirecte, le peptide allogénique Hb(64-76) présenté par la molécule du CMH murin de classe II I-E^k (figure 24b) (Lorenz and Allen 1988).

10.2 Les souris 2.102Tg

Afin de tirer profit de la double spécificité du clone 2.102 *in vivo*, les souris 2.102Tg ont été générées par l'équipe du Dr. Paul Allen. Les souris ont été générées en introduisant l'ADNc des chaînes α et β du TCR 2.102 dans des embryons de souris C57BL/6. Les souris sélectionnées ont ensuite été croisées avec des souris B6.AKR pour introduire le fond génétique H-2K auquel le TCR est restreint. Initialement, les souris étaient maintenues sur un fond RAG-1^{-/-}. Au laboratoire, elles ont été maintenues sur un fond génétique RAG-1^{+/+}.

10.3 La construction mHEL-Hb

La construction mHEL-Hb est une protéine de fusion constituée du peptide de l'hémoglobine (acides amines 64 à 76) à l'intérieur de la protéine du lysozyme d'œufs de poule (HEL). On peut considérer que cette protéine de fusion est exprimée comme une molécule du CMH de classe II, car elle a été mise sous le contrôle du promoteur de la chaîne alpha de la molécule I-E du CMH de classe II afin de réguler son expression. De plus, elle est exprimée à la surface de la cellule, car la portion membranaire du CMH de classe I L^d lui a été ajoutée (figure 25). Lors d'une greffe avec de la peau de souris transgénique pour cette construction, cette protéine peut être reconnue comme un antigène mineur d'histocompatibilité et le peptide Hb peut être apprêté et présentée par les CPA du soi exprimant la molécule du CMH murin de classe II I-E^k.

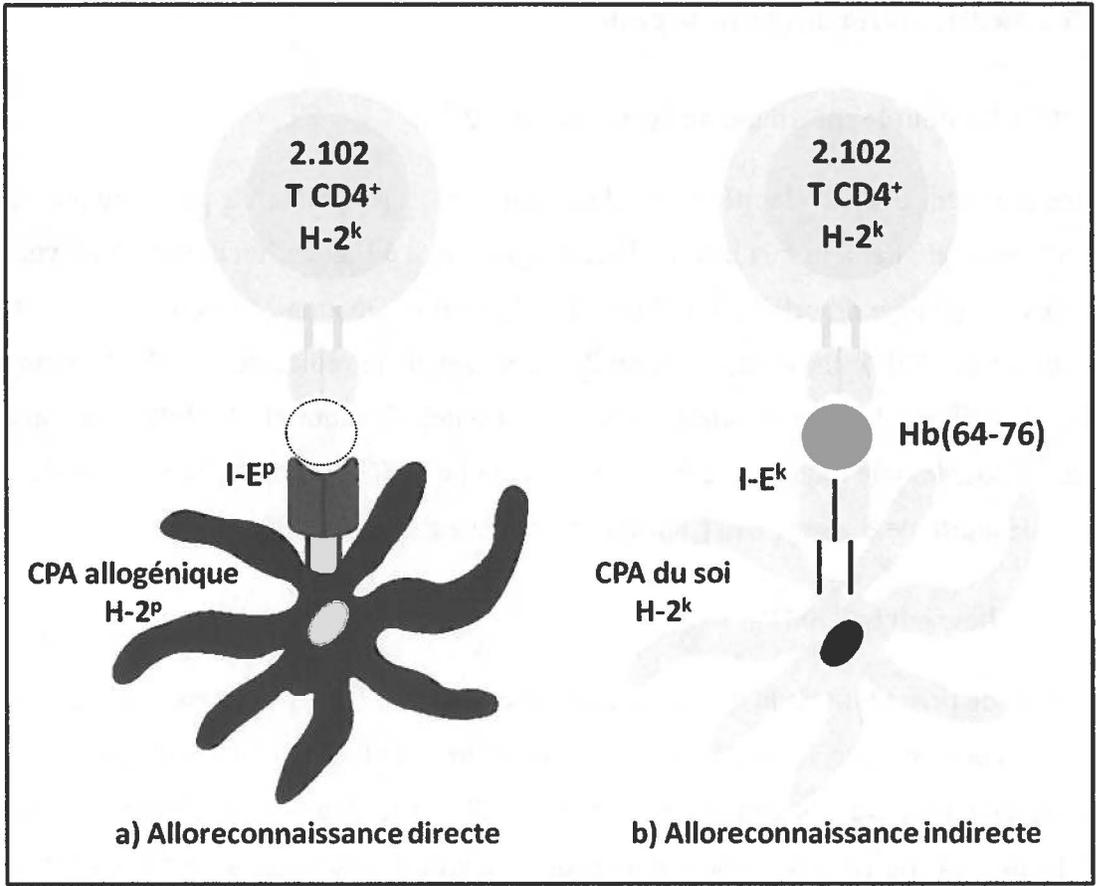


Figure 23 : La double spécificité du lymphocyte T 2.102 (adaptée de (Sauve, Baratin et al. 2004)).

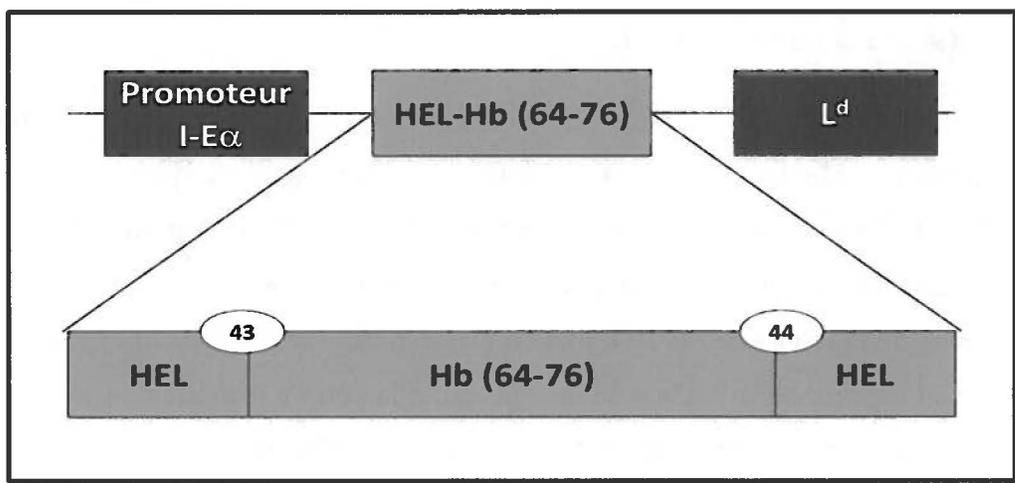


Figure 24: La construction de la protéine de fusion membranaire mHEL-Hb

10.4 Le modèle murin de greffe de peau

La double réactivité du clone de cellule T 2.102, à travers l'utilisation des souris 2.102Tg, a été utilisée pour élaborer notre modèle de rejet de greffe de peau. En effet, les cellules T CD4⁺ peuvent être isolées de souris 2.102Tg (Grakoui, Donermeyer et al. 1999). Ces cellules peuvent être différenciées *in vitro* en lymphocytes auxiliaires Th1 ou Th2 au besoin. Elles peuvent servir pour reconstituer nos souris receveuses déficientes en lymphocytes T $\alpha\beta$ (TCR α KOK) (Mombaerts, Clarke et al. 1992) ou doubles déficientes en lymphocytes T $\alpha\beta$ et en récepteurs de la lymphotoxine- β (TCR α KOK LT β R^{-/-}).

Pour étudier la voie directe, les souris receveuses sont greffées avec la peau de souris congéniques B10.P qui expriment la molécule du CMH de classe II I-E^P (figure 26). Dans ce modèle, les CPA de la greffe exprimant des molécules I-E^P peuvent activer directement les lymphocytes T 2.102 de la souris receveuse. Pour étudier la voie indirecte, les souris receveuses sont greffées avec de la peau de souris transgéniques B6(mHEL-Hb). Ces souris expriment le peptide de l'hémoglobine (acides amines 64 à 76) à l'intérieur de la protéine membranaire du lysozyme d'œufs de poule (HEL) tel que décrit auparavant. Cette construction peut être reconnue, apprêtée et présentée par les CPA du soi aux lymphocytes T 2.102 de la souris receveuse. Des études préalables dans le laboratoire ont démontré que les deux voies d'alloreconnaissance étaient exclusives, c'est-à-dire que les lymphocytes T reconnaissent I-E^P que par une présentation directe et ils reconnaissent le peptide Hb que par une alloreconnaissance indirecte (Sauve, Baratin et al. 2004). De plus, les lymphocytes T 2.102 ne reconnaissent aucun autre haplotype. Finalement, les souris B6.AKR de même haplotype que les souris receveuses sont utilisées comme témoins isogéniques.

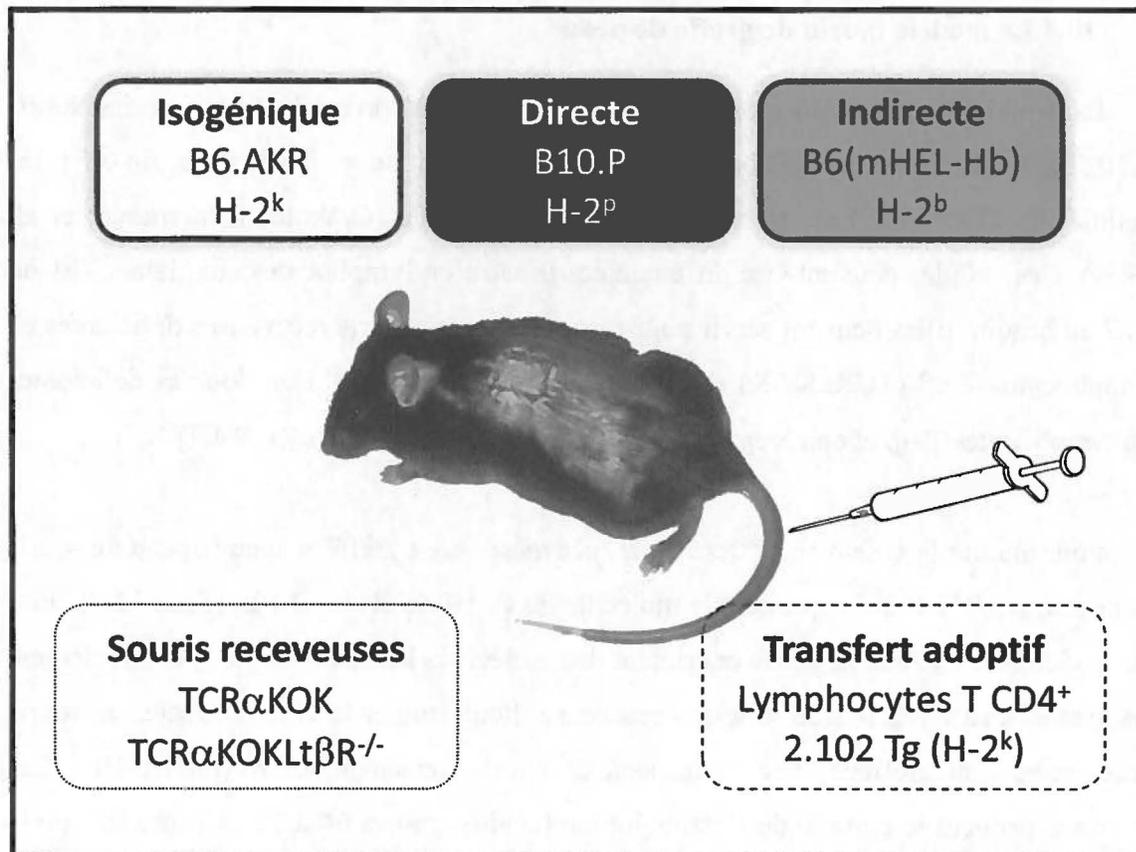


Figure 25: Modèle murin de greffe de peau du laboratoire utilisant les propriétés du clone T 2.102 (adaptée de (Sauve, Baratin et al. 2004)).

CHAPITRE II :
LES RÉSULTATS

ARTICLE I

Skin graft rejection in both direct and indirect pathways induced by Th2 cells

Caroline Leduc and Claude Daniel

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada

Keywords: Transplantation, alloreactivity, Th1, Th2, skin graft

Word count: abstract 237, text 3000

Tables and figures: total figures: 4

Address for correspondence: Dr. Claude Daniel, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. E-mail: claude.daniel@iaf.inrs.ca

Footnotes

C.L. collected data, analyzed data, and wrote the manuscript; C.D. participated in data analysis, interpretation, critical review, manuscript draft, intellectual content; and approval of final draft.

This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research grant (MOP-66856) to C.D. and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds de la recherche en santé du Québec studentships to C.L.

Abbreviations

APC antigen-presenting cell
CTL cytotoxic T lymphocyte
DC dendritic cell
Hb hemoglobin
IFN interferon
IL interleukin
KO knock-out
MHC major histocompatibility complex
mHEL transmembrane hen egg lysozyme
NK natural killer
qRT-PCR quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction
SCID severe combined immunodeficiency
TCR T cell receptor
Th T helper cells
Tg transgenic
TNF tumor necrosis factor

Abstract

Background: Our laboratory has previously shown the absolute requirement of the indirect pathway of rejection for IgG alloantibody production. Indeed, alloantigen-specific IgG antibodies production was shown in mice after rejection by indirect or combined (direct + indirect) pathways. The lack of IgG production in the direct pathway was not consequent to improper T helper cells differentiation, as transgenic CD4⁺ cells activated by direct or indirect pathway showed similar Th1/Th2 ratios. The aim of our study was thus to directly evaluate the contribution of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in allograft rejection and alloantibody production, in relation to their specificity for the direct or indirect alloreactivity pathway.

Methods: Th1 or Th2 cells collected from spleen of 2.102 TCR transgenic mice were differentiated *in vitro* and adoptively transferred in TCRaKOK mice. Skin grafts were performed. Graft rejection was established and antibody production was evaluated.

Results: We show here that both Th1 and Th2 cells can lead to skin graft rejection in both pathways of transplantation although there is a delay in rejection in the indirect pathway of mice reconstituted with Th2 cells. Th1/Th2 helper cell secretion profiles were confirmed until 21 days post transplantation. Th1 reconstituted mice produced a specific IgG2a isotype response consistent with the Th1 cell population. Th2 reconstituted mice produced a mixed isotype responses.

Conclusion: *In vitro* differentiated Th2 cells are as deleterious as Th1 cells to initiate skin graft rejection in a mouse model.

Introduction

CD4⁺ T cells can mediate graft rejection once activated by three alloreactive pathways: direct, indirect and semi-direct (Lechler, Lombardi et al. 1990; Herrera, Golshayan et al. 2004). In the direct pathway, CD4⁺ T cells recognize allogeneic MHC molecules on donor APCs whereas in the indirect pathway, they recognize allogeneic peptides presented by MHC molecules of self-APCs. In the semi-direct pathway, T cells recognize intact donor MHC-peptide complexes transferred from donor to recipient APCs (Gokmen, Lombardi et al. 2008). Although this concept is recognized since decades, CD4⁺ T cells contribution in the direct and indirect alloreactivity pathways still remains unclear, especially when regarding the individual role of T helper cell population.

Indeed, after antigenic stimulation CD4⁺ T cells can be divided into different T helper groups according to their cytokine secretion pattern. IFN- γ is the principal signature cytokine associated with Th1 cells which are responsible for cell mediated responses while IL-4 is the principal cytokine secreted by Th2 cells which are mainly involved in humoral responses (Mosmann, Schumacher et al. 1991). Recently a third T helper group has been discovered: the Th17 cells which secrete IL-17 but they were not investigated in our study (Wynn 2005). It has been suggested that Th1 cells are the principal effector of acute graft rejection (Piccotti, Chan et al. 1997) (Lakkis 1998). By opposition, Th2 cells would favour graft tolerance by antagonizing Th1 responses via IL-4 production (Onodera, Hancock et al. 1997) (Chen, Gao et al. 1996) (Shirwan, Barwari et al. 1998). Many studies have shown that Th2 cells could prolong graft survival (Maeda, Takata et al. 1994) (Takeuchi, Lowry et al. 1992). By cons, more recent studies now demonstrate

that in some cases, Th2 cells can lead to graft rejection (VanBuskirk, Wakely et al. 1996; Zelenika, Adams et al. 1998; Csencsits, Wood et al. 2005).

Studies in our laboratory have showed that following skin graft rejection, transgenic CD4⁺ T cells activated by direct or indirect pathway showed similar Th1/Th2 ratios, suggesting no particular implication for a specific T helper population in rejection (Sauve, Baratin et al. 2004). The aim of our study was thus to directly evaluate the contribution of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in allograft rejection and alloantibody production, in relation to their specificity for the direct or indirect alloreactivity pathway. We used the TCR α KOK mice model where recipient mice do not have $\alpha\beta$ T lymphocyte thus allowing us to study both pathways independently when using our previously described skin graft model with adoptive transfer of TCR transgenic 2.102 CD4⁺ T cells differentiated in Th1 or Th2 (Sauve, Baratin et al. 2004). We demonstrate here that mice reconstituted with Th1 or Th2 can lead to skin graft rejection in both pathways. Rejection was associated with a respective Th1 or Th2 cytokine secretion pattern in draining lymph nodes. Finally, Th1 help induced an IgG2a antibody production whereas all IgG isotypes were produced with a Th2 help, in indirect pathway. These results demonstrate for the first time that both alloreactive pathways can independently lead to skin graft rejection with either Th1 or Th2 cells using the same mouse model.

Results

Both Th1 and Th2 cells can lead to skin graft rejection

In order to evaluate the contribution of Th1 and Th2 cells in the direct and indirect pathways of rejection, we took advantage of our model of skin graft rejection that allows us to study each pathway individually using a single CD4⁺ T cell clone. Indeed, the 2.102 T cell clone that recognize the mouse MHC class II I-E^p molecule by the direct pathway and the mouse hemoglobin peptide (a.a. 64-76) presented by MHC class II I-E^k molecule on self-APC by the indirect pathway was used (Daniel, Horvath et al. 1998; Grakoui, Donermeyer et al. 1999). These 2.102 CD4⁺ T cells were obtained by purification from spleen of 2.102 TCR transgenic mice and differentiated *in vitro* into Th1 or Th2 cells. Differentiation profiles were confirmed using ELISPOT assay, intracellular cytometry and real-time PCR analyses (figure 1). Differentiated cells were then adoptively transferred into TCR α KOK mice recipients (H-2^k) which are devoid of $\alpha\beta$ T lymphocytes. To study the direct alloreactivity, recipient mice were grafted with skin from B10.P (H-2^p) congenic mice expressing the I-E^p molecule. To study indirect pathway, recipient mice were grafted with skin from transgenic mouse B6(mHEL-Hb) expressing the Hb(64-76) epitope inserted in the membranous hen-egg lysozyme (HEL) protein as a surrogate MHC class II molecule as previously described (Sauve, Baratin et al. 2004). Skin from B6.AKR (H-2^k) mice was also used as an isogeneic control.

To first evaluate the role of helper T cells in graft rejection, we performed skin graft on mice reconstituted with 5 millions 2.102 CD4⁺ Th1 or Th2 cells (referred to from here as Th1 or Th2 mice). Graft rejection was evaluated daily until day 25 post-transplant. Whereas isogeneic skin was indefinitely accepted, skin grafts from Th1 mice were

rejected in both allogeneic pathways with a mean survival time (MST) of $15,5 \pm 2,9$ days in the direct pathway (figure 2A) and $11,5 \pm 1,4$ days in the indirect pathway (figure 2B). Skin grafts from Th2 mice were also rejected in both allogeneic pathways with a MST of $17,5 \pm 8,1$ days in the direct pathway and $20,0 \pm 1,8$ days in the indirect pathway (figure 2). Finally, although graft rejection happened with both type of T helper cells, rejection was significantly faster in indirect pathway of Th1 mice as compared to Th2 mice (figure 2).

T cells differentiation profiles are maintained in draining lymph nodes after 11 and 21 days post-transplantation

Since the discovery of new T helper cells such as induced T reg, Th9, Th17 and Th22, it seems that T cell commitment to one lineage exists no more (Zhou, Chong et al. 2009; O'Shea and Paul 2010; Wan 2010). Although, Th1 and Th2 cells have demonstrated less plasticity than others, we investigated to confirm that Th1-Th2 transferred cells remain in their initial differentiated type at time of rejection. Draining lymph nodes were harvested 11 and 21 days post-transplantation and the production of IFN- γ and IL-4 was evaluated by intracellular flow cytometry in CD4⁺Thy1.1⁺ T cells. At day 11, coinciding with initiation of graft rejection, cells with a Th1 phenotype were mainly recovered from Th1 mice although some cells producing IL-4 could be recovered (figure 3A). In contrast, only cells with Th2 phenotype were recovered from Th2 mice (figure 3B). This Th1/Th2 secretion pattern was conserved at least until day 21 (figure 3C-D) although we observed a small percentage of IFN- γ producing cells in Th2 mice at that moment. Taken together,

these data demonstrate that rejection occurs in presence of Th1 or Th2 differentiated T cells.

Th1 mice produced antigen-specific IgG2a, in contrast to a mixed isotype production in Th2 mice.

As our laboratory has shown the absolute requirement of the indirect pathway for IgG alloantibody production (Sauve, Baratin et al. 2004), we investigated here T cell help in alloantibody production only in the indirect pathway of mice injected with Th1 or Th2 cells. Using a HEL-specific ELISA, we observed a similar production of total IgG in mice reconstituted with either type of T helper cells (figure 4A). We further investigated IgG isotype production as Th1 are usually associated with a predominant IgG2a response and Th2 cells with IgG1 and IgE (Janeway, Travers et al. 2001). As expected, Th1 cells induced an IgG2a response ($p = 0.0174$) and no other isotype (figure 4B). Interestingly, Th2 cells did bring help to IgG1 production but all other isotypes were also observed. This result supports our previous result that T helper cells have maintained their differentiation pattern after graft rejection.

Discussion

The classification of CD4⁺ helper T cells in Th1 and Th2 subsets on the basis of their cytokine secretion as lead to a paradigm in graft rejection mainly based on the type of cytokines retrieved in grafts. This paradigm states that Th1 cytokines (IL-2 and IFN- γ) induce graft rejection through preferential activation of delayed-type hypersensitivity and CTL responses (Strom, Roy-Chaudhury et al. 1996; Piccotti, Chan et al. 1997). By opposition, Th2 cytokines (IL-4) would favour graft tolerance by antagonizing Th1-mediated pathways (Piccotti, Chan et al. 1997). This model suggests that strategies aiming at Th2 deviation could promote graft survival (Lakkis 1998). This hypothesis was also made from observation that in grafted patients receiving tolerance therapies, no Th1 cytokines were detected but Th2 cytokines were present in graft (Strom, Roy-Chaudhury et al. 1996). Indeed, this phenomenon was also observed in animal receiving immunosuppressive therapies or intrathymic immune modulation (Takeuchi, Lowry et al. 1992; Sayegh, Akalin et al. 1995; Onodera, Hancock et al. 1997) (Shirwan, Barwari et al. 1998). Moreover it was first demonstrated *in vivo* that an adoptive transfer of a Th2-like cell line alloreactive for a MHC class II antigen was able to prolonged skin graft survival in recipient mice as compared to control mice who received no injection (Maeda, Takata et al. 1994).

However, numerous studies against this paradigm have emerged since. First clues were obtained from IL-2 and IFN- γ double KO recipients where unopposed IL-4 action did not lead to graft tolerance (Lakkis 1998). Furthermore, *in vivo* study by VanBuskirk et al., where *in vitro* differentiated Th2 cells were adoptively transferred into syngeneic SCID mice bearing heart allografts, have showed that graft rejection occurred with kinetics

similar to those observed in mice reconstituted with Th1 cells (VanBuskirk, Wakely et al. 1996). This was confirmed by Zelenika et al. who showed that differentiated Th1 or Th2 CD4+ T cells with identical specificity for the male minor transplantation antigen (H-Y) can reject skin allografts when transferred in T cell depleted mice (Zelenika, Adams et al. 1998). Piccotti et al. when inducing Th2 responses by antagonizing IL-12 effect did observe an exacerbation of cardiac allograft rejection instead of a state of tolerance (Piccotti, Chan et al. 1996).

As rejection is possible in absence of IL-2 and presence of IL-4, some have argued that IL-4 is not a marker for tolerance but only a less powerful cytokine to induce graft rejection and because it suppresses Th1 responses, it may indirectly delay graft rejection (Strom, Roy-Chaudhury et al. 1996). It has been demonstrated that Th2 cytokines may evoke graft rejection through alternative mechanisms. Indeed, when CD8+ CTL responses are depleted in recipient mice, eosinophils and large mononuclear cells are detected in rejecting grafts (Chan, DeBruyne et al. 1995). Moreover, intragraft cytokine transcript expression was evaluated and both Th1 and Th2 cytokine genes were expressed. Thus it is likely that induced CTL responses may mask possible Th2 responses and in their absence, IL-4 could play a dominant role in graft rejection.

Previous results in our lab have showed no preferential cytokine expression in spleen or lymph nodes of recipient mice following skin graft rejection. Indeed, there was a mixed Th1/Th2 cytokine profile in either pathway of rejection suggesting that both IFN- γ and IL-4 could lead to rejection. Thus, we further investigated this hypothesis using the TCR α KOK mouse model with adoptive transfer of 2.102 TCR transgenic T cell clone

(Sauve, Baratin et al. 2004). Our model is particular in that we can characterize both direct and indirect pathways independently using the same T cell clonotype in identical mouse recipients. As our model does not contain CD8+ T cells, Th2 responses would not be hidden by the presence of this CTL population.

Th1 and Th2 populations were generated *in vitro* from 2.102 TCR transgenic T cells. We confirmed that Th1 cells secreted IFN- γ and Th2 cells secreted IL-4. Taking advantage of this model, we have clearly demonstrated here that *in vitro* differentiated Th1 or Th2 cells can induce skin graft rejection in both alloreactive pathways. Although we observed a small delay in the rejection kinetics, Th2 can induce rejection. Cytokine profiles were maintained as long as 21 days post graft. These results are in agreement with later studies refuting the hypothesis that Th2 cells induce tolerance.

As mention previously, Th1 cells mainly induce cellular responses but they also deviate B cells antibody production toward IgG2a isotype through IFN- γ secretion while it inhibits IgG1, IgG2b and IgG3. Contrariwise, IL-4 favours IgG1 production and suppresses other isotypes (Snapper and Finkelman 1993). Thus we checked in our model antibody production to confirm the differentiation state of our transferred cells. As expected, we observed a strong IgG2a isotype production in Th1 mice injected. Th2 cells did induce IgG1 isotype production in Th2 mice, although other isotypes were detected. This multiple antibody production could maybe be explained by the presence of other cells secreting IFN- γ such as NK cells since no IFN- γ cytokine was detected in Th2 cells at day 11. Further investigations would be necessary to characterize which cellular populations can help CD4+ T cells in skin graft rejection in our model.

In conclusion, our results demonstrate that Th2 cells can lead to skin graft rejection in each pathway of rejection, but with different kinetic. Their differentiation profile was proven before the injection and at several time points after the transfer. Clearly, Th2 cells are as deleterious as Th1 cells can be, although probably using distinct mechanism. Thus therapies should not aim at deviating T helper cell responses on one side or the other to induce allograft tolerance or long-term engraftment as both Th1 and Th2 cells can induce graft rejection.

Materials and methods

Mice

C57BL/6J $Tcr\alpha^{tm1/Mom}$ (H-2^b) were purchased from The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, US) and bred with B6.AKR (H-2^k) to introduce the mutation into H-2^k haplotype (referred herein as TCR α KOK). These $\alpha\beta$ T-cell-deficient mice were used as recipients of skin grafts (Mombaerts, Clarke et al. 1992). The 2.102 TCR-transgenic mice (2.102Tg) were maintained on B6.AKR background (H-2^k). Transgenic mice for the mHEL-Hb molecule generated on a C57BL/6 background (H-2^b) (referred herein as B6(mHEL-Hb)) have also been described elsewhere (Williams, Vidal et al. 1998). B10.P, B6.AKR, 2.102 TCR and mHEL-Hb transgenic mouse lines were kindly provided by Dr Paul M. Allen (Washington University, St-Louis, MO, US). All mice were maintained in our pathogen-free animal facilities.

T cell differentiation

2.102Tg CD4⁺ T cells were isolated from 2.102Tg mouse spleen using Miltenyi MACS L3T4 beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Purified CD4⁺ T cells were incubated for 7 days with irradiated B6.AKR mouse splenocytes (ratio 1:5) in presence of Hb peptide (1 μ M), IL-2 (100 U/ml, R&D systems, Minneapolis, MN) and IL-12 (5 U/ml, R&D systems) + anti-IL-4 (10 μ g/ml, clone 11B11) for Th1 differentiation or IL-4 (100 U/ml, R&D systems) + anti-IFN- γ (10 μ g/ml, clone R4-6A2) for Th2 differentiation. Differentiation profiles were confirmed by ELISPOT assay, intracellular cytometry and real-time PCR analyses.

Adoptive transfer and skin graft

The day before grafting, recipients were reconstituted with 5 million 2.102Tg CD4⁺ Th1 or Th2 differentiated cells. Tail-skin was engrafted as previously described on mice anesthetised with ketamine/xylazine (Wyeth Canada, St-Laurent, QC) and sedated with buprenorphine (McGill animal resource center, Montreal, QC) (Sauve, Baratin et al. 2004). Grafts were visually scored daily for evidence of rejection and were considered rejected when over 90% shrinkage or necrosis was observed

ELISPOT assay

ELISPOT assays for detecting epitope-specific T cells that secrete IFN- γ or IL-4 were performed as previously described (Sauve, Baratin et al. 2004). Briefly, plates (Millipore, Bedford, MA) were coated with 4 μ g/mL of anti-mouse IFN- γ or anti-mouse IL-4 (respectively R4-6A2 and 11B11, eBioscience, San Diego, CA). *In vitro* differentiated T cells or lymph node cells (1×10^3 – 1×10^5 /well) were stimulated with B6.AKR splenocytes (1×10^5 /well) and 1 μ M of Hb(64-76), GKKVITAFNEGLK, or Hb(64-76)Q72 null, GKKVITAFQEGLK peptides. After 48 h, plates were washed, incubated with 4 μ g/mL of biotinylated anti-mouse IFN- γ or anti-mouse IL-4 (respectively XMG1.2 and BVD6-24G2, eBioscience), and subsequently incubated with ExtrAvidin alkaline phosphatase conjugate (Sigma, St. Louis, MO). Reactions were developed with NBT/BCIP (Sigma), and IFN- γ or IL-4 spot-forming cells (SFC) were counted using a stereomicroscope.

Alloantibody analyses

To detect donor-specific alloantibodies, sera were obtained at days 0 and 20 post-transplant and tested by a HEL-specific ELISA. *Nunc-Immuno MicroWell* (VWR, Ville Mont-Royal, QC) were coated with HEL (sigma) and incubated with serial dilutions of

sera. Biotinylated anti-mouse IgM (R6-60.2, BD biosciences, Mississauga, ON) followed by HRP-streptavidin (Zymed, San Francisco, CA) or HRP anti-mouse IgG (Sigma) antibodies were used as next steps. Reaction was revealed using OPD substrate (Sigma). Antibody titers were determined as the reciprocal of the highest dilution of serum which gave an optical density (O.D.) greater the cut-off O.D., a value determined as two standard deviations above the O.D. dilutions of mice pre-immune serum.

IgG isotypes were detected by flow cytometry analyses. Briefly, BW5147 T-cell lines or BW5147 cells expressing mHEL-Hb were incubated with serial dilutions of mouse serum engrafted for indirect pathway. Cells were then washed and stained with FITC anti-mouse IgG1 (A85-1), IgG2a (R19-15), IgG2b (R12-3) or IgG3 (R40-82) (BD Biosciences). Cells were analyzed using a FACS Calibur (Becton Dickinson). Data represent the differences of mean fluorescence intensity (MFI) between BW5147mHELHb cells and BW5147 cells.

Intracellular staining

At day 11 or 20 post-graft, lymph nodes and spleens were harvested and stimulated for 6h with PMA (Sigma) and ionomycin (Sigma) in presence of Monensin (eBioscience). Restimulated cells were first stained with APC anti-mouse CD4 (GK1.5, eBioscience) and PercP anti-mouse Thy1.1 (OX-7, BD Biosciences) antibodies and stained intracellularly with FITC anti-mouse IFN- γ (XMG1.2, eBioscience) and PE anti-mouse IL-4 (11B11, eBioscience) or with isotypic controls (FITC rat IgG1 and PE rat IgG1, respectively; eBioscience) according to eBioscience intracellular staining protocol.

RNA isolation and cDNA synthesis

RNA was extracted from cell suspension with TriZol (Invitrogen, Burlington, ON) and chloroform, followed by purification with Rneasy kit (Qiagen, Mississauga, ON). For

cDNA synthesis, DNase-digested RNA was primed with Hexanucleotides Mix (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and reverse transcribed with SuperscriptIII (Invitrogen, Burlington, ON) according to the manufacturer's instruction.

Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Kinetic PCR was performed on a RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, AU) using the SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Espoo, FI) and continuous fluorescence monitoring as previously described (Wittwer, Herrmann et al. 1997). PCR reactions were cycled 40 times after initial denaturation (95°C, 10 min) with the following parameters: 95°C for 10s, 60°C for 15s and 72°C for 20s. Samples were run in duplicate and relative quantification of mRNA levels was performed by the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), using GAPDH as an endogenous reference and undifferentiated CD4+ T cells as calibrator. Primers were purchased from IDT (Coralville, IA) and their sequences were as follows; IFN- γ (ID 33468859a1): forward 5'-ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC-3', reverse 5'-CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC-3', IL-4: forward 5'-ACC GAT GAA TCC AGG CAT CG-3', reverse 5'-ATG CAC GGA GAT GGA TGT GC-3', GAPDH: forward 5'-TCA CCA CCA TGG AGA AGG C-3', reverse 5'-GCT AAG CAG TTG GTG GTG CA-3' with relevant PrimerBank ID number when designed using this database (Spandidos, Wang et al. 2010).

Statistical analyses

Skin graft survival curves and p-values were calculated using Kaplan-Meier/log rank test methods. Flow cytometry and ELISA analyses were compared using a one-way ANOVA test or T-test. Values are expressed as the mean \pm SEM. (*p \leq 0,05 **p \leq 0,01 ***p \leq 0,005).

Acknowledgements

The authors are grateful to Paul M. Allen for providing most of the mouse strains used in this study. We would like to thank Yvon Lamontagne for care of the mouse colony.

Figure legends

Figure 1: T helper differentiation profiles – Th1 express and secrete IFN- γ and Th2 express and secrete IL-4

Purified 2.102Tg CD4⁺ T cells were incubated for 7 days with irradiated B6.AKR mouse splenocytes in presence of Hb peptide, IL-2 and IL-12 + anti-IL-4 for Th1 differentiation (black) or IL-4 + anti-IFN- γ for Th2 differentiation (white). Differentiation profiles were confirmed by three different techniques. First, qRT-PCR analyses using gene-specific primers were performed to determine expression of IFN- γ and IL-4 on cDNA from differentiated T cells (A). Second, CD4⁺ Thy1.1⁺ differentiated T cells were analysed by intracellular cytometry for the expression of IFN- γ and IL-4 cytokines (B). Lastly, T helper cells were restimulated with APC and Hb specific or null peptide and IFN- γ or IL-4 spot-forming cells (SFC) were counted using a stereomicroscope (C).

Figure 2: Both Th1 and Th2 cells can mediate graft rejection but with delayed kinetics for Th2 cells by the indirect pathway

Five million 2.102Tg purified CD4⁺ T cells differentiated into Th1 (full lines) or Th2 (dash lines) were adoptively transferred i.v. into TCR α KOK recipients. Donor skin graft for direct (black), indirect (dark gray) or isogeneic (not shown) pathway were placed onto the back of recipient mice one day after the cell transfer. Allografts were considered fully rejected when over 90% of shrinkage or necrosis was observed. Statistical analyses were performed with the Kaplan-Meier/log rank test (n = 4).

Figure 3: T helper cell differentiation profiles are maintained after allograft rejection

Five million 2.102Tg purified CD4⁺ T cells differentiated in Th1 or Th2 were adoptively transferred i.v. into TCR α KOK recipients and donor skin graft for direct, indirect or isogeneic pathway were placed onto the back of recipient mice one day after the cell transfer. Lymph nodes were recovered at day 11 and 21, and tested by intracellular cytometry for IFN- γ (black) and IL-4 (white) production in CD4⁺Thy1.1⁺ cells (n = between 4 and 8) .

Figure 4: Th1 cells mainly induce a production of IgG2a in contrast to a mixed isotypes production with Th2 cells

Twenty days post-transplant, sera were collected and serial dilutions were tested using a HEL-specific anti-IgG ELISA. Antibody titers were determined as the reciprocal of the highest dilution of serum which gave an optical density (O.D.) greater the cut-off O.D., a value determined as two standard deviations above the O.D. dilutions of mice preimmune serum (n = 6 or 7) (A). Sera of mice grafted for indirect pathway were further tested by flow cytometry against BW5147 cells or BW5147 cells expressing mHEL-Hb. FITC-conjugated rat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG3 were used to determine IgG isotypes. Data represent the differences of MFI between BW5147mHELHb cells and BW5147 cells (n=4 or 8) (B).

Figures

Figure 1

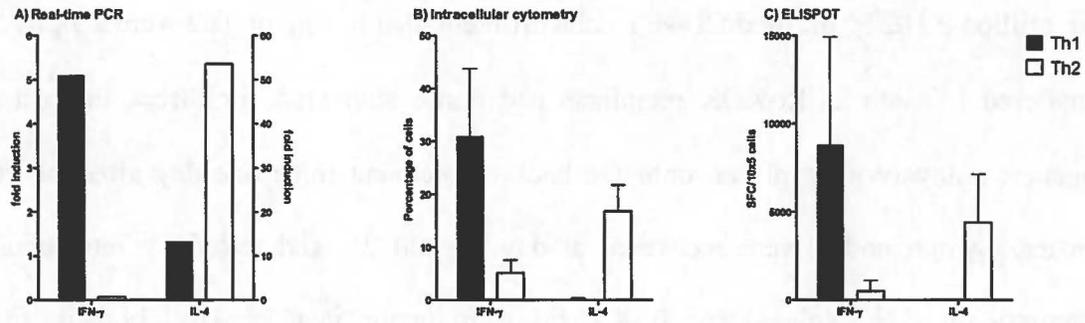


Figure 2

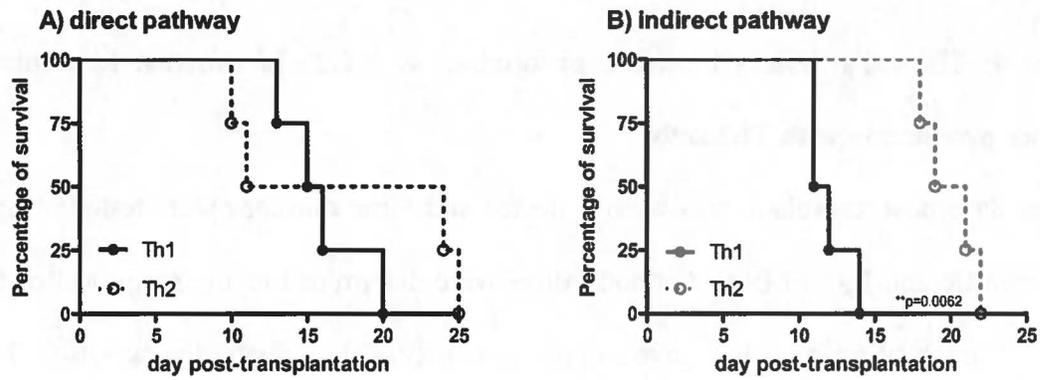


Figure 3

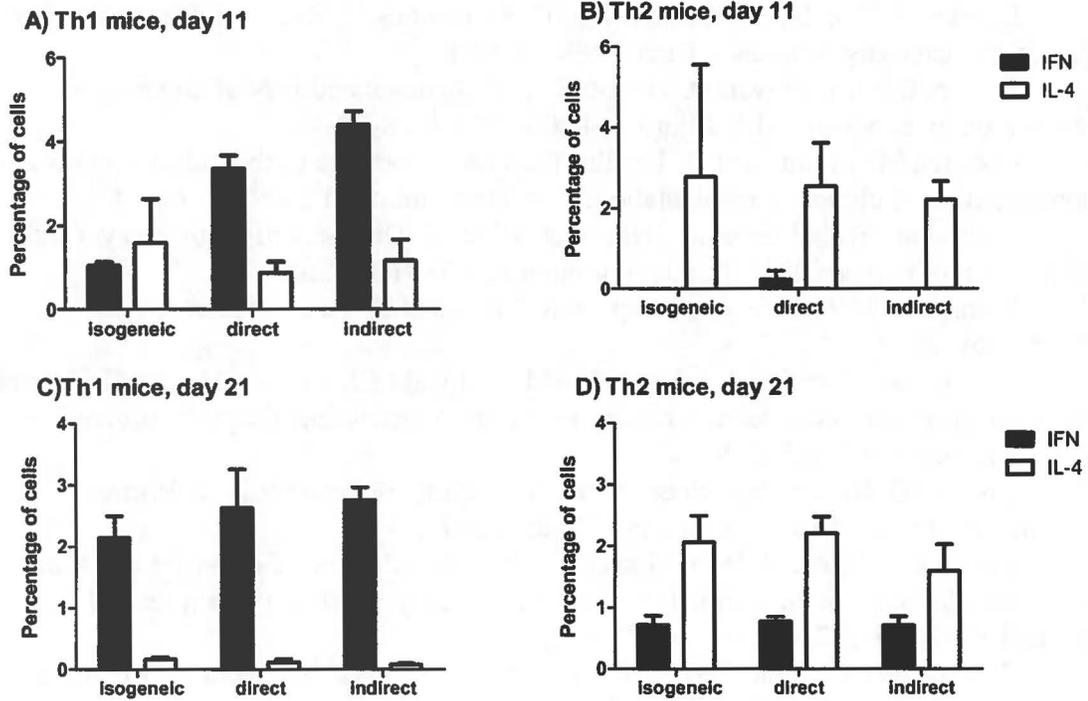
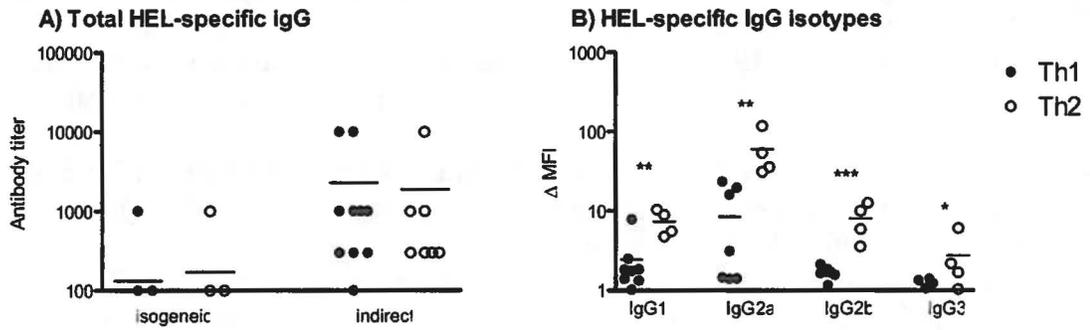


Figure 4



References

1. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990;11:83-8.
2. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 2004;173:4828-37.
3. Gokmen MR, Lombardi G, Lechler RI. The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008;20:568-74.
4. Mosmann TR, Schumacher JH, Street NF, et al. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells. *Immunol Rev* 1991;123:209-29.
5. Wynn TA. T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2. *Nat Immunol* 2005;6:1069-70.
6. Piccotti JR, Chan SY, VanBuskirk AM, Eichwald EJ, Bishop DK. Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival? *Transplantation* 1997;63:619-24.
7. Lakkis FG. Role of cytokines in transplantation tolerance: lessons learned from gene-knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2361-7.
8. Onodera K, Hancock WW, Graser E, et al. Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients. *J Immunol* 1997;158:1572-81.
9. Chen N, Gao Q, Field EH. Prevention of Th1 response is critical for tolerance. *Transplantation* 1996;61:1076-83.
10. Shirwan H, Barwari L, Khan NS. Predominant expression of T helper 2 cytokines and altered expression of T helper 1 cytokines in long-term allograft survival induced by intrathymic immune modulation with donor class I major histocompatibility complex peptides. *Transplantation* 1998;66:1802-9.
11. Maeda H, Takata M, Takahashi S, Ogoshi S, Fujimoto S. Adoptive transfer of a Th2-like cell line prolongs MHC class II antigen disparate skin allograft survival in the mouse. *Int Immunol* 1994;6:855-62.
12. Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation* 1992;53:1281-94.
13. VanBuskirk AM, Wakely ME, Orosz CG. Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. *Transplantation* 1996;62:229-38.
14. Csencsits K, Wood SC, Lu G, et al. Graft rejection mediated by CD4+ T cells via indirect recognition of alloantigen is associated with a dominant Th2 response. *Eur J Immunol* 2005;35:843-51.
15. Zelenika D, Adams E, Mellor A, et al. Rejection of H-Y disparate skin grafts by monospecific CD4+ Th1 and Th2 cells: no requirement for CD8+ T cells or B cells. *J Immunol* 1998;161:1868-74.
16. Sauve D, Baratin M, Leduc C, Bonin K, Daniel C. Alloantibody production is regulated by CD4+ T cells' alloreactive pathway, rather than precursor frequency or Th1/Th2 differentiation. *Am J Transplant* 2004;4:1237-45.
17. Daniel C, Horvath S, Allen PM. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 1998;8:543-52.

18. Grakoui A, Donermeyer DL, Kanagawa O, Murphy KM, Allen PM. TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J Immunol* 1999;162:1923-30.
19. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009;30:646-55.
20. Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 2010;130:166-71.
21. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327:1098-102.
22. Janeway CA, Jr., Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology 5, The immune system in health and disease*. 5th ed. New York: Garland Publishing; 2001.
23. Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, et al. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr Opin Immunol* 1996;8:688-93.
24. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995;181:1869-74.
25. Piccotti JR, Chan SY, Goodman RE, Magram J, Eichwald EJ, Bishop DK. IL-12 antagonism induces T helper 2 responses, yet exacerbates cardiac allograft rejection. Evidence against a dominant protective role for T helper 2 cytokines in alloimmunity. *J Immunol* 1996;157:1951-7.
26. Chan SY, DeBruyne LA, Goodman RE, Eichwald EJ, Bishop DK. In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. *Transplantation* 1995;59:1155-61.
27. Snapper CM, Finkelman FD. Immunoglobulin class switching. In: Paul WE, ed. In: William E Paul, (éd) *Fundamental immunology*. 3rd ed. New York: Raven Press; 1993:837-56.
28. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, et al. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 1992;360:225-31.
29. Williams CB, Vidal K, Donermeyer D, Peterson DA, White JM, Allen PM. In vivo expression of a TCR antagonist: T cells escape central tolerance but are antagonized in the periphery. *J Immunol* 1998;161:128-37.
30. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-1, 4-8.
31. Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res* 2010;38:D792-9.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice to ensure transparency and accountability.

2. The second section outlines the various methods used to collect and analyze data. It highlights the use of both qualitative and quantitative approaches to gain a comprehensive understanding of the subject matter.

3. The third part of the document details the results of the research. It shows that there is a significant correlation between the variables studied, which supports the initial hypothesis.

4. The fourth section discusses the implications of the findings. It suggests that the results could be applied in various contexts to improve efficiency and effectiveness.

5. The final part of the document concludes with a summary of the key points and offers suggestions for further research. It encourages continued exploration of the topic to build on the current findings.

ARTICLE II

Formation of Lymphoid Structures in Skin Allografts Following Direct or Indirect Pathways Alloreactivity.

C. Leduc and C. Daniel*

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada

*Corresponding author: Dr. Claude Daniel, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Qc, Canada, H7V 1B7, tel: 450-687-5010 #4683, fax: 450-686-5313, claudedaniel@iaf.inrs.ca

Running title: Skin graft rejection in absence of SLO

Word count: 3392

Abstract

Background: Whether or not secondary lymphoid organs (SLO) are essential to graft rejection is still controversial. Moreover, this issue has not been examined in the context of direct or indirect alloreactivity. **Methodology/Principal Findings:** Using an adoptive transfer model of TCR transgenic T cells into LT β R-deficient recipients, we showed that skin graft rejection still occurs in absence of SLO for both allogeneic pathways, although it is significantly delayed in comparison to normal mice. qRT-PCR and flow cytometry analyses demonstrated that CD4⁺ T cells restricted to the indirect pathway are activated and proliferated in the bone marrow and allografts. In contrast, CD4⁺ T cells restricted to the direct pathway proliferated only in allografts. Expression of molecules critical in lymphoid organ neogenesis such as lymphotoxins, CCL19 or CCR7 was demonstrated in allografts. Furthermore, PNA^d formation correlating with T cell infiltration was confirmed in allografts by immunohistochemistry and confocal microscopy analyses. **Conclusions/Significance:** Taking together, these results clearly show that SLO are dispensable for rejection and that responses can be initiated in the graft within lymphoid organ-like structures. Thus strategies aiming at blocking lymphoid organ neogenesis may be useful to reduce the risk of graft rejection.

Introduction

It has been established since a long time that CD4⁺ T cells are important in graft rejection (Hall 1991). They can be activated by three alloreactive pathways: direct, indirect and semi-direct (Lechler, Lombardi et al. 1990; Herrera, Golshayan et al. 2004). In the direct pathway, CD4⁺ T cells recognize allogeneic MHC molecules on donor APCs whereas in the indirect pathway, they recognize allogeneic peptides presented by MHC molecules of self-APCs. In the semi-direct pathway, T cells recognize intact donor MHC-peptide complexes transferred from donor to recipient APCs (Gokmen, Lombardi et al. 2008). It is generally accepted that initiation of these alloreactive responses occurs in the organized structure of secondary lymphoid organs (SLO). Indeed, Lakkis et al. have shown that lymph nodes or spleen were required for allograft rejection using splenectomized alymphoblastic (aly/aly) mice (Lakkis, Arakelov et al. 2000). Since then, many studies challenging these conclusions have emerged, according to the mouse model, donor haplotype and the nature of allografts used. Using the aly/aly model, two studies (Luo, Tanaka et al. 1999; Sugito, Koshinaga et al. 2005) have shown that skin from H-2^k donors was rejected, in contrast to skin from H-2^d donors as used by Lakkis et al. Rejection also occurs in the aly/aly model when tail skin grafts are used instead of trunk skin (Yamanokuchi, Ikai et al. 2005). Furthermore, Zhou et al. have shown that skin and heart could be rejected, although with delayed kinetics as compared to wild-type mice, using splenectomized LT α ^{-/-} or LT β R^{-/-} mice (Zhou, Hwang et al. 2003). Recently, it has also been shown that lung allograft rejection is independent of SLO (Gelman, Li et al. 2009). Previous studies in our laboratory, using TCR-transgenic mice as recipients of skin graft, have shown that effector T cells could be first detected in the graft and later in the lymph

nodes in the direct pathway (Baratin, Bonin et al. 2004). These observations, which have been further validated using an adoptive transfer model of transgenic T cells into $\alpha\beta$ T cell-deficient mice (TCR α KOK) as recipients (Sauve, Baratin et al. 2004)), support the hypothesis that SLO are not essential for rejection through direct pathway where sensitization of T cells could occur in the graft.

In order to investigate the role of SLO in alloreactive T cell priming and graft rejection, we generated recipients lacking functional SLO by breeding T cell-deficient and lymphotoxin β receptor-deficient mice (TCR α KOK LT β R $^{-/-}$). These mice are devoid of lymph nodes and Peyer's patches but have a spleen which is removed by surgery (Futterer, Mink et al. 1998). With this new model, we demonstrated that despite a delay in the kinetics of rejection in mice devoid of SLO, both pathways of rejection lead to skin graft rejection. Alloreactive T cells were activated and proliferated in the bone marrow at early time points and later in the allograft in the indirect pathway. In contrast, T cell activation and proliferation was observed in the allograft in the direct pathway, which correlated with the formation of lymphoid structures. These results demonstrate that both alloreactive pathways independently lead to skin graft rejection in absence of SLO and more importantly, that the allograft itself can support the activation of naive T cells.

Materials and methods

Mice

C57BL/6J Tcr α ^{tm1/Mom} (H-2^b) (Mombaerts, Clarke et al. 1992) purchased from The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) were bred with B6.AKR to introduce the mutation into H-2^k haplotype (referred herein as TCR α KOK). These were crossed with LT β R^{-/-} mice (Futterer, Mink et al. 1998) (kindly obtained from Dr Yang-Xin Fu, University of Chicago, with permission of Dr Klaus Pfeffer) to generate mice without SLO (TCR α KOK LT β R^{-/-}). The 2.102 TCR-transgenic (2.102Tg, H-2^k) and the B6(mHEL-Hb) (H-2^b) mice have been previously described (Williams, Vidal et al. 1998; Grakoui, Donermeyer et al. 1999; Sauve, Baratin et al. 2004). B10.P, B6.AKR, 2.102Tg and B6(mHEL-Hb) mice were kindly provided by Dr Paul M. Allen (Washington University, St-Louis, MO) and maintained in our pathogen-free animal facilities.

Splenectomy, CD4⁺ T cell adoptive transfer and skin graft

One week before the graft, mice were anesthetised with ketamine/xylazine (Wyeth Canada, St-Laurent, QC) and sedated with buprenorphine (McGill animal resource center, Montreal, QC). Spleens were removed by cauterizing arteries. The day before grafting, recipients were reconstituted with 10 million 2.102Tg CD4⁺ T cells isolated using Miltenyi MACS L3T4 beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Tail-skin was engrafted as previously described (Sauve, Baratin et al. 2004). Grafts were visually scored daily for evidence of rejection and were considered rejected when over 90% shrinkage or necrosis was observed.

Flow cytometry

Femurs and tibias were recovered from recipients 5, 7, 11, or 14 days post-transplant. Bone marrow cells were flushed out and isolated using lympholyte®-M (Cedarlane Laboratories, Hornby, ON). Cells were stained with APC anti-mouse CD4 (GK1.5, eBioscience, San Diego, CA), PerCP anti-mouse Thy1.1 (OX-7, BD Biosciences, Mississauga, ON) and FITC anti-mouse CD69 (H1.2F3, eBioscience) or FITC armenian hamster isotypic control (eBio299Arm, eBioscience) antibodies. Analyses were performed by flow cytometry using a FACSCalibur (Becton Dickinson).

BrdU assay

At 5, 7, 11, or 14 days post-transplant, recipients were injected *i.p.* with 0.5 mg of BrdU (Sigma, Oakville, ON) 4 and 2 hours before sacrifice. Bone marrow cells were isolated as described above. Grafts were cut into pieces, digested with 10% collagenase (Sigma), filtered through a 100 µm cell-strainer and separated over lympholyte®-M. Isolated cells were stained with APC anti-mouse CD4 (GK1.5) and PerCP anti-mouse Thy1.1 (OX-7). BrdU incorporation was revealed with FITC anti-BrdU Flow Kit (BD Biosciences).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Skin grafts were retrieved at day 5, 7 and 11 post-transplant and snap-frozen in Tissue-Tek OCT embedding compound (Somagen Diagnostics, Edmonton, AB). Eight-µm cryosections were mounted onto slides and fixed in cold acetone. For immunohistochemistry, slides were pre-incubated in 0.6% PBS-H₂O₂ containing 10% goat serum (Cedarlane Laboratories). Slides were incubated with biotinylated anti-mouse

PNAd (MECA-79) or rat IgM isotypic control (RTK2118) antibodies (Cedarlane Laboratories). Horseradish peroxidase streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used as a secondary reagent. Reactions were developed with DAB substrate kit (BD Biosciences) and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma). For immunofluorescence, slides were pre-incubated in PBS containing 10% goat serum and incubated with biotinylated anti-mouse PNAd (MECA-79) and FITC anti-mouse Thy1.1 (HIS51, eBioscience) antibodies or with biotinylated rat IgM (RTK2118) and FITC mouse IgG2a (eBioscience) isotypic controls. Reactions were developed with streptavidin Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Eugene, OR) and anti-FITC Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) antibody. Nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes).

RNA isolation and cDNA synthesis

RNA was extracted from skin grafts with Trizol (Invitrogen, Burlington, ON) and chloroform, followed by purification with the RNeasy kit (Qiagen, Mississauga, ON). For cDNA synthesis, DNase-digested RNA was primed with Hexanucleotides Mix (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and reverse transcribed with SuperscriptIII (Invitrogen, Burlington, ON) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Kinetic PCR was performed on a RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, AU) using the SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Espoo, FI) and continuous fluorescence monitoring as previously described (Wittwer, Herrmann et al. 1997). PCR reactions were cycled 40 times after initial denaturation (95°C, 10 min) with the following parameters: 95°C for 10s, 60°C for 15s and 72°C for 20s. Samples were run in duplicate and relative

quantification of mRNA levels was performed by the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), using GAPDH as an endogenous reference and ungraft donor skin specific for each pathway as calibrator. Primers (table 1) were purchased from IDT (Coralville, IA) or from Sigma (Oakville, ON), with relevant PrimerBank ID numbers when designed using this database (Spandidos, Wang et al. 2010).

Statistical analyses

Skin graft survival curves and p-values were calculated using Kaplan-Meier/log rank test methods. Flow cytometry and real-time PCR analyses were compared using one-way ANOVA. When significant, a Bonferroni's Multiple Comparison Test was performed. Values are expressed as the mean \pm SEM. (* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,005$).

Results

Mice without secondary lymphoid organs reject their graft but with delayed kinetics

In order to evaluate the importance of the secondary lymphoid organs in the direct and indirect pathways of rejection, we took advantage of our model of skin graft rejection that allows us to study each pathway individually using TCR transgenic T cells from a single clonotype (2.102). Indeed, the 2.102 CD4⁺ T cell clone recognizes the mouse MHC class II I-E^P molecule by the direct pathway and the mouse hemoglobin (amino acid 64-76) peptide presented by MHC class II I-E^k molecule on self-APC by the indirect pathway (Daniel, Horvath et al. 1998; Grakoui, Donermeyer et al. 1999). CD4⁺ T cells were purified from 2.102Tg mouse spleens and adoptively transferred in TCR α KOK/LT β R^{-/-} mice, which are devoid of $\alpha\beta$ T lymphocytes and secondary lymphoid organs (SLO), except for the spleen that was surgically removed. TCR α KOK mice which possess SLO were also used as controls. To study direct alloreactivity, recipients were grafted with skin from B10.P congenic mice expressing the I-E^P molecule. To study the indirect pathway, recipients were grafted with skin from transgenic mouse B6(mHEL-Hb), expressing the hemoglobin (Hb) epitope inserted in a membranous form of hen-egg lysozyme (HEL) protein under the control of the I-E α chain promoter (Williams, Vidal et al. 1998). This fusion protein can be considered a surrogate MHC class II molecule and is processed and presented by I-E^k on recipients' APCs (Sauve, Baratin et al. 2004). Whereas isogeneic control skin (B6.AKR) was indefinitely accepted, skin grafts from both alloreactive pathways were rejected without statistical difference (figure 1). Mean survival time (MST) was 18,5 \pm 1,2 days in the direct pathway and 19,5 \pm 4,2 days in the

indirect pathway. Though graft rejection occurred in absence of secondary lymphoid organs, it was nonetheless significantly delayed in comparison to control mice with lymphoid organs, where the MST was $16,0 \pm 1,2$ days in the direct pathway and $15,5 \pm 1,7$ days in the indirect pathway.

Bone marrow is a site of activation and proliferation for CD4⁺ T cells in the indirect pathway

Considering that graft rejection occurs independently of secondary lymphoid organs in our skin graft model, bone marrow was investigated as an alternative site of T cell activation and proliferation (Tripp, Topham et al. 1997; Feuerer, Beckhove et al. 2003). Bone marrow was harvested 5, 7, 11 and 14 days post-transplantation and 2.102Tg CD4⁺ T cell infiltration was evaluated by flow cytometry (CD4⁺ Thy1.1⁺ cells) and real-time PCR analyses (2.102TCRB mRNA). A significant expansion of 2.102Tg CD4⁺ T cells was observed in the indirect pathway at day 7 and 14 post-transplant, by flow cytometry and qRT-PCR analyses (figure 2A and B). In contrast, no CD4⁺ T cell expansion was observed for direct pathway alloreactivity and isogeneic controls. In order to determine whether this expansion correlated with T cell proliferation, bone marrow cells were analysed by flow cytometry for BrdU incorporation and CD69 expression. Moreover, differentiation into effector T cells was analysed by qRT-PCR for IFN- γ mRNA. As shown in figure 2C, CD4⁺ T cells incorporated BrdU at day 7, 11 and 14 post-transplant in the indirect pathway, suggesting that bone marrow is an activation/proliferation site for 2.102Tg CD4⁺ T cells in this pathway. In addition, more CD4⁺ T cells expressed the early activation marker CD69 in the indirect pathway at day 5, 7 and 11 post-transplant, in comparison to isogeneic controls (figure 2D). Although some CD69 expression was

also observed on T cells in the direct pathway (figure 2D), these cells did not incorporate BrdU, suggesting that they are proliferating elsewhere. Finally, qRT-PCR analyses revealed a significant increase in IFN- γ mRNA expression at day 14 post-transplant in the indirect pathway (figure 2E). Taken together, these data demonstrate that bone marrow is a surrogate site of activation and proliferation for CD4⁺ T cells in mice grafted by the indirect pathway but not for the direct pathway. Proliferating T cells in the indirect pathways, as seen by BrdU incorporation, were also observed at the same days in the blood indicating that these cells may migrate and continue to proliferate elsewhere (figure S1).

CD4⁺ T cells are activated and proliferate in the graft in the direct pathway

Previous studies in our laboratory showed that following direct alloreactivity, effector CD4⁺ T cells are detected earlier in the skin graft and later in the draining lymph nodes, which lead us to suggest that graft rejection could be initiated directly in the graft (Baratin, Bonin et al. 2004). This hypothesis is strengthened by our current data demonstrating that bone marrow is not the site of activation of CD4⁺ T cells in mice without SLO, in the direct pathway. In order to confirm that CD4⁺ T cells activation occurs in the graft in the direct pathway, skin grafts were collected 5, 7, 11 and 14 days post-transplantation and infiltration by CD4⁺ T cells was evaluated by flow cytometry and real-time PCR analyses as described above. An increase in 2.102TCRB mRNA expression was revealed at early time points (5 and 7 days) in allografts specific for the direct pathway, suggesting infiltration by 2.102Tg CD4⁺ T cells (figure 3A). Unfortunately, the number of cells recovered from the allograft at day 5 was insufficient for FACS analysis. At days 11 and 14 post-transplant, both methods demonstrated a

massive infiltration by 2.102Tg CD4⁺ T cells in the indirect pathway (figure 3A and B). In addition, IFN- γ mRNA was strongly upregulated in both alloreactivity pathways, and correlated with 2.102TCRB mRNA expression, which suggest that naive 2.102Tg CD4⁺ T cells have differentiated into Th1 effector T cells (figure 3C). Proliferation by graft-infiltrating T cells was assayed using BrdU incorporation as described above. In the direct pathway, BrdU incorporation peaked at day 7 and then slowly declined as IFN- γ producing T cells accumulated (figure 3D). CD4⁺ T cells proliferating in the graft in the indirect pathway were also observed, reaching a maximum at day 11 while almost no T cells were detected in the bone marrow. This result suggests that they might also proliferate in the graft and not only in the bone marrow.

Formation of lymphoid structures occur in skin allografts

Our results strongly support the hypothesis that skin grafts are the site of proliferation for naive 2.102Tg CD4⁺ T cells in the direct pathway. We then evaluated whether there was lymphoid structure formation to support T cell activation and proliferation in allografts. Lymph node-like structure neogenesis, also named tertiary lymphoid organs (TLO), has been reported in several auto-immune disorders, infectious diseases, and cases of chronic rejection (Baddoura, Nasr et al. 2005; Aloisi and Pujol-Borrell 2006; Pabst 2007). One of the key events in the induction of these ectopic lymphoid tissues is the signalling by lymphotoxin $\alpha_1\beta_2$ through the lymphotoxins LT β Receptor (LT β R) (Cupedo, Jansen et al. 2004; Drayton, Liao et al. 2006). Albeit our recipients are LT β R^{-/-}, skin grafts were recovered from LT β R^{+/+} donors and thus could support the formation of TLO. Indeed, LT β R mRNA was detectable in skin grafts recovered at all time points (figure S2).

Analysis of lymphotoxin α and β mRNA by qRT-PCR showed that both sub-units were expressed with similar patterns; significant upregulation of expression began at day 7 post-transplant, reached maximum level at day 11, and remained significant until day 14, though expression was higher in the indirect pathway (figure 4A and B). Taken together, these results suggest that lymphoid structure formation is possible as key ligands-receptors were expressed in allografts of both pathways.

During lymphoid organogenesis, signalling through $LT\beta R$ induces two main events. First it induces the expression of lymphoid chemokines such as CCL19, CCL21, CXCL12 and CXCL13 which are responsible for migration and compartmentalization of lymphoid cells in lymphoid organs (Mebius 2003). Thus we first investigated by qRT-PCR the expression of CCL19 and CCL21 mRNA, and their receptor CCR7, which are responsible for mature dendritic cells (DC) and naive T cells migration into lymph nodes. CCL19 mRNA expression was upregulated in a pattern similar to lymphotoxins mRNA, which peaked at day 11 post-transplant (figure 4C). However, CCL21 mRNA levels remained relatively unchanged compared to normal (ungrafted) skin (figure S3A). In addition, CCR7 mRNA expression was consistently upregulated in both alloreactivity pathways (figure 4D). We also assessed CXCL13 mRNA expression, which is responsible for B cell migration and compartmentalization in B cell zones, but it was not modulated (figure S3B). Thus, mRNA of chemokines important in T cell migration was expressed in the graft.

The second set of events induced by $LT\beta R$ signalling is the expression of adhesion molecules and among them is the peripheral node addressin (PNAd), a set of sialomucins which are expressed specifically on high endothelial venules (HEV) in lymph nodes but

also in ectopic lymphoid tissues (Bistrup, Tsay et al. 2004). PNAd are recognized by CD62L expressed on naive T lymphocytes to mediate their homing to lymph nodes. To evaluate the formation of HEV in allografts, we first performed qRT-PCR analyses of the N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 (GlcNAc6ST-2) as an indicator of HEV because this enzyme is expressed specifically in HEV cells where it is involved in PNAd synthesis (Uchimura and Rosen 2006). Results show a significant expression of the enzyme particularly in the direct pathway (figure 4E) beginning as early as day 5 post-transplant and reaching a maximum at day 11, concomitantly with expression of CCL19 and lymphotoxin sub-units mRNA. To directly confirm the formation of HEV, immunohistochemistry analyses were performed with MECA-79 antibody which recognizes PNAd epitope on HEV. PNAd was detected at day 7 only in allografts of the direct pathway whereas it was present at day 11 in both pathways (figure 4F). We further investigated whether PNAd staining colocalized with T cells by immunofluorescence microscopy using MECA-79 and anti-Thy1.1 antibodies. At day 11, T cells accumulates in T cell zone-like structures and were surrounded by PNAd in both pathways (figure 4G), in contrast to earlier time points where both PNAd and Thy1.1 positive cells were observed in proximity but with no particular arrangement (data not shown). Taken together, these data demonstrate that lymphoid structures and HEV can develop in skin graft of both pathways but earlier in the direct pathway. T cells infiltration is likely to develop in organized follicles; however they do not appear as organized as in TLO as no T cell-B cell compartments were observed.

Discussion

It is generally accepted that immune responses are generated in secondary lymphoid organs. However, in some circumstances such as chronic inflammation and graft rejection, it seems that immune responses may be initiated *in situ* but this concept remains controversial. The first clue of peripheral sensitization has been reported more than 50 years ago (Medawar 1958). In recent years, new studies have used mouse models lacking secondary lymphoid organs such as the *aly/aly*, $LT\alpha^{-/-}$ or $LT\beta R^{-/-}$ mice. Although mice described in these reports show similar phenotype; namely they lack some or all SLO, they yielded contradictory results. Conflicting results were still generated when using the same mouse model (*aly/aly*) but changing the combination of donor and recipient haplotypes or the source of the donor skin (Luo, Tanaka et al. 1999; Lakkis, Arakelov et al. 2000; Sugito, Koshinaga et al. 2005; Yamanokuchi, Ikai et al. 2005). Other evidences of peripheral sensitization are the generation of memory responses or xenograft rejection in absence of SLO (Chalasani, Dai et al. 2002; Tesar, Chalasani et al. 2004; Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno et al. 2006).

We have previously reported that T cell activation was first detected in skin grafts of TCR-transgenic Rag-1-deficient mice engrafted for the direct pathway, in contrast to the indirect pathway where sensitization occurred first in draining lymph nodes (Baratin, Bonin et al. 2004). These results strongly suggested that SLO were dispensable for the direct pathway. We further investigated this issue using a new model in which recipients lack SLO and $\alpha\beta$ T cells, enabling us to adoptively transfer our 2.102Tg T cells in these mice. Importantly, we confirmed that 2.102Tg T cells were naïve, both phenotypically and functionally (data not shown). Thus, our unique model is particular as it allows to

characterize both direct and indirect pathways independently using the same T cell clonotype in the same recipient mouse line, in absence of SLO. One limitation of our model may seem the high number of adoptively transferred alloreactive T cells. However, studies in the laboratory have shown that between three and ten millions of 2.10^2 T cells are able to conduct skin graft rejection without difference in rejection kinetics. Another concern may be the possibility of early homeostatic proliferation but almost no $CD4^+$ T cells incorporating BrdU were detected as soon as day 5 in blood and bone marrow. Taking advantage of this model, we have clearly demonstrated here that secondary lymphoid organs are not required to initiate skin graft rejection in either pathway, though they facilitate the rejection as we and others observed a delay in rejection kinetics in absence of SLO (Zhou, Hwang et al. 2003).

Multiple reports now demonstrate that T cell priming can occur outside secondary lymphoid organs (Lund, Partida-Sanchez et al. 2002; Feuerer, Beckhove et al. 2003; Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno et al. 2004; Klein and Crispe 2006; Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno et al. 2006). Actually, bone marrow has been shown to be a possible site of trafficking and priming of T cells and thus could act as a non classical secondary lymphoid organ (Tripp, Topham et al. 1997; Feuerer, Beckhove et al. 2003; Clay, Rodrigues et al. 2004; Di Rosa and Pabst 2005). Using a splenectomized alymphoblastic mice model where CFSE labelled OT-I or OT-II TCR transgenic T cells are adoptively transferred, Feuerer and al. have shown naïve T cells migration to the bone marrow, multicellular clusters formation with dendritic cells, prompt CD69 upregulation and clonal expansion following antigen stimulation with OVA peptide (Feuerer, Beckhove et al. 2003). These results are closely similar to our observations. Thus, it is likely that in

our model, bone marrow can serve as a substitute SLO, offering a semi organized area for classical antigen presentation of the indirect pathway leading to the induction of primary responses. Once activated, T cells residing in the bone marrow can migrate to skin graft via their expression of the chemokine receptor CXCR3 which is critical for directing T cells into mouse skin allograft (Tan and Zhou 2005). Indeed, CXCR3 mRNA was significantly upregulated in the graft at day 11 and 14 post-transplant in the indirect pathway, correlating with an increased in mRNA of its ligand CXCL9 (figure S4).

Once in the graft, T cell activation could take place in additional foci of lymphoid tissue called tertiary lymphoid organ. TLO are structures that resemble SLO with B-cell follicles and germinal centers, T-cell areas with dendritic cells and HEV but as opposed to SLO, they are not encapsulated permitting more rapid ingress of T cells and cytokines (Aloisi and Pujol-Borrell 2006; Motallebzadeh, Bolton et al. 2008). Induction of TLO in skin has been reported and recent studies have shown that TLO can generate effector T cells that can subsequently lead to skin graft rejection (Cupedo, Jansen et al. 2004; Nasr, Reel et al. 2007). In our study, we were able to show constant expression of LT β R mRNA in skin grafts, a receptor required for the induction of lymphoid tissue formation. Expression of other molecules important for TLO formation such CCL19 and lymphotoxins mRNA was also clearly shown in allografts. In addition, the detection of GlcNAc6-ST-2 mRNA, an enzyme expressed specifically in HEV lymph nodes, and the visualization of PNAd expressed on HEV indicated that these structures were found in allografts. Taken together, our data revealed that several key molecules implicated in lymphoid neogenesis were detected in allografts and that lymphoid structures formation

was visualized by confocal microscopy, although they were not organized with T cell-B cell compartments.

In conclusion, our results demonstrate that secondary lymphoid organs are not required for either pathways of rejection although rejection is facilitated in their presence. Activation of alloreactive T cells in the bone marrow, which acts like a secondary lymphoid organ in the indirect pathway, may help to activate T cells but T cells proliferating in the graft was also observed suggesting that bone marrow would not be essential. T cell activation and proliferation in allografts was observed in both pathways, which could be supported by lymphoid-like structures. Our future work aims at establishing the mechanisms of TLO formation and their importance for graft rejection in our model. As the contribution of TLO to graft rejection still remains unknown, in particular chronic rejection, better understanding of this phenomenon will help to develop new therapeutic strategies that can target more specifically allograft rejection.

Acknowledgements

This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research grant (MOP-66856) to C.D. and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds de la recherche en santé du Québec studentships to C.L. The authors are grateful to Paul M. Allen for providing most of the mouse strains used in this study. We would like to thank Yvon Lamontagne for care of the mouse colony, Penny-Ann Rudd and Veronika Von Messling for their help with immunofluorescence microscopy, and Alain Lamarre for critical reading of the manuscript.

References

1. Hall BM (1991) Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 51: 1141-1151.
2. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH (1990) The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 11: 83-88.
3. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Ochoa FS, James MJ, et al. (2004) A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 173: 4828-4837.
4. Gokmen MR, Lombardi G, Lechler RI (2008) The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 20: 568-574.
5. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y (2000) Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 6: 686-688.
6. Luo ZJ, Tanaka T, Kimura F, Miyasaka M (1999) Analysis of the mode of action of a novel immunosuppressant FTY720 in mice. *Immunopharmacology* 41: 199-207.
7. Sugito K, Koshinaga T, Inoue M, Ikeda T, Hagiwara N, et al. (2005) The effect of a novel immunosuppressant, FTY720, in mice without secondary lymphoid organs. *Surg Today* 35: 662-667.
8. Yamanokuchi S, Ikai I, Nishitai R, Matsushita T, Sugimoto S, et al. (2005) Asialo GM1 positive CD8+ T cells induce skin allograft rejection in the absence of the secondary lymphoid organs. *J Surg Res* 129: 57-63.
9. Zhou P, Hwang KW, Palucki D, Kim O, Newell KA, et al. (2003) Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses. *Am J Transplant* 3: 259-266.
10. Gelman AE, Li W, Richardson SB, Zinselmeyer BH, Lai J, et al. (2009) Cutting edge: Acute lung allograft rejection is independent of secondary lymphoid organs. *J Immunol* 182: 3969-3973.
11. Baratin M, Bonin K, Daniel C (2004) Frontline: Peripheral priming of alloreactive T cells by the direct pathway of allorecognition. *Eur J Immunol* 34: 3305-3314.
12. Sauve D, Baratin M, Leduc C, Bonin K, Daniel C (2004) Alloantibody production is regulated by CD4+ T cells' alloreactive pathway, rather than precursor frequency or Th1/Th2 differentiation. *Am J Transplant* 4: 1237-1245.
13. Futterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K (1998) The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9: 59-70.

14. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itoharu S, et al. (1992) Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 360: 225-231.
15. Grakoui A, Donermeyer DL, Kanagawa O, Murphy KM, Allen PM (1999) TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J Immunol* 162: 1923-1930.
16. Williams CB, Vidal K, Donermeyer D, Peterson DA, White JM, et al. (1998) In vivo expression of a TCR antagonist: T cells escape central tolerance but are antagonized in the periphery. *J Immunol* 161: 128-137.
17. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130-131, 134-138.
18. Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B (2010) PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res* 38: D792-799.
19. Daniel C, Horvath S, Allen PM (1998) A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 8: 543-552.
20. Tripp RA, Topham DJ, Watson SR, Doherty PC (1997) Bone marrow can function as a lymphoid organ during a primary immune response under conditions of disrupted lymphocyte trafficking. *J Immunol* 158: 3716-3720.
21. Feuerer M, Beckhove P, Garbi N, Mahnke Y, Limmer A, et al. (2003) Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med* 9: 1151-1157.
22. Aloisi F, Pujol-Borrell R (2006) Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 6: 205-217.
23. Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, Li Q, Ruddle NH, et al. (2005) Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am J Transplant* 5: 510-516.
24. Pabst R (2007) Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? *Immunol Lett* 112: 1-8.
25. Cupedo T, Jansen W, Kraal G, Mebius RE (2004) Induction of secondary and tertiary lymphoid structures in the skin. *Immunity* 21: 655-667.
26. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH (2006) Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* 7: 344-353.
27. Mebius RE (2003) Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 3: 292-303.

28. Bistrup A, Tsay D, Shenoy P, Singer MS, Bangia N, et al. (2004) Detection of a sulfotransferase (HEC-GlcNAc6ST) in high endothelial venules of lymph nodes and in high endothelial venule-like vessels within ectopic lymphoid aggregates: relationship to the MECA-79 epitope. *Am J Pathol* 164: 1635-1644.
29. Uchimura K, Rosen SD (2006) Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol* 27: 559-565.
30. Medawar PB (1958) The homograft reaction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 149: 145-166.
31. Tesar BM, Chalasani G, Smith-Diggs L, Baddoura FK, Lakkis FG, et al. (2004) Direct antigen presentation by a xenograft induces immunity independently of secondary lymphoid organs. *J Immunol* 173: 4377-4386.
32. Chalasani G, Dai Z, Konieczny BT, Baddoura FK, Lakkis FG (2002) Recall and propagation of allospecific memory T cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6175-6180.
33. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L, Kusser K, Tighe MP, et al. (2006) Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs. *Immunity* 25: 643-654.
34. Lund FE, Partida-Sanchez S, Lee BO, Kusser KL, Hartson L, et al. (2002) Lymphotoxin-alpha-deficient mice make delayed, but effective, T and B cell responses to influenza. *J Immunol* 169: 5236-5243.
35. Klein I, Crispe IN (2006) Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver. *J Exp Med* 203: 437-447.
36. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, et al. (2004) Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med* 10: 927-934.
37. Di Rosa F, Pabst R (2005) The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol* 26: 360-366.
38. Clay CC, Rodrigues DS, Brignolo LL, Spinner A, Tarara RP, et al. (2004) Chemokine networks and in vivo T-lymphocyte trafficking in nonhuman primates. *J Immunol Methods* 293: 23-42.
39. Tan J, Zhou G (2005) Chemokine receptors and transplantation. *Cell Mol Immunol* 2: 343-349.
40. Motallebzadeh R, Bolton EM, Pettigrew GJ (2008) Lymphoid tissue formation in allografts: innocent until proven guilty. *Transplantation* 85: 309-311.

41. Nasr IW, Reel M, Oberbarnscheidt MH, Mounzer RH, Baddoura FK, et al. (2007) Tertiary lymphoid tissues generate effector and memory T cells that lead to allograft rejection. *Am J Transplant* 7: 1071-1079.

FIGURE LEGENDS

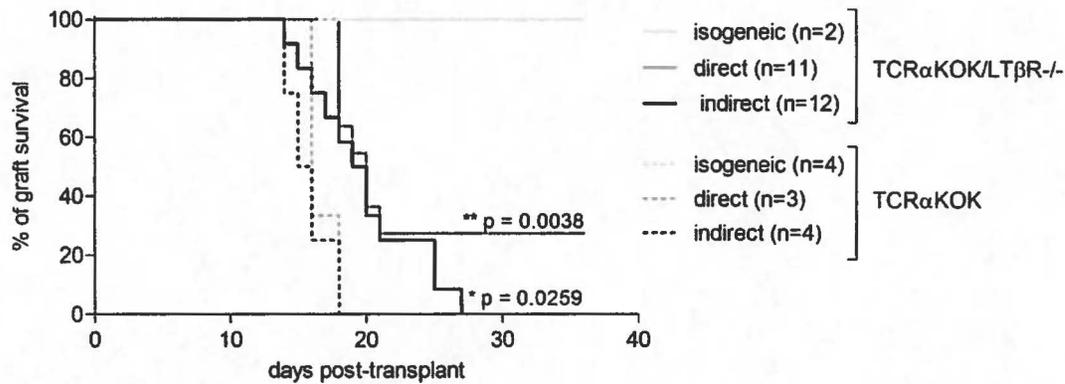


Figure 1: Mice without secondary lymphoid organs reject their graft by both pathways of rejection.

Ten million CD4⁺ T cells isolated from 2.102Tg mice were adoptively transferred i.v. into TCR α KOK (dashed lines) or splenectomized TCR α KOK LT β R^{-/-} (full lines) recipients. Skin graft from donors for direct (dark gray), indirect (black) or isogeneic (pale gray) pathway were placed onto the back of recipient one day after the cell adoptive transfer. Allografts were considered fully rejected when over 90% of shrinkage or necrosis was observed. Statistical analyses were performed with the Kaplan-Meier/log rank test.

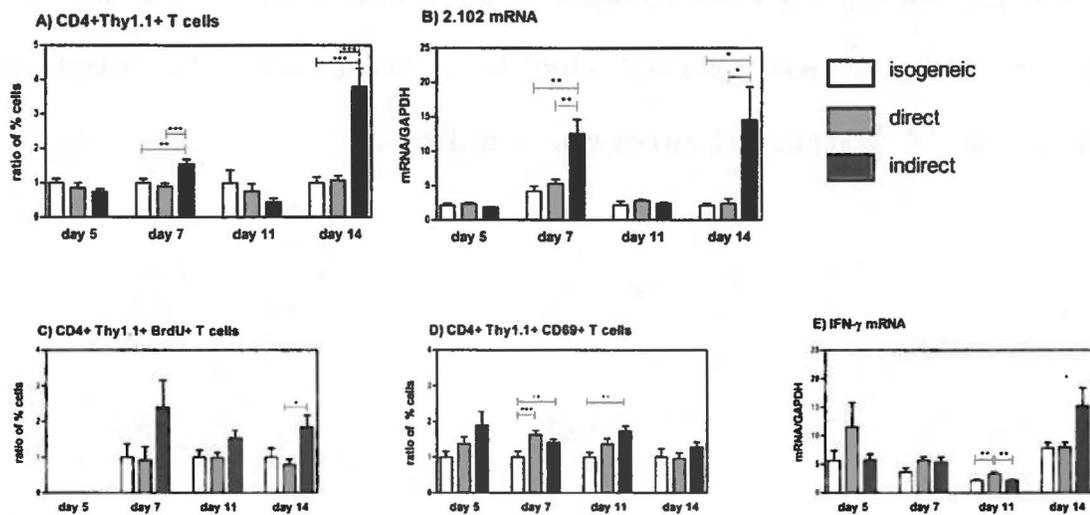


Figure 2: Bone marrow is a site of activation for CD4⁺ T cells in the indirect pathway.

Splenectomized TCR α KOK LT β R^{-/-} were adoptively reconstituted with ten million CD4⁺ T cells isolated from 2.102Tg mice and grafted with skin from isogenic donors (white) or allogeneic donors by direct (gray) or indirect (black) pathway. Two and four hours before sacrifice, mice were injected ip with 0,5 mg of BrdU. Bone marrow cells were collected at day 5, 7, 11 and 14 for analyses by flow cytometry for the expression of CD4 and Thy1.1 markers (A), BrdU incorporation (C), CD69 (D) or by qRT-PCR for the expression 2.102TCRB (B) or IFN- γ (E) mRNA. For FACS analyses, the percentage of positive cells in each pathway was normalized to the mean percentage of positive cells in the isogenic pathway at corresponding time-points. For qRT-PCR analyses, fold changes in gene expression levels are relative to level observed in ungrafted skin of each respective pathway and calibrated with the housekeeping gene GAPDH (n = 3 to 7). The number of mice used for each group was above 10 for all experiments, except for BrdU

incorporation where it was between 3 and 6. Flow cytometry and qRT-PCR analyses were compared using a one-way ANOVA test. When significant, a Bonferroni correction was performed for comparison between experimental groups.

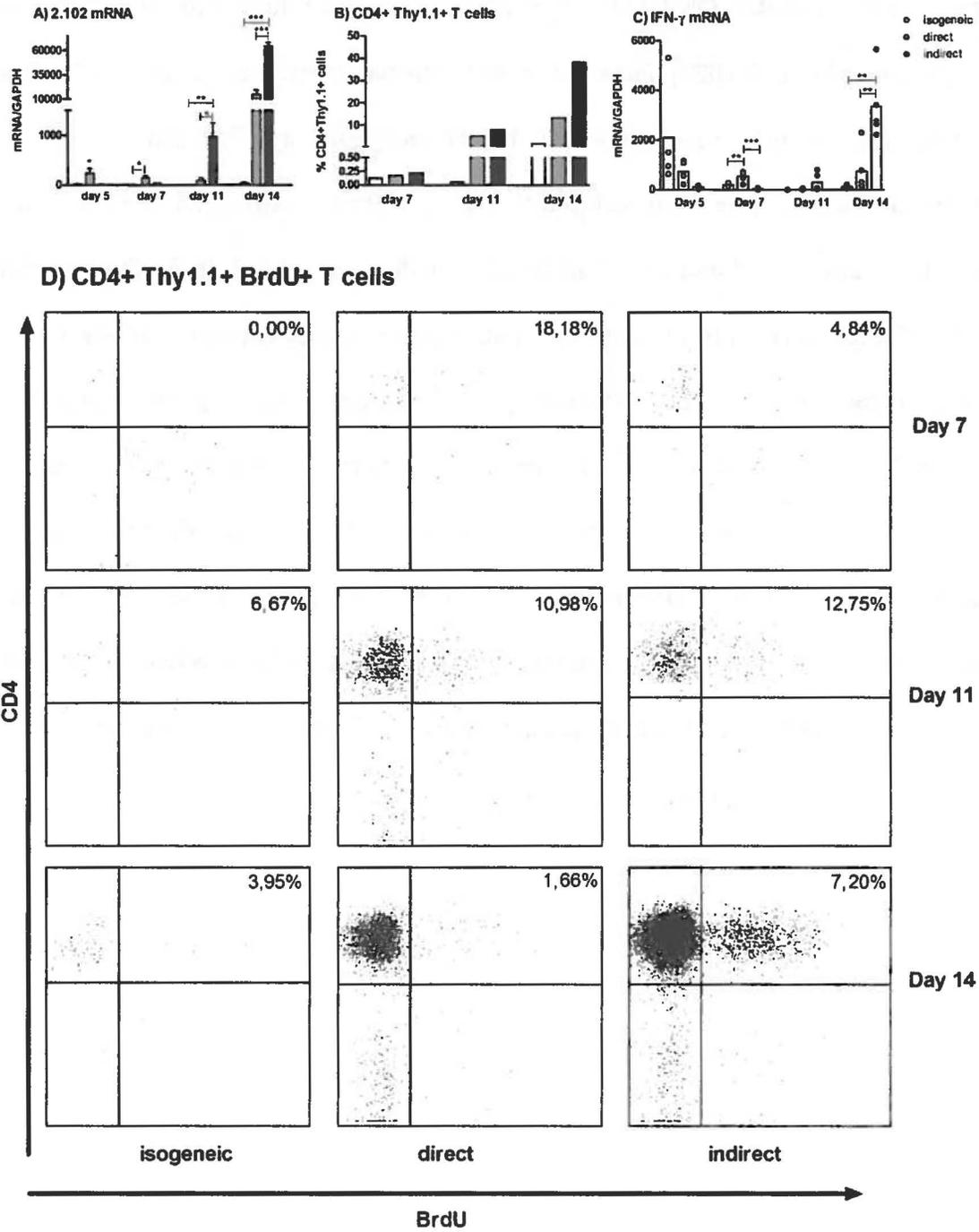
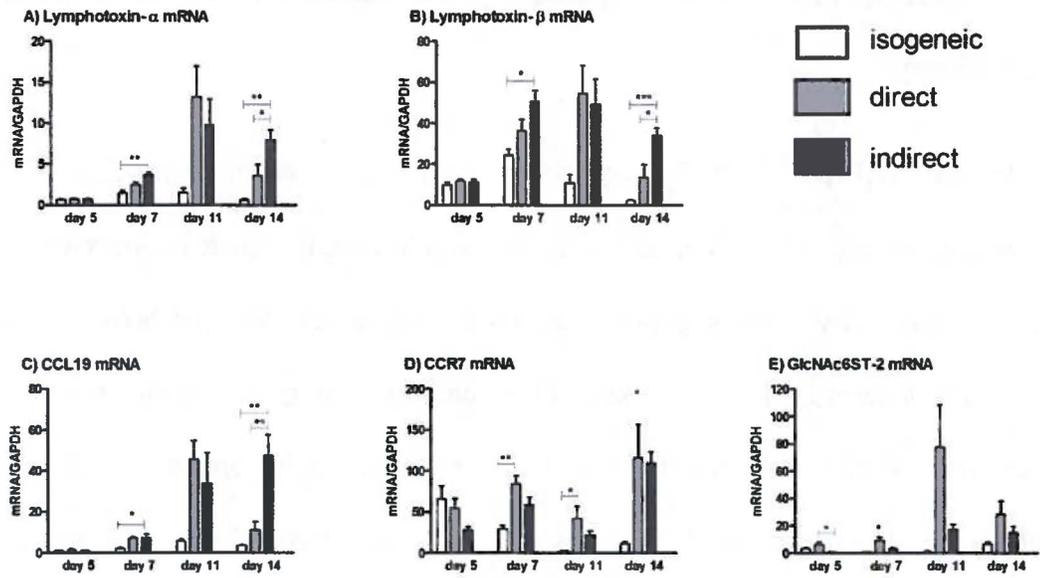
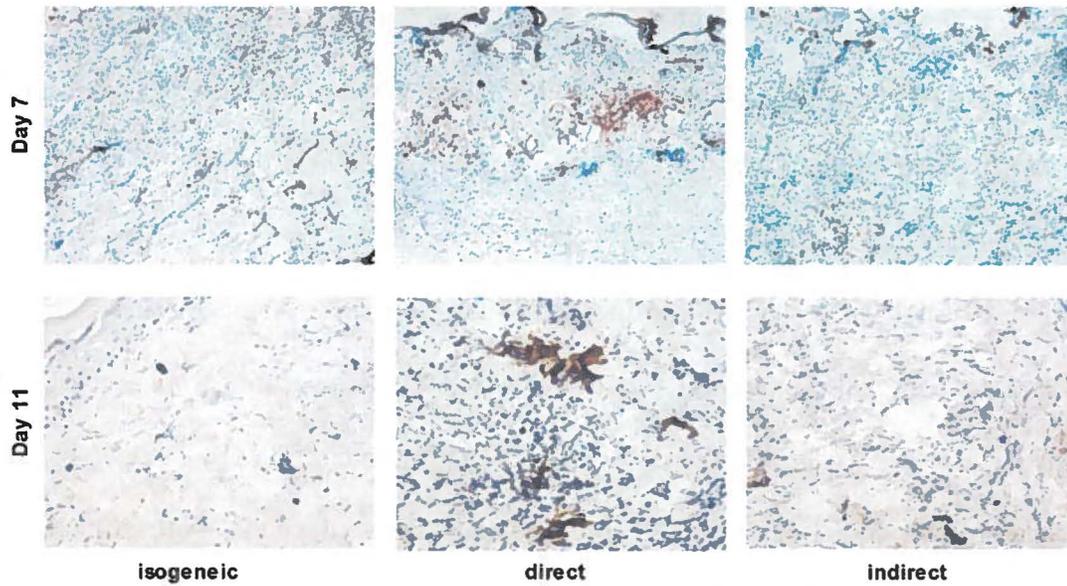


Figure 3: CD4+ T cells are activated and proliferate in the graft in the direct pathway.

Splenectomized TCR α KOK LT β R^{-/-} were adoptively reconstituted with ten million CD4⁺ T cells isolated from 2.102Tg mice and grafted with skin from isogenic donors (white) or allogeneic donors by direct (gray) or indirect (black) pathway. Two and four hours before sacrifice, mice were injected ip with 0,5 mg of BrdU. Skin grafts (n = 3 to 5) were collected at day 5, 7, 11 and 14 and analyzed individually by qRT-PCR for the expression of 2.102TCRB (A) or IFN- γ (C) mRNA. Fold changes in gene expression levels are relative to level observed in ungrafted skin of each respective pathway and calibrated with the housekeeping gene GAPDH. For flow cytometry analyses, skin grafts were collected at day 7, 11 and 14, then cells were isolated and pooled according to each pathway (n = 4 to 7), and further analyzed for the expression of CD4 and Thy1.1 (B) and incorporation of BrdU (D). Flow cytometry and qRT-PCR analyses were compared using a one-way ANOVA test. When significant, a Bonferroni correction was performed for comparison between experimental groups.



F) PNA_d in graft



G) PNA_d (red) and Thy 1.1 (green) in graft

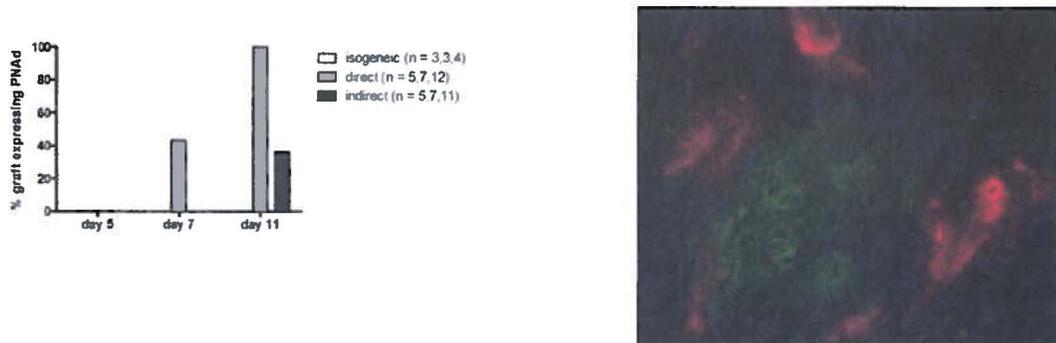


Figure 4: Molecules important in lymphoid organ formation are observed in grafts of both pathways.

Splenectomized TCR α KOK LT β R $^{-/-}$ were adoptively reconstituted with ten million CD4 $^{+}$ T cells isolated from 2.102Tg mice and grafted with skin from isogenic donors (white) or allogeneic donors by direct (gray) or indirect (black) pathway. Skin grafts (n= 3 to 12) were collected at day 5, 7, 11 and 14. qRT-PCR analyses using gene-specific primers were performed to determine expression of: lymphotoxin- α (A), lymphotoxin- β (B), CCL19 (C), CCR7 (D) and N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase-2 (E). Fold changes in gene expression levels are relative to level observed in ungrafted skin of each respective pathway and calibrated with the housekeeping gene GAPDH. Real-time PCR analyses were compared using a one-way ANOVA test. When significant, a Bonferroni correction was performed for comparison between experimental groups. For immunohistochemistry analyses (F), cryosections were stained with biotinylated anti-PNAd (or biotinylated rat IgM as isotypic control, data not shown) and counterstained with hematoxylin. For immunofluorescence analyses (G), cryosections were stained with biotinylated anti-PNAd and anti-Thy1.1 FITC (or biotinylated rat IgM and mouse IgG2a FITC as isotypic controls, data not shown). The reaction was developed with streptavidin Alexa Fluor 568 (red) and anti-FITC Alexa Fluor 488 (green). Nuclei were counterstained with DAPI.

Table 1: List of specific primers used for qRT-PCR

genes	Forward / reverse primers	Gene bank Accession number	Primer bank IDs
2.102 TCR β chain (SIGMA)	5'-CAA CAT CTG GGA CAT AAT GC-3' 5'-CAG CTG AGT CTT CTG GAT CC-3'		
CCL19	5'-GTC GGT TCT CTG GAC CTT CC-3' 5'-GCT GAT AGC CCC TTA GTG TGG-3'	NM_011888	
CCL21	5'-GCA GTC ATG GAG GGG GTC AC-3' 5'-CGG GGT GAG AAC AGG ATT GC-3'	NM_011124	
CCR7 (SIGMA)	5'-CTG CTA CCT CAT TAT CAT CCG TAC CT-3' 5'-TGA TCA CCT TGA TGG CCT TGT-3'	NM_007719	
CXCL13	5'-GGC CAC GGT ATT CTG GAA GC-3' 5'-GGG CGT AAC TTG AAT CCG ATC TA-3'	NM_018866	9256521a1
GlcNAc6ST-2	5'-GTC TTT GAT GCC TAC ATG AAC CC-3' 5'-GTG GGC AGG GAA GAA GTC A-3'	NM_011998	31982528a3
IFN- γ	5'-ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC-3' 5'-CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC-3'	NM_008337	33468859a1
Lymphotoxin- α	5'-GTG CCT TTC TCC GAC ATG G-3' 5'-GGT AGA TGG GAG TGG GAA TGG-3'	NM_010735	7106343a1
Lymphotoxin- β	5'-AAG ACT GGA TGA CAG CAA ACC-3' 5'-CCT GGA AGC ATT GGA TCT CTG-3'	NM_008518	6678730a2
GAPDH	5'-TCA CCA CCA TGG AGA AGG C-3' 5'-GCT AAG CAG TTG GTG GTG CA-3'	NM_008084	

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

Les figures présentées dans cette section sont des figures qui ne sont pas montrées dans l'article deux, mais auxquelles l'article fait référence en tant que « data not shown ». Pour les besoins de la thèse, l'article a été légèrement modifié pour insérer les références de ces figures supplémentaires.

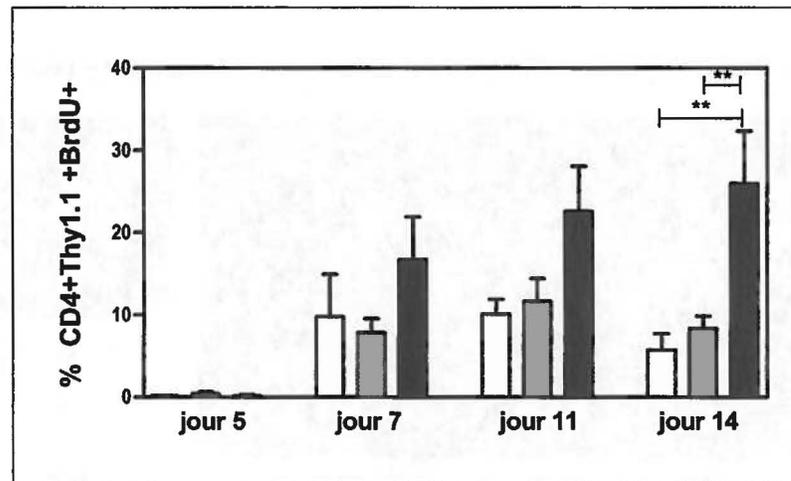


Figure S1 : Les cellules T CD4+ sont en prolifération dans le sang dans la voie indirecte.

Dix millions de lymphocytes T CD4+ purifiés de souris 2.102 Tg ont été transférés dans les souris receveuses TCR α KOK/LT β R^{-/-} qui ont été greffées pour la voie isogénique (blanc), directe (gris) ou indirecte (noir). Le sang a été récolté aux jours 5, 7, 11 et 14. Deux et quatre heures avant le sacrifice, les souris ont été injectées avec 0,5 mg de BrdU. Les cellules ont été marquées pour la présence de CD4+, Thy 1.1+ et l'incorporation de BrdU puis analysées en cytométrie en flux. Les analyses statistiques des résultats de cytométrie ont été réalisées en utilisant un test ANOVA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. (*p \leq 0,05 **p \leq 0,01 ***p \leq 0,005). n = 3 à 6.

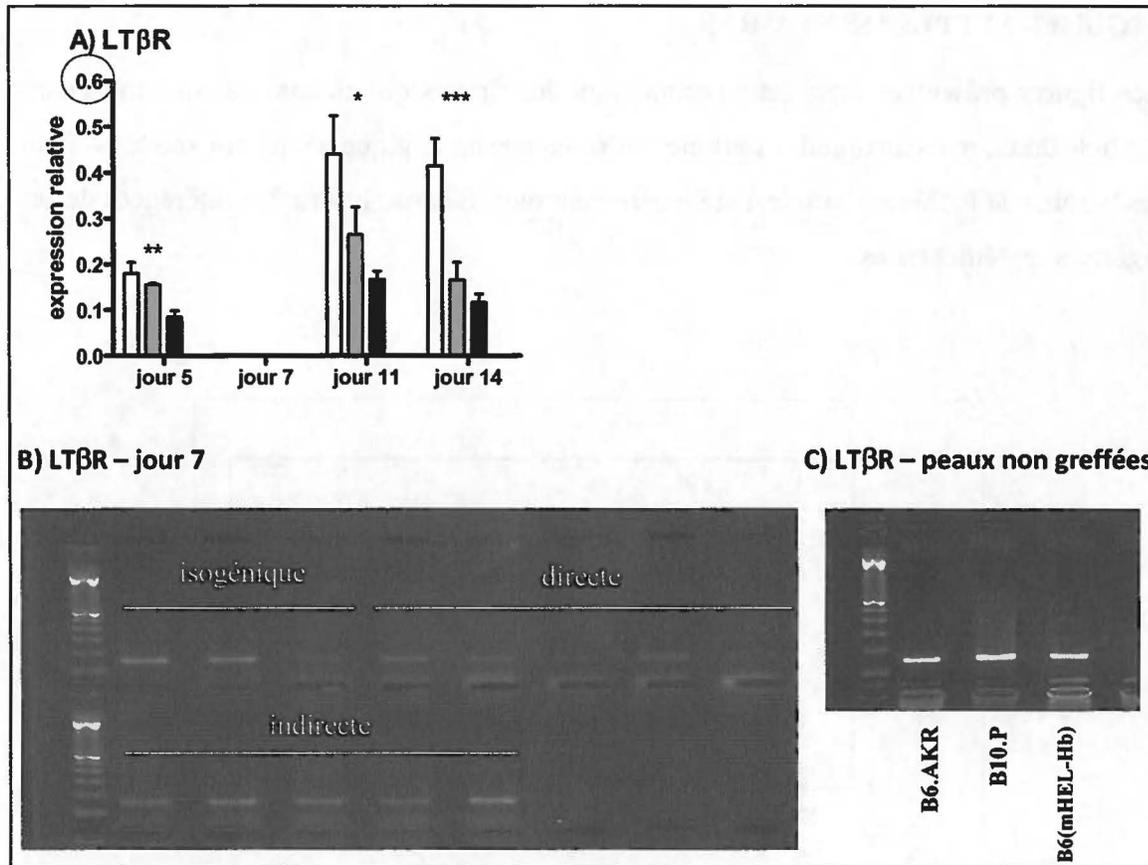


Figure S2 : L'expression du transcrite du récepteur de la lymphotoxine bêta (LTβR) est maintenue dans la greffe au moins pendant 14 jours suivant la transplantation.

Dix millions de lymphocytes T CD4+ purifiés de souris 2.102 Tg ont été transférés dans les souris receveuses TCRαKOK/LTβR^{-/-} qui ont été greffées pour la voie isogénique (blanc), directe (gris) ou indirecte (noir). Les greffons ont été récoltés aux jours 5, 7, 11 et 14. Des analyses de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant les amorces spécifiques (LTβR(+)
5'- GCC AAG CCT GTT CCT CTT CC-3' LTβR(-)
5'- GGC TCC AGG AAC ACA TGG TC-3') pour déterminer l'expression génique de (A) LTβR. Le niveau d'expression des gènes est relatif au niveau des gènes exprimés dans la peau non greffée de chacune des voies respectivement et calibré avec le gène rapporteur GAPDH. L'ADNc a été utilisé par PCR qualitatif avec les mêmes amorces au jour 7 avec des peaux transplantées (B) ou avec des peaux témoins non greffées (C). Les analyses statistiques des résultats de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant un test ANOVA. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. (* p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,01 *** p ≤ 0,005). n = 3 à 5.

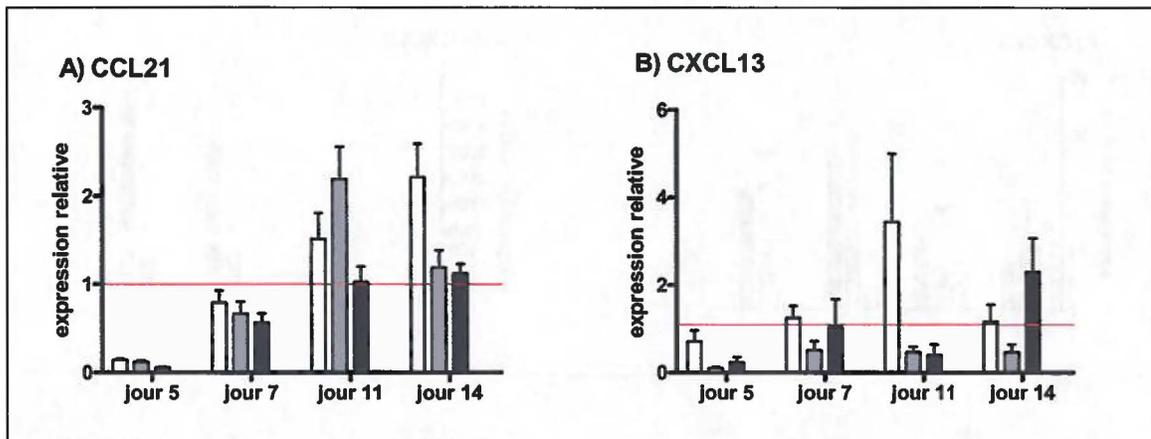


Figure S3 : L'expression du transcrite des chimiokines CCL21 et CXCL13 n'est pas modulée à la hausse de façon significative dans les greffons.

Dix millions de lymphocytes T CD4⁺ purifiés de souris 2.102 Tg ont été transférés dans les souris receveuses TCR α KOK/LT β R^{-/-} qui ont été greffées pour la voie isogénique (blanc), directe (gris) ou indirecte (noir). Les greffons ont été récoltés aux jours 5, 7, 11 et 14. Des analyses de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant les amorces spécifiques (CCL21(+) 5'-GCA GTC ATG GAG GGG GTC AC-3' CCL21(-) 5'-CGG GGT GAG AAC AGG ATT GC-3' et CXCL13(+) 5'-GGC CAC GGT ATT CTG GAA GC-3' CXCL13 (-) 5'-GGG CGT AAC TTG AAT CCG ATC TA-3') pour déterminer l'expression génique de (A) CCL21 et (B) CXCL13. Le niveau d'expression des gènes est relatif au niveau des gènes exprimés dans la peau non greffée de chacune des voies respectivement et calibré avec le gène rapporteur GAPDH. Les analyses statistiques des résultats de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant un test ANOVA. n = 3 à 5.

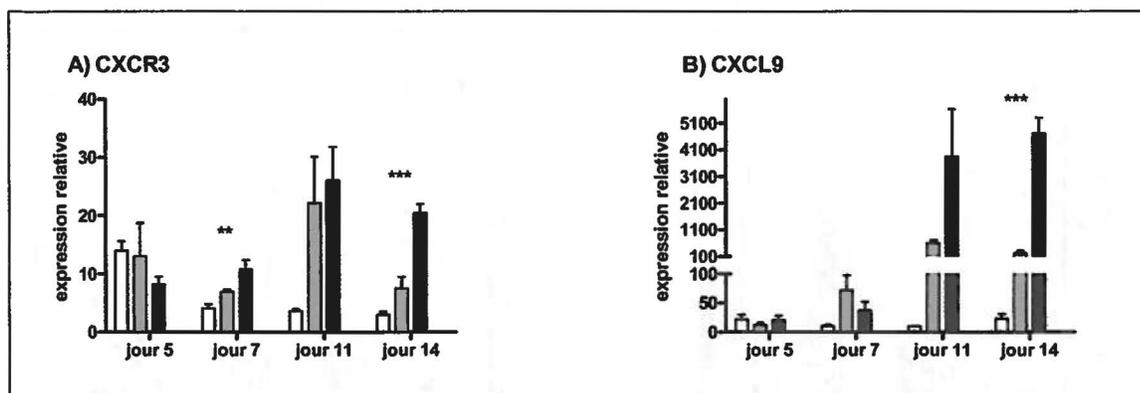


Figure S4 : Le transcrit du récepteur de la chimiokine CXCR3 et de son ligand (CXCL9) sont exprimés fortement dans les greffons de la voie indirecte aux temps plus tardifs.

Dix millions de lymphocytes T CD4⁺ purifiés de souris 2.102 Tg ont été transférés dans les souris receveuses TCR α KOK/LT β R^{-/-} qui ont été greffées pour la voie isogénique (blanc), directe (gris) ou indirecte (noir). Les greffons ont été récoltés aux jours 5, 7, 11 et 14. Des analyses de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant les amorces spécifiques (CXCR3(+)) 5'-TGT AGT TGG GCT AGC TCG AAC TT-3' CXCR3(-) 5'-ACC TGG ATA TAT GCT GAG CTG TCA-3' et CXCL9(+)) 5'- CTT CCT GGA GCA GTG TGG AG-3' CXCL9(-) 5'-CGA CTT TGG GGT GTT TTG G-3') pour déterminer l'expression génique de (A) CXCR3 et (B) CXCL9. Le niveau d'expression des gènes est relatif au niveau des gènes exprimés dans la peau non greffée de chacune des voies respectivement et calibré avec le gène rapporteur GAPDH. Les analyses statistiques des résultats de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant un test ANOVA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. (* p \leq 0,05 ** p \leq 0,01 *** p \leq 0,005). n = 3 à 5.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

1. Introduction

Les résultats présentés dans cette section font suite aux travaux sur la détermination du site d'activation des lymphocytes T dans le cadre d'une greffe, c'est-à-dire le deuxième objectif de mon projet de recherche. Ces premiers travaux nous ont permis d'observer une différence au niveau du site d'activation des cellules T effectrices lors du rejet pour les deux voies d'alloréactivité. Ils ont aussi permis d'observer la formation de structures lymphoïdes. Comme le rejet de greffe est un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs populations cellulaires, nous avons ensuite caractérisé les populations cellulaires présentes dans les greffons rejetés afin de déterminer si d'autres cellules que les lymphocytes T CD4+ participent au rejet de greffe et si les cellules impliquées dans le rejet sont les mêmes dans les deux voies d'alloréactivité.

Les expériences ont été réalisées suivant les mêmes méthodes telles que décrites dans l'article : Formation of Lymphoid Structures in Skin Allografts Following Direct or Indirect Pathways Alloreactivity. Je décrirai donc sommairement les méthodes utilisées dans la légende de chacune des figures ainsi que le nouveau matériel utilisé. Pour plus de détails, veuillez vous référer à la section « matériels and methods » de l'article.

2. Résultats / discussion

2.1 Les neutrophiles semblent impliqués dans le rejet dans la voie directe.

Afin de caractériser les mécanismes impliqués dans le rejet de greffe, nous avons investigué l'expression de différentes cytokines, chimiokines et marqueurs moléculaires par PCR en temps réel. Lors de notre recherche, nous avons observé une grande augmentation de l'expression du transcrit de la chimiokine CXCL2 dans la voie directe dès le cinquième jour suivant la transplantation et cette augmentation s'atténue dans le temps (figure C1A). Cette chimiokine étant impliquée dans la migration des neutrophiles,

nous avons investigué la présence des neutrophiles par l'expression du transcrite d'un gène spécifiquement exprimé dans cette population, le Ly-6G (Kobayashi 2008). Nous avons observé que son expression corrèle avec celle de la chimiokine CXCL2, c'est-à-dire qu'il y a une hausse significative de l'expression du transcrite dans la voie directe dès le cinquième jour et cette hausse s'atténue avec le temps (figure C1B). Nous avons confirmé ces résultats par des marquages immunohistochimiques qui démontrent aussi une infiltration plus importante de neutrophiles dans les greffons de la voie directe aux jours 7 et 11 (figure C1C). Bien que les transcrits de CXCL2 et Ly-6G soient détectés dès le cinquième jour par qRT-PCR, aucune infiltration n'a été détectée dans les greffons à ce temps précoce par immunohistochimie. Cette différence peut être due à la sensibilité des deux méthodes. Le qRT-PCR détermine l'expression du transcrite à l'intérieur d'un échantillon représentant le greffon total alors que l'immunohistochimie détecte la présence cellulaire de neutrophiles dans quelques coupes du greffon. Finalement, les greffons au jour 14 n'ont pas pu être analysés par immunohistochimie, car la destruction du greffon initiée par le rejet était trop importante et rendait le montage sur lame microscopique trop difficile.

Même si dans la greffe de peau, il n'y a pas de phénomène d'ischémie et reperfusion, les tissus subissent des dommages induits par la chirurgie et ceci entraîne la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF- α . Ces cytokines stimulent les cellules endothéliales à produire des chimiokines telles que CXCL1, CXCL2 et CXCL8 qui attirent les neutrophiles. Il a été démontré que les neutrophiles ont un rôle à jouer dans le cadre de la transplantation. Les neutrophiles peuvent participer à l'inflammation en sécrétant plus de cytokines inflammatoires, mais ils peuvent aussi servir de cellules présentatrices d'antigène afin d'initier une réponse adaptative (Buonocore, Surquin et al. 2004; Culshaw, Millington et al. 2008; Muller, Munder et al. 2009). D'ailleurs, certaines études ont montré que la présence de cytokines telles que le G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-8, IL-1 β , IL-4 et le TNF- α retardent la mort cellulaire du neutrophile et l'aident à se différencier en une cellule présentatrice d'antigène avec l'induction de l'expression de CMH de classe II et de molécules de costimulation (Chakravarti, Allaeyes et al. 2007). Dans notre modèle, l'IFN- γ est significativement augmenté dans la voie directe ce qui suggère que l'IFN- γ pourrait contribuer à activer les

neutrophiles qui pourraient à leur tour participer à l'activation des lymphocytes T dans le greffon. Des études fonctionnelles seraient nécessaires pour déterminer de façon non équivoque le rôle des neutrophiles dans l'activation des lymphocytes. Pour l'instant, nos preuves ne sont que circonstancielles.

2.2 Les macrophages infiltrent les greffons de façon plus importante dans la voie indirecte.

Nous avons observé précédemment que les neutrophiles sont particulièrement présents dans les allogreffes de la voie directe, mais peu présents dans la voie indirecte. Dans la voie indirecte, l'infiltration cellulaire semble se limiter à la présence des macrophages. En effet, le transcrite de la chimiokine CXCL2 et de Ly-6G ne sont pas ou peu exprimés dans cette voie (figure C1A et C1B). On retrouve plutôt en grande quantité, les transcrits de l'IL-1 β et du TNF- α , des chimiokines inflammatoires qui participent aussi à l'activation des macrophages (figure C2A et C2B). D'ailleurs, des marquages immunohistochimiques des greffons aux jours 7 et 11 démontrent cette infiltration par les macrophages dans la voie indirecte. Par contre, la présence de macrophages est aussi détectée dans la voie directe à un degré moindre. Ceci n'est pas très surprenant, car il est bien connu que les macrophages et les lymphocytes T soient les cellules qui infiltrent majoritairement le greffon lors d'un rejet aigu via une réponse semblable à l'hypersensibilité de type retardé (DTH), dans la voie directe ou indirecte (Wyburn, Jose et al. 2005).

2.3 Résumé

Nos résultats portent à penser que les neutrophiles participent à l'activation précoce des lymphocytes T dans la voie directe. Par contre, les méthodes utilisées ne nous renseignent pas sur le rôle des neutrophiles dans la greffe. Des analyses en cytométrie devraient être faites pour vérifier s'ils sécrètent des cytokines ou encore, s'ils présentent des antigènes. Par ailleurs, une contribution par les cellules NK dans l'initiation des

réponses immunitaires n'est pas à exclure. En effet, en se servant du transcrite de leur récepteur activateurs NKp46, ces cellules sont détectées de façon hâtive (jour 5) dans les greffons de la voie directe (figure C3). Toutefois, la présence du transcrite de NKp46 dans les greffons isogéniques rend l'interprétation des données plus difficile. Néanmoins, l'expression du transcrite de NKp46 et celle du transcrite de l'IFN- γ au jour 5 corrèle parfaitement, suggérant que les cellules NK pourraient sécréter cette cytokine dans le greffe. Ces preuves ne sont que circonstancielles, des études immunohistochimiques devraient être réalisées pour confirmer la présence des cellules NK dans les greffes ou des études en cytométrie en flux avec un marquage intracellulaire pourrait confirmer la présence et la sécrétion d'IFN- γ de ces cellules.

Dans la voie indirecte, les lymphocytes T infiltrant le greffon semblent seulement aidés par les macrophages pour induire un rejet de façon semblable à une réaction d'hypersensibilité de type retardé. Dans certains modèles en absence de lymphocytes T CD8+ et en présence d'IL-4, les éosinophiles peuvent avoir un rôle à jouer. Dans notre modèle, la présence du transcrite de l'IL-4 a été évaluée par qRT-PCR, mais son expression n'est pas régulée à la hausse de façon significative. La présence directe d'éosinophiles n'est pas facile à détectée puisqu'il n'existe pas de marqueur cellulaire spécifique mise à part leur coloration en coupe histologique. La présence du transcrite de la chimiokine CCL11, qui attire les éosinophiles, a été recherchée, mais aucune modulation n'a été observée laissant suggérer que les éosinophiles ne sont pas attirés dans les greffons. Finalement, il serait intéressant de caractériser les populations cellulaires présentes à des jours plus hâtifs, par exemple aux jours 1 et 3, afin de déterminer dès les premiers jours les mécanismes impliqués dans l'initiation de la réponse inflammatoire qui précède l'arrivée des lymphocytes T dans le but de comprendre la séquence d'événements qui pourrait conduire à une éventuelle formation de tissus lymphoïdes ectopiques.

3. Figures complémentaires

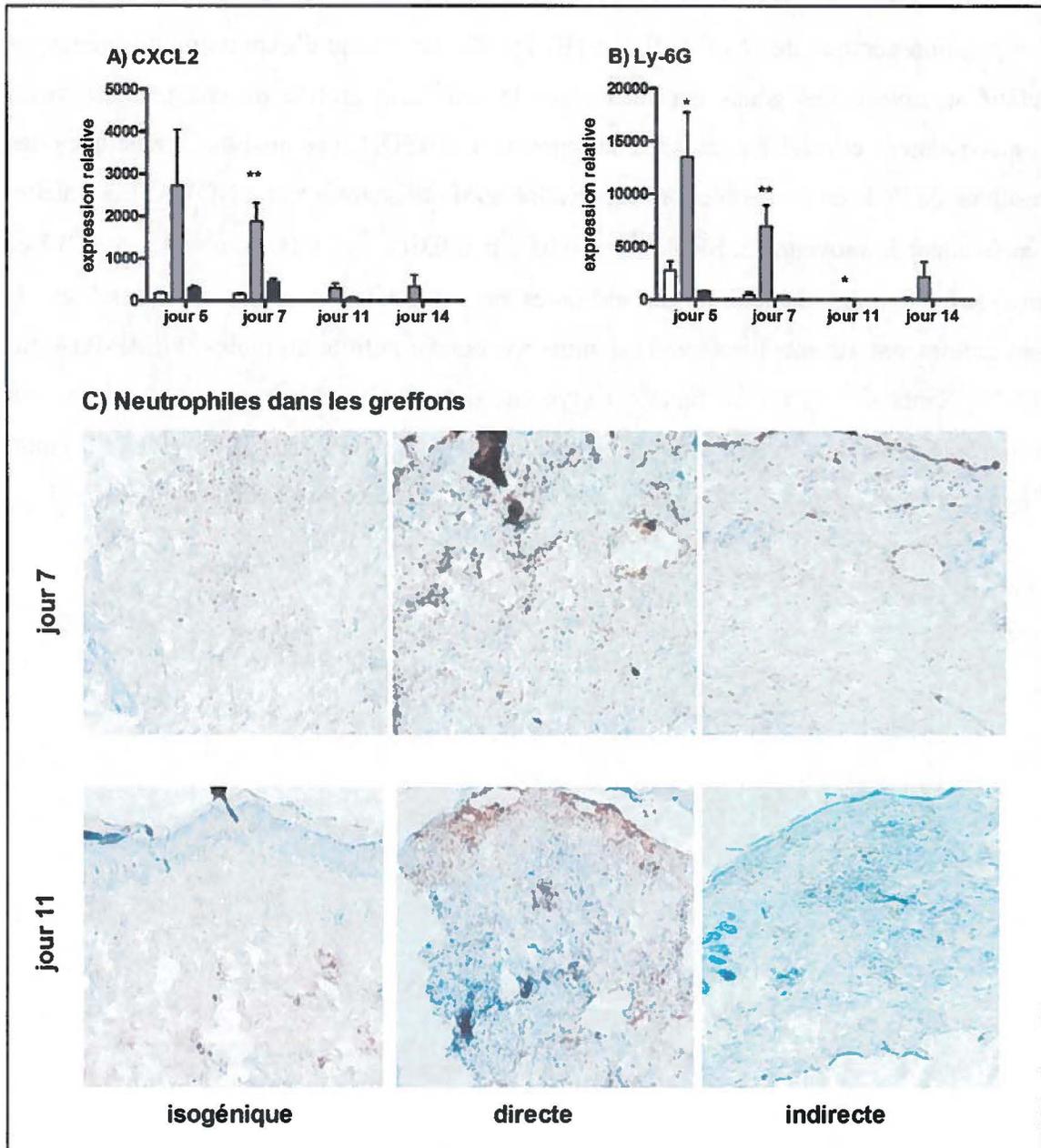


Figure C1 : Les neutrophiles infiltrent le greffon dans la voie directe.

Dix millions de lymphocytes T CD4⁺ purifiés de souris 2.102 Tg ont été transférés dans les souris receveuses TCR α KOK/LT β R^{-/-} qui ont été greffées pour la voie isogénique (blanc), directe (gris) ou indirecte (noir). Les greffons ont été récoltés aux jours 5, 7, 11 et 14. Des analyses de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant les amorces spécifiques (CXCL2 (+) 5'-CCA ACC ACC AGG CTAB CAG G-3' CXCL2(-) 5'-GCG

TCA CAC TCA AGC TCT G-3' et Ly-6G(+) 5'-TGG ACT CTC ACA GAA GCA AAG-3' Ly-6G(-) 5'-GCA GAG GTC TTC CTT CCA ACA-3') pour déterminer l'expression génique de (A) CXCL2 et (B) Ly-6G. Le niveau d'expression des gènes est relatif au niveau des gènes exprimés dans la peau non greffée de chacune des voies respectivement et calibré avec le gène rapporteur GAPDH. Les analyses statistiques des résultats de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant un test ANOVA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. (* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,005$). n = 3 à 5. (C) Les analyses d'immunohistochimie ont été faites sur les greffons récoltés aux jours 7 et 11. Les coupes ont été incubées avec un anticorps purifié anti-neutrophiles (NIMP-R14, rat IgG2b, Santa Cruz) ou un témoin isotypique (rat IgG2b, ebiosciences) (données non montrées). La réaction a été révélée avec un anti-rat IgG peroxydase (IgG de lapin, Sigma) et le substrat DAB. Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline. N = 3

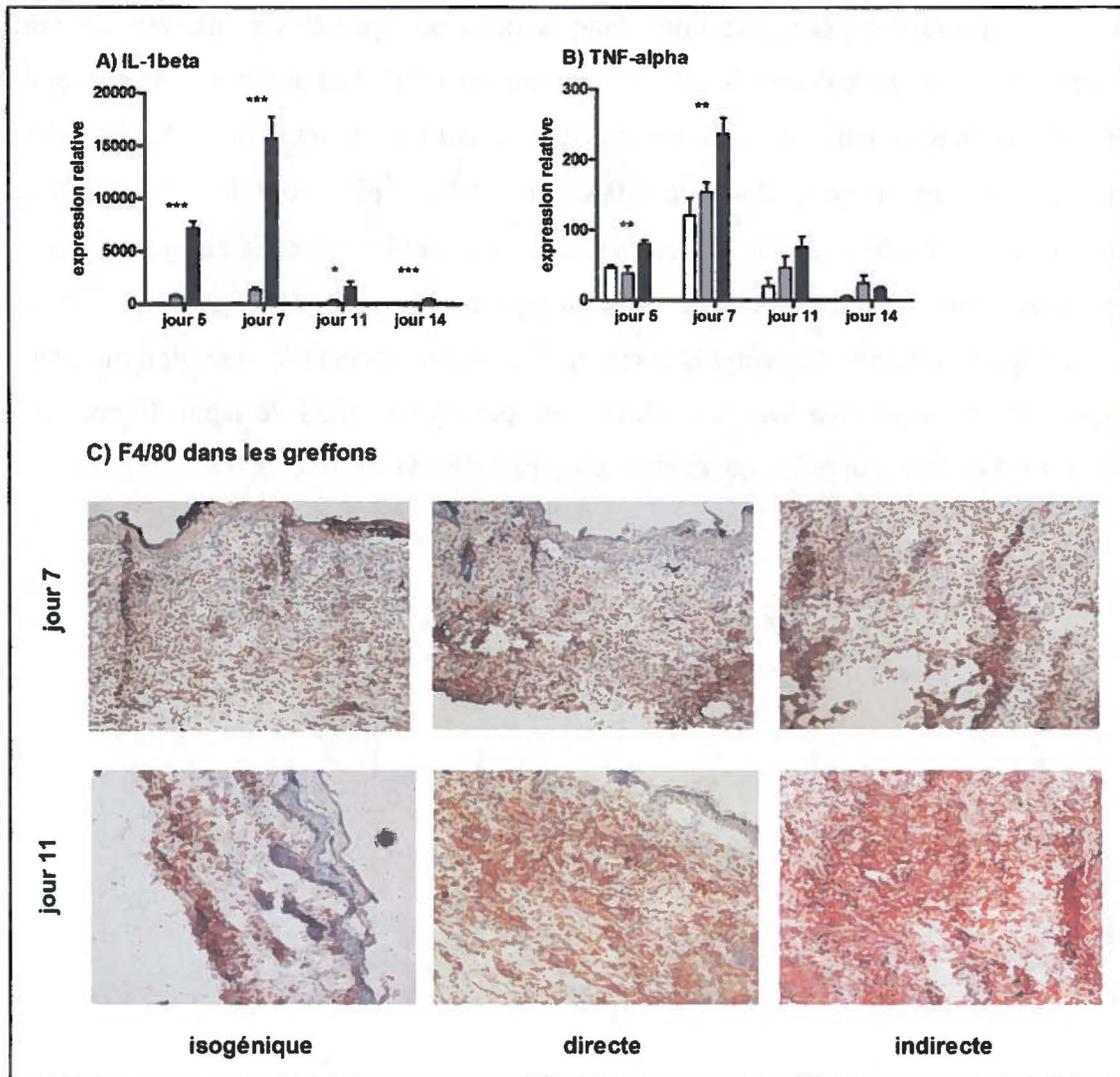


Figure C2 : Les macrophages infiltrent énormément le greffon, particulièrement dans la voie indirecte au jour 11.

Dix millions de lymphocytes T CD4⁺ purifiés de souris 2.102 Tg ont été transférés dans les souris receveuses TCR α KOK/LT β R^{-/-} qui ont été greffées pour la voie isogénique (blanc), directe (gris) ou indirecte (noir). Les greffons ont été récoltés aux jours 5, 7, 11 et 14. Des analyses de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant les amorces spécifiques (IL-1 β (+) 5'GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T-3' IL-1 β (-) 5'-ATC TTT TGG GGT CCG TCA ACT-3' et TNF- α (+) 5'-CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT-3' TNF- α (-) 5'-GCT ACG ACG TGG GCT ACA G-3') pour déterminer l'expression génique de (A) IL-1 β et (B) TNF- α . Le niveau d'expression des gènes est

relatif au niveau des gènes exprimés dans la peau non greffée de chacune des voies respectivement et calibré avec le gène rapporteur GAPDH. Les analyses statistiques des résultats de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant un test ANOVA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. (* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,005$). n = 3 à 5. (C) Les analyses d'immunohistochimie ont été faites sur les greffons récoltés aux jours 7 et 11. Les coupes ont été incubées avec un anticorps purifié anti-F4/80 (BM8, rat IgG2a, ebiosciences) ou un témoin isotypique (rat IgG2a, ebiosciences) (données non montrées). La réaction a été révélée avec un anti-rat IgG peroxydase (IgG de lapin, Sigma) et le substrat DAB. Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline. N = 3

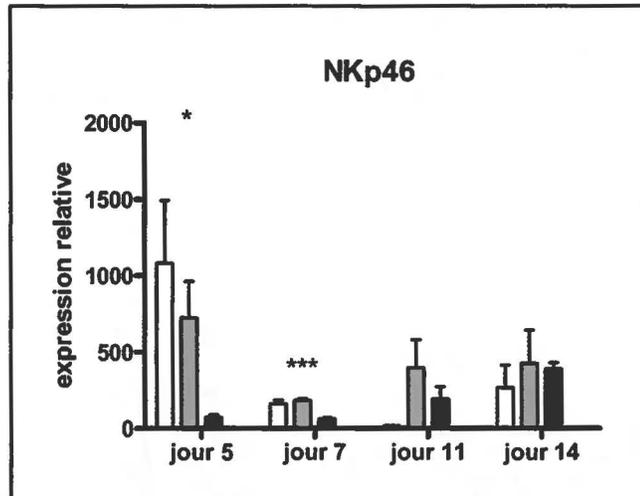


Figure C3 : Le transcrit de NKp46, un marqueur de cellules NK, est exprimé à la hausse dans les greffons isogéniques et les greffons de la voie directe au jour 5.

Dix millions de lymphocytes T CD4⁺ purifiés de souris 2.102 Tg ont été transférés dans les souris receveuses TCR α KOK/LT β R^{-/-} qui ont été greffées pour la voie isogénique (blanc), directe (gris) ou indirecte (noir). Les greffons ont été récoltés aux jours 5, 7, 11 et 14. Des analyses de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant les amorces spécifiques : NKp46(+) 5'-ATG CTG CCA ACA CTC ACT G-3' et NKp46(+) 5'-GAT GTT CAC CGA GTT TCC ATT TG-3' pour déterminer l'expression génique de NKp46. Le niveau d'expression des gènes est relatif au niveau des gènes exprimés dans la peau non greffée de chacune des voies respectivement et calibré avec le gène rapporteur GAPDH. Les analyses statistiques des résultats de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant un test ANOVA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. (*p \leq 0,05 **p \leq 0,01 ***p \leq 0,005). n = 3 à 5.



The following table shows the distribution of the variable across three categories. The y-axis represents the frequency of each value, and the x-axis represents the categories. The data is as follows:

Category	Value	Frequency
Category 1	1	40
	2	60
Category 2	1	30
	2	50
Category 3	1	70
	2	90

The total frequency for each category is 100. The distribution is skewed to the right, with the highest frequency occurring in the third category.

CHAPITRE III :
DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Les origines du projet

La greffe d'organes est devenue une pratique couramment utilisée pour de nombreux patients ayant des atteintes irréversibles d'un ou plusieurs de leurs organes. Cette chirurgie se pratique maintenant sans trop de difficultés, mais les risques de rejet sont toujours présents si la personne greffée ne se soumet pas à une thérapie immunosuppressive assez sévère qui la rend plus susceptible aux infections opportunistes et au cancer. Le rejet de greffe reste le principal problème en transplantation, car notre système immunitaire est éduqué à reconnaître le soi du non-soi et tant que nous utiliserons des organes humains provenant d'individus non identiques, le système immunitaire reconnaîtra l'organe transplanté comme une substance étrangère (via l'expression de molécules du CMH différentes par les cellules du greffon) et ceci mènera au rejet. Il est maintenant reconnu que les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle clé dans l'initiation et l'élaboration des réponses alloréactives, aidés des autres lymphocytes, granulocytes et monocytes. L'activation des lymphocytes CD4+ peut se faire selon trois voies : la voie directe, indirecte et la voie semi-directe. Ces trois voies s'exécutent simultanément et indépendamment l'une de l'autre lors du rejet. De ce fait, leur contribution individuelle reste difficile à évaluer expérimentalement, car plusieurs modèles animaux de transplantation ne permettent pas de faire cette distinction ou s'ils le permettent, le modèle utilisé est différent pour étudier les différentes voies, rendant l'interprétation des résultats assez ardue.

Le Dr Claude Daniel a élaboré un modèle de greffe murin de peau, en utilisant les propriétés de reconnaissance du clone de cellule T 2.102, afin de pouvoir étudier séparément les voies d'alloréactivité directe et indirecte tout en utilisant le même clonotype de cellules T alloréactives, facilitant ainsi la comparaison entre les voies. Initialement, le modèle a été utilisé dans le but de déterminer la contribution des lymphocytes T CD4+ dans l'activation et la production d'anticorps par les lymphocytes B dans chacune des voies d'alloréactivité (annexe 1 : (Sauve, Baratin et al. 2004)). Lors de cette étude, il a été démontré que la production d'anticorps d'isotype IgG dans notre modèle était entièrement dépendante de la voie indirecte. En effet, aucune production d'anticorps IgG n'est détectée dans la voie directe suite à une greffe de peau. C'est

pourquoi, lors des expériences réalisées dans le cadre de l'objectif #1 de mon projet, la détection des anticorps dans le sérum est illustrée seulement pour la voie indirecte. Afin de déterminer si cet écart dans la production d'anticorps entre les deux voies n'est pas causé par une différence dans l'activation des lymphocytes T, le profil de sécrétion de cytokines dans les deux voies a été investigué. Il en est ressorti que les lymphocytes T ont un profil mixte de sécrétion de cytokines Th1 (IFN- γ) vs Th2 (IL-4), c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence de production d'IFN- γ et d'IL-4 entre la voie directe et indirecte (figure 4, annexe I). Il est à noter que malgré l'absence ou la présence de production d'anticorps, le rejet de la greffe s'effectue avec une cinétique de rejet semblable. Donc, la production d'anticorps n'est pas un mécanisme déterminant du rejet de greffe dans notre modèle, tel qu'attendu. Par contre, la quantité de lymphocytes T transférés influence le rejet, car le transfert adoptif de seulement 2,5 millions de lymphocytes T n'est pas suffisant pour induire le rejet.

2. Le rejet de greffe peut être induit par les lymphocytes Th1 ou Th2

Nous avons de plus en plus de connaissances sur les mécanismes impliqués dans le rejet de greffe depuis les débuts de la transplantation moderne vers les années 1950. Malgré cela, plusieurs questions sont restées sans réponse et certains concepts que l'on croyait établis ont été remis en doute. Un de ces concepts remis en doute est le rôle joué par les lymphocytes T auxiliaires Th1 et Th2 en transplantation. En se basant sur la présence de certaines cytokines retrouvées dans les greffons, il était initialement suggéré que les lymphocytes Th1 induisaient le rejet de greffe et les lymphocytes Th2 favorisaient l'acceptation des greffes ou induisaient la tolérance (Takeuchi, Lowry et al. 1992).

2.1 Les cytokines Th2 et l'acceptation des greffes

En effet, ce paradigme stipule que les cytokines Th1 (IL-2 et IFN- γ) induisent le rejet de la greffe via l'activation des réponses d'hypersensibilité de type retardé et des lymphocytes T cytotoxiques (Strom, Roy-Chaudhury et al. 1996; Piccotti, Chan et al. 1997). Au contraire, les cytokines Th2 (IL-4) favorisent la tolérance en antagonisant les

mécanismes déclenchés par la réponse Th1 (Piccotti, Chan et al. 1996). Ce paradigme suggère donc que les stratégies visant à détourner la réponse Th1 vers une réponse Th2 induiraient une tolérance et favoriseraient la survie de la greffe (Lakkis 1998). Cette observation a été corroborée par plusieurs études dont une étude humaine où lorsque des patients greffés recevaient des thérapies immunosuppressives, il était observé que l'IL-4 était détecté dans le greffon, mais pas la présence de cytokines Th1 (Strom, Roy-Chaudhury et al. 1996). Des résultats similaires, c'est-à-dire la présence d'IL-4 dans des greffons tolérés, ont été obtenus dans plusieurs modèles animaux où les individus recevaient soit des traitements immunosuppresseurs ou subissaient une modulation immunitaire intra-thymique (Takeuchi, Lowry et al. 1992; Sayegh, Akalin et al. 1995; Onodera, Hancock et al. 1997; Shirwan, Barwari et al. 1998). De plus, il a démontré pour la première fois *in vivo* qu'un transfert adoptif d'une lignée cellulaire de type Th2, spécifique pour un antigène d'une molécule de CMH de classe II, était capable de prolonger la survie de greffes de peau de souris receveuses comparativement aux mêmes souris greffées sans transfert adoptif (Maeda, Takata et al. 1994).

2.2 Les cytokines Th2 et le rejet des greffes

Néanmoins, de multiples études contre ce paradigme ont depuis été publiées. Les premières évidences qui sont venues réfuter cette pensée ont été obtenues à partir de souris déficientes (KO) pour la présence d'une ou plusieurs cytokines. En effet, dans un modèle de souris déficientes pour l'IFN- γ et l'IL-2 où l'action de l'IL-4 n'est pas contrecarrée, aucune tolérance de la greffe n'a été observée (Lakkis 1998). De façon semblable, un traitement avec l'injection de protéines de fusion IL-4-Ig n'a pas non plus entraîné de prolongement de la survie de la greffe (Strom, Roy-Chaudhury et al. 1996). Finalement, Piccotti et al. ont plutôt accéléré le rejet de greffes de cœur lorsqu'ils ont tenté d'induire une réponse de tolérance en bloquant l'IL-12 pour induire des cellules Th2 (Piccotti, Chan et al. 1996). Dans des modèles animaux de transfert de lymphocytes, une première étude a démontré que le transfert de lymphocytes Th1 ou Th2, préalablement différenciés *in vitro*, dans des souris SCID ayant reçu une greffe cardiaque induisait un rejet avec une cinétique comparable (VanBuskirk, Wakely et al. 1996). Une étude menée par Zelenika et al. a confirmé ces résultats (Zelenika, Adams et al. 1998). Cette équipe a

montré que des lymphocytes T CD4+, différenciés *in vitro* en Th1 ou Th2 et spécifiques pour l'antigène de transplantation mineur mâle (H-Y) pouvaient individuellement causer le rejet lorsque ces cellules étaient transférées dans des souris déplétées en cellules T.

Puisque le rejet est possible en absence d'IL-2 et en présence d'IL-4, certains suggèrent que l'IL-4 ne soit pas un marqueur de tolérance, mais plutôt une cytokine moins efficace pour induire le rejet de greffe et qu'elle retarde indirectement le rejet de greffe simplement par son action suppressive sur la réponse Th1 (Strom, Roy-Chaudhury et al. 1996). Toutefois, il a été démontré que les cytokines Th2 peuvent provoquer le rejet par des mécanismes alternatifs. En effet, lorsque les lymphocytes T cytotoxiques (associés à une réponse Th1) sont déplétés chez des souris receveuses de greffe de cœur, le rejet est toujours observé, mais l'infiltration cellulaire dans le greffon est constituée principalement d'éosinophiles et de cellules mononucléées (Chan, DeBruyne et al. 1995). De plus, cette équipe a étudié l'expression de transcrits de cytokines dans le greffon et ils ont observé que lorsque les souris étaient normalement constituées, ils détectaient seulement des cytokines Th1 (IL-2 et IFN- γ). Par contre, lorsque les souris étaient déficientes en CTL, autant des cytokines Th1 (IL-2 et IFN- γ) que Th2 (IL-4 et IL-5) étaient détectées dans les greffons. Donc, il est probable que la présence de la réponse des CTL masque la réponse Th2 et qu'en l'absence de CTL, l'IL-4 peut jouer un rôle et induire le rejet par des mécanismes alternatifs.

2.3 Les cytokines Th2 et le rejet chronique

Certains suggèrent que les Th2 pourraient plus spécifiquement favoriser le rejet chronique du greffon plutôt que la tolérance (Shirwan, Barwari et al. 1998). Plusieurs études ont montré que des cytokines Th2 étaient présentes dans le greffon lorsque le rejet était retardé, mais ceci pourrait éventuellement mener à la dysfonction chronique du greffon. En effet, lors de thérapies immunosuppressives, le rejet aigu et la réponse Th1 est bloqué, mais pas la présence des cytokines Th2 et la dysfonction chronique du greffon. Il serait donc logique de penser qu'une déviation de la réponse lymphocytaire vers un type Th2 soit impliquée dans cette dysfonction (Shirwan, Barwari et al. 1998; Shirwan 1999). D'ailleurs, c'est ce qu'a montré l'étude d'Illigens et al. en utilisant un modèle de greffe de

peau et de cœur (Illigens, Yamada et al. 2009). En greffant de la peau allogénique pour des molécules du CMH de classe I, ils ont observé un rejet autant par des lymphocytes T alloréactifs par la voie directe qu'indirecte. De plus, lorsqu'ils ont induit une réponse indirecte en présence de lymphocytes Th1 ou Th2, les deux types de lymphocytes auxiliaires ont conduit au rejet de greffe quoique un retard était observé dans la cinétique de rejet en présence de lymphocytes Th2. Ces résultats concordent avec les nôtres. Par la suite, ils ont utilisé des greffes de cœur dans le même modèle de souris pour étudier le rejet chronique, car le cœur est moins allogénique que la peau et il n'est pas rejeté de façon aigu dans ce modèle (Illigens, Yamada et al. 2009). Lorsqu'ils ont induit la présence de lymphocytes Th1 chez les souris greffées, aucun rejet n'est survenu tandis que l'induction de lymphocytes Th2 a mené à un rejet chronique caractérisé par une vasculopathie, 50 jours après la greffe. Ces résultats confirment l'importance de la voie indirecte et des lymphocytes Th2 dans le rejet chronique. De plus, les cytokines Th2 jouent un rôle important dans la régulation des mécanismes impliqués dans la dysfonction chronique du greffon tels que la sécrétion d'alloanticorps, l'activation et la prolifération des cellules endothéliales et des cellules des muscles lisses (Shirwan 1999).

2.4 Les lymphocytes Th1-Th2 et le rejet aigu dans notre modèle

De façon similaire à l'étude de Chan et al., des résultats précédents dans le laboratoire ont démontré que dans notre modèle de greffe de peau, où les souris receveuses n'ont pas de lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes T CD4⁺ transférés ne sécrètent pas un type de cytokines en particulier suite à la greffe (Chan, DeBruyne et al. 1995). En effet, nous observons plutôt un profil mixte de sécrétion de cytokines Th1/Th2 dans les deux voies d'alloréactivité suggérant qu'autant la présence d'IFN- γ que d'IL-4 peut mener au rejet de greffe (Sauve, Baratin et al. 2004). Afin de clarifier ce point, nous avons investigué davantage cette question en utilisant notre modèle de greffe de peau où des souris receveuses déficientes en lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont reconstituées avec des cellules T CD4⁺ isolées de souris transgéniques pour le clone 2.102 et différenciées *in vitro* en populations de cellules Th1 ou Th2. Le profil de différenciation a été confirmé par cytométrie en flux intracellulaire et ELISPOT pour la production des cytokines Th1 (IFN- γ) et Th2 (IL-4) avant et après leur transfert. Notre

modèle est particulier, car il nous permet de caractériser les voies directe et indirecte séparément en utilisant le même clone de cellules T dans les mêmes souris receveuses. De plus, il est intéressant de noter que nos souris receveuses sont dépourvues de lymphocytes T CD8+ qui pourraient venir masquer ou diminuer les réponses Th2. En utilisant ce modèle, nous avons ici démontré clairement que les lymphocytes Th1 et Th2 différenciés *in vitro* peuvent individuellement provoquer le rejet de greffe de peau et ce, dans les deux voies d'alloréactivité bien qu'un court délai dans la cinétique de rejet soit observé dans la voie indirecte, lorsque les souris sont reconstituées avec les lymphocytes Th2. Le profil de différenciation des lymphocytes dans les ganglions a été analysé aux jours 11 et 21 post-greffe pour s'assurer du maintien de la sécrétion des cytokines appropriées. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études de transfert *in vivo* effectuées par Zelenika et al. et VanBuskirk et al. qui suggèrent que les cytokines Th2 peuvent aussi induire le rejet (VanBuskirk, Wakely et al. 1996; Zelenika, Adams et al. 1998). En effet, tel que décrit plus haut, ces deux équipes ont aussi utilisé des modèles de transfert de cellules T auxiliaires prédifférenciées *in vitro* et ils ont observé un rejet de greffe indépendamment de la différenciation des lymphocytes. De plus, l'étude de Zelenika et al. a aussi observé un court délai dans la cinétique de rejet des souris reconstituées avec des lymphocytes Th2 dans la voie indirecte. VanBuskirk et al., quant à eux, abondent dans le même sens que nous pour la voie directe; ils n'observent pas de différence de cinétique entre les souris reconstituées avec des lymphocytes Th1 ou Th2. Tous ces résultats viennent donc contredire l'étude initiale de transfert adoptif d'une lignée cellulaire Th2 réalisée par Maeda et al. où une prolongation de la survie de la greffe de 40 jours était observée chez 75% des receveurs.

Les cytokines Th1 (IFN- γ) induisent principalement une réponse à médiation cellulaire, mais elles peuvent aussi diriger les lymphocytes B vers la production d'anticorps d'isotype IgG2a alors qu'elles inhibent la production des isotypes IgG1, IgG2b et IgG3. Au contraire, il a été démontré que l'IL-4 semble plutôt favoriser la production d'isotypes IgG1 par les lymphocytes B (Snapper and Finkelman 1993). Nous avons donc vérifié dans notre modèle si la production d'anticorps confirmait le phénotype des cellules T transférées. Tel qu'attendu, nous avons détecté une forte production

d'anticorps d'isotype IgG2a dans le sérum des souris injectées avec des cellules différenciées en Th1. Une production d'anticorps de type IgG1 a été observée chez les souris reconstituées avec des cellules différenciées en Th2, bien que tous les autres isotypes soient aussi fortement détectés. Cette production d'isotypes multiples pourrait être expliquée par la présence d'autres types cellulaires sécrétant de l'IFN- γ tels que les macrophages ou les cellules NK, mais cet aspect est à vérifier. De plus, il serait intéressant de poursuivre les études afin de caractériser les populations cellulaires présentes et leur sécrétion de cytokines dans les greffes de peau de notre modèle. En effet, deux études ont observé une infiltration particulièrement importante d'éosinophiles et de larges cellules mononucléées dans les greffons rejetés en absence de CTL où la présence de cytokines de Th2 était importante (Chan, DeBruyne et al. 1995; Csencsits, Wood et al. 2005). Ceci laisse présager que les mécanismes impliqués pourraient être différents en présence de cytokines de type Th1 ou Th2. Quoique deux autres études n'ont quant à elles pas nécessairement noté de différence entre les infiltrats cellulaires (VanBuskirk, Wakely et al. 1996; Zelenika, Adams et al. 1998).

2.5 La plasticité des lymphocytes T auxiliaires

Toutefois, avant de caractériser les populations cellulaires pouvant aider les lymphocytes T à conduire au rejet, il serait nécessaire d'analyser la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T CD4⁺ entre les jours 11 et 21 chez les souris transférées avec des lymphocytes Th2, car le rejet de greffe s'effectue pendant cet intervalle. Bien qu'il y ait un pourcentage plus élevé de lymphocytes qui sécrètent de l'IL-4, il y a apparition d'un faible pourcentage de lymphocytes qui sécrètent de l'IFN- γ au jour 21. Ce point est particulièrement important pour attribuer le rejet à la présence des lymphocytes Th2, car il a été observé que les lymphocytes T différenciés vers un phénotype auxiliaire ne seraient pas définitivement commis à ce phénotype comme on le croyait précédemment. En effet, il existerait une plasticité qui permettrait aux lymphocytes T auxiliaires de changer de phénotype sous certaines conditions (Zhou, Chong et al. 2009; O'Shea and Paul 2010; Wan 2010). Jusqu'à maintenant, ce sont les lymphocytes Th17 et iTreg qui démontrent le plus de plasticité, la différenciation en Th1 ou Th2 semblent assez stable (figure 27). Toutefois, une étude a montré que la conversion entre ces deux phénotypes

est possible sous les conditions appropriées, mais en utilisant des lymphocytes T mémoires Th1 ou Th2 (Krawczyk, Shen et al. 2007). De façon similaire, une autre étude a démontré que des lymphocytes Th2 spécifiques pour le virus LCMV et différenciés *in vitro* se sont mis à sécréter de l'IFN- γ lors de leur transfert *in vivo* chez des souris infectées avec ce virus. Cependant, l'activation et la conversion *in vivo* entre ces deux phénotypes restent à prouver.

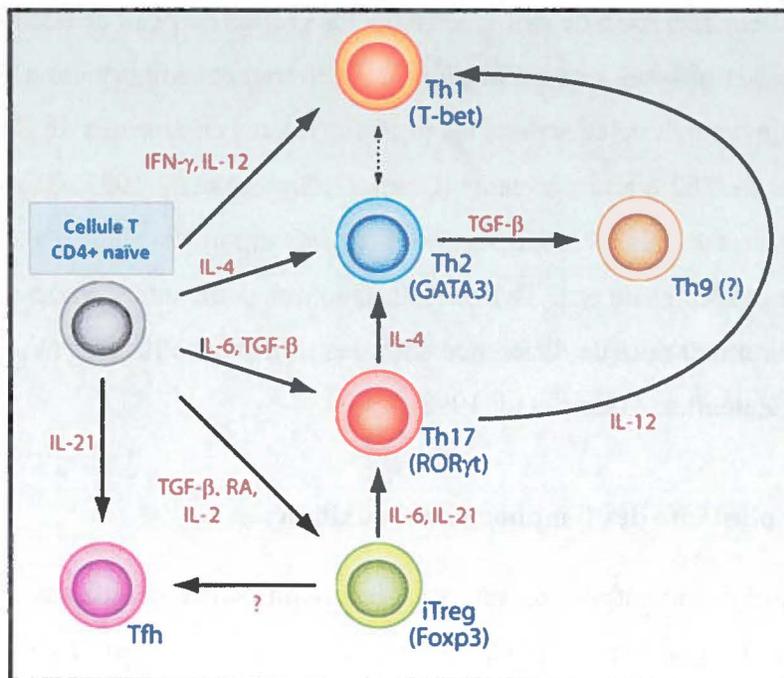


Figure 267 : La différenciation des lymphocytes T auxiliaires en Th1, Th2, Th17, T régulatrices inducibles (iTreg) ou folliculaires (Tfh : présentes dans les follicules B des organes lymphoïdes secondaires) et la plasticité entre les phénotypes (modifiée de (Zhou, Chong et al. 2009)).

2.6 Objectif #1 : résumé et perspectives

Nos résultats démontrent clairement que les lymphocytes Th2 peuvent mener au rejet dans chacune des voies d'alloréactivité quoiqu'avec une cinétique de rejet un peu retardée dans la voie indirecte. Le profil de différenciation des lymphocytes T transférés a été démontré avant et plusieurs temps après leur transfert, mais quelques expériences supplémentaires pourraient être faites pour confirmer qu'il n'y a pas de plasticité des lymphocytes Th2 dans notre modèle. Cependant, comme il existe encore beaucoup d'études contradictoires sur le rôle de l'IL-4 (Tay, Plain et al. 2009), il serait prudent

d'effectuer plus d'études afin d'en arriver à bien comprendre les mécanismes impliqués lors du rejet et d'obtenir un consensus pour espérer développer des stratégies visant à dévier la réponse T immunitaire dans un sens plutôt qu'un autre et favoriser la survie des greffes (Wadia and Tambur 2008).

Pour poursuivre les travaux concernant l'objectif #1 de mon projet, je propose d'investiguer le rôle des lymphocytes Th17 dans notre modèle de rejet de greffe afin de décortiquer la contribution de ces cellules dans chacune des voies d'alloréactivité. Plusieurs études ont montré la présence de la cytokine IL-17 dans des organes rejetés, mais peu d'études ont démontré directement le rôle des Th17 dans le rejet de greffes (Heidt, Segundo et al. 2010; Chadha, Heidt et al. 2011). De plus, aucune de ces études n'a examiné la contribution des lymphocytes Th17 dans les voies directe et indirecte dans le rejet. Un groupe a démontré que l'IL-17 sécrétée par les lymphocytes Th17 attire les neutrophiles et cause ainsi des dommages aux greffons entraînant un rejet accéléré dans un modèle murin de greffes cardiaques en absence de Th1 (Yuan, Paez-Cortez et al. 2008). Il est suggéré que l'IL-17 puisse aussi avoir un rôle dans la dysfonction chronique du greffon, mais la source d'IL-17 ne serait pas nécessairement les lymphocytes (Faust, Lu et al. 2009; Itoh, Nakae et al. 2010). Il serait intéressant de voir si les lymphocytes Th17 causent le rejet et induisent des mécanismes similaires dans les deux voies d'alloréactivité. Il serait attendu que dans la voie directe, qui est associée avec le rejet aigu, les neutrophiles attirés par l'IL-17 sécrétée par les Th17 participent à ce rejet rapide. Il serait intéressant de voir si l'IL-17 sécrétée par les Th17 dans la voie indirecte cause aussi le rejet, et ce, avec la même cinétique. Comme la voie indirecte est la seule voie qui demeure pour induire le rejet à long terme, une implication des neutrophiles dans cette voie confirmerait un rôle des lymphocytes Th17 dans le rejet chronique. Pour ce faire, je différencierais des lymphocytes T 2.102 *in vitro* en Th17 et les injecterais à nos souris receveuses dans notre modèle de greffe de peau et évaluerais tout d'abord la cinétique de rejet. Par la suite, je caractériserais l'infiltration cellulaire dans le greffon à différents temps. Finalement, je m'assurerais du maintien de la différenciation des lymphocytes T *in vivo* en vérifiant leur profil de sécrétion de cytokines, car il a été démontré que les lymphocytes Th17 sont plus flexibles (figure 27). Ces études nous renseigneraient donc

sur la contribution des lymphocytes Th17 dans chacune des voies d'alloréactivité. Éventuellement, il faudrait aussi évaluer la contribution des Th17 dans un modèle physiologique en présence de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ qui ne sont pas prédifférenciés. Même si la contribution des lymphocytes Th17 n'était pas très grande en contexte physiologique, il y a un intérêt à bien comprendre leur rôle dans le rejet de greffe, car cette population pourrait devenir plus importante lorsque l'on manipule le système immunitaire pour induire un état d'immunosuppression ou de tolérance. Par exemple, beaucoup d'études visent à induire un état de tolérance chez le receveur en différenciant ses lymphocytes T *in vitro* en lymphocytes Treg spécifiques des antigènes du donneur (Wood and Sakaguchi 2003). Ces études sont prometteuses, mais elles comportent le risque que les lymphocytes Treg se reconvertissent en lymphocytes T effecteurs sous l'influence des cytokines présentes dans le receveur, entre autres en lymphocytes Th17. Donc, il est important de comprendre le rôle de chaque population cellulaire pouvant être impliquée dans le rejet si l'on veut manipuler le système immunitaire sans engendrer d'autres problèmes.

3. La détermination du site d'activation des lymphocytes T lors du rejet de greffe

Il est généralement accepté que les réponses immunitaires se développent dans les organes lymphoïdes secondaires. En effet, suite à l'invasion de l'organisme par un agent étranger, un microorganisme ou une cellule d'une greffe allogénique par exemple, les cellules présentatrices de l'antigène vont reconnaître cet intrus, l'internaliser et migrer aux OLS pour le présenter sous forme d'antigène aux lymphocytes présents. Dans le cas de la transplantation, ce modèle s'applique pour la voie indirecte où l'alloantigène doit être présenté par une cellule présentatrice d'antigène. Pour la voie directe, le mécanisme proposé était que les CPA du donneur, suite à la transplantation, migrent vers les OLS par la voie lymphatique suite à leur activation par les molécules inflammatoires libérées lors de la chirurgie et activent directement les lymphocytes T alloréactifs. Par contre, dans certains cas d'inflammation chronique et de rejet de greffe, il semble que la réponse immunitaire puisse se développer *in situ*, mais ce concept demeure jusqu'à maintenant

controversé. D'ailleurs, ce sont des résultats obtenus au laboratoire qui abondaient dans ce sens qui sont à l'origine de mon deuxième objectif. En effet, l'analyse des différents résultats dans l'étude de Baratin et al. semble indiquer que l'activation des lymphocytes T s'effectue dans le greffon dans la voie directe par opposition à la voie indirecte où l'activation s'effectue en premier lieu dans les ganglions (Baratin, Bonin et al. 2004). Ces résultats suggéraient donc que les OLS aient un rôle non essentiel pour l'activation des lymphocytes dans la voie directe.

3.1 Des études contradictoires sur l'importance des OLS pour l'initiation des réponses alloréactives

Les premiers indices que l'activation des lymphocytes T puisse survenir hors des organes lymphoïdes secondaires remontent à plus de 50 ans (Medawar 1958). En effet, Sir Peter Medawar a été le premier à parler de sensibilisation périphérique dans ses études en 1958. Depuis, plusieurs études utilisant des modèles animaux dépourvus d'organes lymphoïdes secondaires tels que les modèles de souris *aly/aly*, $LT\alpha^{-/-}$ ou $LT\beta R^{-/-}$ ont surgi. Bien que les souris utilisées dans ces modèles présentent des phénotypes semblables, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent peu ou pas d'OLS, les conclusions auxquelles les études utilisant ces modèles arrivent sont contradictoires. En effet, l'étude initiale de Lakkis et al. en utilisant le modèle de souris *aly/aly*, est arrivée à la conclusion qu'il ne pouvait pas y avoir rejet en absence d'OLS (Lakkis, Arakelov et al. 2000). Par la suite, Zhou et al. sont venus mettre en doute cette affirmation suite à des études avec les souris $LT\beta R^{-/-}$ où il y avait rejet en absence d'OLS (Zhou, Hwang et al. 2003).

Pour ajouter à la confusion, les études sont parfois en désaccord en utilisant le même modèle. En effet, selon la combinaison des haplotypes entre donneurs et receveurs ou la source de la peau du donneur utilisé dans le modèle de souris *aly/aly*, la greffe de peau est tantôt rejetée, tantôt acceptée (Luo, Tanaka et al. 1999; Lakkis, Arakelov et al. 2000; Sugito, Koshinaga et al. 2005; Yamanokuchi, Ikai et al. 2005). L'étude de Lakkis où le rejet était absent chez les souris *aly/aly* ($H-2^b$) utilisait de la peau d'abdomen de souris donneuses $H-2^d$ (Lakkis 1998). Au contraire, dans deux études utilisant de la peau de

souris donneuses H-2^k, les souris *aly/aly* ont rejeté leur greffon (Luo, Tanaka et al. 1999; Sugito, Koshinaga et al. 2005). Finalement, une troisième étude utilisant la même combinaison d'haplotypes (H-2^d à H-2^b) que l'étude de Lakkis et al., mais utilisant de la peau de queue plutôt que de la peau d'abdomen a aussi conclu qu'il y avait rejet. Ces différences ne semblent pas attribuables au manque d'immunogénicité du type de peau utilisée puisqu'il est démontré que la peau de tronc est plus immunogène que la peau de la queue (McFarland and Rosenberg 2009).

Il est à noter que la mutation *aly/aly*, une mutation ponctuelle dans le gène de NIK (NF-κB-inducing kinase) induit des problèmes immunitaires autres que la déficience en OLS tels que des altérations des fonctions et de la migration des lymphocytes T. Ceci pourrait être un facteur limitant pour le rejet de greffe lorsque les conditions ne sont pas optimales pour le rejet (Chin, Zhou et al. 2001). D'un autre côté, le phénotype des lymphocytes T lors des expériences de Zhou et al. avec les souris $LT\beta R^{-/-}$ n'a pas été vérifié et Lakkis réplique que le rejet observé en absence d'OLS pourrait être dû à la présence de cellules préactivées ou mémoires, car il a été démontré que les réponses mémoire sont moins dépendantes des OLS pour rejeter une greffe (Lakkis 2001) (Chalasani, Dai et al. 2002). Donc, de nouveaux modèles sont nécessaires pour apporter de la lumière à ces questions.

3.2 Les OLS ne sont pas nécessaires pour l'activation des lymphocytes de la voie directe dans notre modèle

Afin de nous pencher sur la question, nous avons modifié notre modèle de greffe de peau en créant une nouvelle lignée de souris receveuses sans organes lymphoïdes secondaires. Pour ce faire, les souris $TCR\alpha KOK$ ont été croisées avec des souris $LT\beta R^{-/-}$ afin d'introduire la déficience en récepteurs de la lymphotoxine β. Cette nouvelle lignée de souris, dénommée $TCR\alpha KOK LT\beta R^{-/-}$, a été reconstituée avec des lymphocytes T isolés de souris transgéniques pour le récepteur du clone T 2.102. Donc, notre modèle est particulier dans le sens où il nous permet de caractériser la voie directe et indirecte indépendamment en utilisant le même clonotype de cellule T dans la même lignée de

souris receveuses. Les lymphocytes isolés ont été caractérisés phénotypiquement et fonctionnellement afin de s'assurer qu'ils sont naïfs. En utilisant ce modèle, nous avons clairement démontré que les organes lymphoïdes secondaires ne sont pas nécessaires pour initier le rejet de greffe ni dans la voie directe, ni dans la voie indirecte. Par contre, ils semblent pouvoir faciliter le rejet de greffe, car un certain délai dans la cinétique de rejet est observé par rapport aux souris possédant des OLS dans nos études comme dans celles d'autres groupes (Zhou, Hwang et al. 2003).

La grande quantité de lymphocytes T transférés (10 millions) dans notre modèle pourrait pour certains sembler un facteur limitant à l'extrapolation des résultats dans un cadre physiologique. Toutefois, de précédentes études dans le laboratoire ont permis de déterminer que le nombre minimal de cellules transférées requises pour induire le rejet dans notre modèle se situait autour de trois millions, mais que la cinétique de rejet de greffe demeurerait inchangée indépendamment du nombre de cellules transférées. Puisque nous voulions comparer la cinétique de rejet de ce modèle sans OLS avec la cinétique publiée avec les mêmes souris (TCR α KOK) qui possèdent des OLS, nous avons conservé les mêmes paramètres que l'étude de Sauvé et al. (Sauvé, Baratin et al. 2004).

Une autre préoccupation à propos de notre étude est la possibilité que les lymphocytes T aient proliféré de façon homéostatique. La prolifération homéostatique est un phénomène biologique au cours duquel les lymphocytes T se multiplient lorsqu'ils sont transférés dans un hôte immunodéficient afin de remplir les compartiments cellulaires vacants. Cette expansion cellulaire se produit en l'absence de stimulation antigénique spécifique, mais les lymphocytes se différencient tout de même en cellules pseudo/effectrices ou mémoires. Toutefois, aucune incorporation de BrdU n'est observée dans les lymphocytes T CD4⁺ autant dans le sang que dans la moelle osseuse au cinquième jour post-transplantation (figure S1). De plus, nous considérons que l'incorporation de BrdU dans les cellules en division à des temps aussi courts que deux et quatre heures avant le prélèvement reflète bien l'endroit où les cellules prolifèrent au moment du prélèvement.

Plusieurs études ont maintenant démontré que l'activation des lymphocytes T peut se faire en dehors des organes lymphoïdes secondaires (Lund, Partida-Sanchez et al.

2002; Feuerer, Beckhove et al. 2003; Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno et al. 2004; Klein and Crispe 2006; Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno et al. 2006). La moelle osseuse est un des sites pouvant supporter le trafic et l'activation des lymphocytes T (Tripp, Topham et al. 1997; Feuerer, Beckhove et al. 2003; Clay, Rodrigues et al. 2004; Di Rosa and Pabst 2005). Elle peut donc agir à titre d'organe lymphoïde secondaire alternatif. D'ailleurs, Feuerer et al. ont montré, en utilisant un modèle de transfert adoptif semblable au nôtre, que les lymphocytes T naïfs migrent dans la moelle osseuse pour y former des amas multicellulaires avec des cellules dendritiques. Ils ont aussi observé que les lymphocytes T expriment le CD69 (un marqueur d'activation précoce) et se divisent dans la moelle osseuse suite à une stimulation avec leur antigène spécifique (Feuerer, Beckhove et al. 2003). Ces résultats sont très similaires à nos observations. Donc, il est fort probable que dans notre modèle, la moelle osseuse serve aussi d'OLS de remplacement qui offre une structure organisée permettant une présentation antigénique classique et l'activation de lymphocytes T par la voie indirecte. D'ailleurs, il a été montré que les cellules dendritiques CD11c⁺ résidentes de la moelle osseuse peuvent être responsables de cette présentation antigénique (Feuerer, Beckhove et al. 2003). Une fois activés dans la moelle osseuse, les lymphocytes T peuvent migrer vers la peau greffée à l'aide de l'expression de certains récepteurs de chimiokines tel que CXCR3 qui est un récepteur clé pour la migration des lymphocytes T dans les allogreffes de peau chez la souris (Tan and Zhou 2005). Effectivement, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de CXCR3 dans le greffon aux jours 11 et 14 post-transplantation dans la voie indirecte. Cette expression corrèle avec l'expression de l'ARNm du ligand de ce récepteur, la chimiokine CXCL9 et l'infiltration des lymphocytes T.

Suite à leur entrée dans le greffon, l'activation des lymphocytes T pourrait se dérouler dans des foyers ectopiques de tissus lymphoïdes appelés organes lymphoïdes tertiaires. Ces organes lymphoïdes supplémentaires sont des structures qui ressemblent aux OLS avec des veinules à haut endothélium (HEV), des zones T avec des lymphocytes T et des cellules dendritiques et des follicules germinaux pour les lymphocytes B. Par contre, à la différence des OLS, les OLT ne sont pas encapsulés et ceci permet d'établir plus facilement un milieu riche en cytokines et une arrivée rapide des lymphocytes T (Aloisi and Pujol-Borrell 2006; Motallebzadeh, Bolton et al. 2008). La formation d'OLT

a été rapportée dans plusieurs études et elles ont montré que les OLT peuvent générer des cellules T effectrices qui mènent ensuite au rejet de greffe de peau (Cupedo, Jansen et al. 2004; Nasr, Reel et al. 2007). La signalisation par le récepteur de la lymphotoxine bêta étant indispensable à la formation des structures lymphoïdes, nous avons pu détecter le transcrite du récepteur dans nos greffes de peau, bien que le niveau d'expression soit moindre que dans les peaux non greffées (figure S2). L'expression de l'ARNm d'autres molécules importantes pour la formation des OLT telles que la chimiokine CCL19 et la lymphotoxine bêta (constituée de deux sous-unités bêta et une sous-unité alpha) a été mise en évidence dans les greffons rejetés. La présence du transcrite du récepteur de la chimiokine CCL19, c'est-à-dire CCR7 a aussi été vérifiée, mais son niveau d'expression est difficilement interprétable, car il peut être attribué à la présence de cellules T naïves ou de cellules dendritiques activées. De plus, la détection de l'ARNm de l'enzyme (GlcNAc6-ST-2) requise pour l'expression des veinules à haut endothélium dans les ganglions lymphatiques et la visualisation des adressines (PNAd) exprimées à la surface de ces veinules sont des preuves supplémentaires qui indiquent que des structures lymphoïdes se sont formées dans les allogreffes. En résumé, nos données révèlent que la présence de plusieurs molécules clés impliquées dans la néogenèse des tissus lymphoïdes sont détectées dans les greffons et la visualisation par microscopie confocale confirme la présence de ces structures bien qu'elles ne soient pas organisées avec des zones de lymphocytes B et T.

3.3 Objectif #2 : résumé et perspectives

Nos résultats démontrent que les organes lymphoïdes secondaires ne sont pas nécessaires pour mener au rejet de greffe, peu importe la voie d'alloréactivité, mais leur présence facilite tout de même ce dernier. Dans la voie indirecte, la moelle osseuse pourrait aider en tant qu'organe lymphoïde alternatif à l'activation des lymphocytes T, mais la prolifération observée des lymphocytes T dans la greffe suggère que la moelle osseuse pourrait ne pas être indispensable. La prolifération et l'activation des lymphocytes qui ont été observées dans les allogreffes pourraient être supportées par la présence des structures de type lymphoïde.

En perspective à court terme, il serait intéressant de compléter la caractérisation des mécanismes cellulaires impliqués dans le rejet de greffe de notre modèle, tel qu'amorcé et décrit dans la section des résultats complémentaires. Toutefois, les résultats obtenus seraient à extrapoler avec modération, car notre modèle ne reflète pas un contexte physiologique. Par contre, ils pourraient nous aider à comprendre les événements qui contribuent à l'activation des lymphocytes T dans le greffon. En effet, les neutrophiles semblent contribuer au rejet dans la voie directe. Il serait intéressant d'approfondir quelle interaction ils ont avec les lymphocytes T CD4+, entre autres pour vérifier s'ils servent de CPA comme il a déjà été montré (Culshaw, Millington et al. 2008).

Dans un autre ordre d'idées, je proposerais d'étudier l'importance de la néogenèse lymphoïde dans le rejet de greffe. Dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques et greffons rejetés, on observe la formation de structures lymphoïdes tertiaires (Aloisi and Pujol-Borrell 2006). C'est notamment le cas dans la voie directe de notre modèle. Cependant, il n'est pas bien connu si ces formations sont nécessaires au rejet de la greffe. Une étude publiée récemment a démontré de façon contraire aux autres que des OLT peuvent se former dans les greffes rénales tolérées autant que dans les greffes rejetées de façon chronique (Brown, Sacks et al. 2011). Les auteurs suggèrent que les OLT ne soient pas directement responsables des dommages initiés lors des rejets de greffe ou autres maladies chroniques, mais plutôt qu'ils soient un site immunitaire, tels que les OLS, qui servent de siège à la réponse immunitaire déjà en place, qu'elle soit bénéfique ou délétère. De nouvelles études sont donc requises afin d'éclaircir le rôle jouer par ces formations lymphoïdes.

Pour vérifier ce point, je générerais de nouvelles lignées de souris donneuses pour les 3 voies (B6.AKR, B10.P ou B6mHEL-Hb) qui seraient déficientes pour le récepteur de la lymphotoxine bêta (LT β R), à partir de nos souris donneuses et de souris LT β R, car il a été démontré que la signalisation par ce récepteur est nécessaire au développement des OLT (Aloisi and Pujol-Borrell 2006). Ensuite, j'utiliserais la peau de ces souris donneuses pour greffer les souris TCR α KOK LT β R^{-/-} afin de m'assurer que ni les cellules du greffon, ni les cellules du receveur n'expriment le LT β R et donc qu'il ne peut pas y avoir de développement d'OLT. Si ces structures servent vraiment à l'initiation du rejet, il

ne devrait pas y avoir de rejet dans la voie directe où le greffon est le seul site d'activation des lymphocytes T, car les OLT ne se formeront pas en absence de signalisation par le $LT\beta R$. Par contre, il pourrait y avoir un éventuel rejet dans la voie indirecte si la moelle osseuse sert effectivement d'organe lymphoïde secondaire de remplacement, ce qui serait aussi intéressant à vérifier. S'il y a un rejet dans la voie directe, ceci démontre que les OLT ne sont pas nécessaires pour le rejet aigu de peau dans notre modèle et que leur formation n'est qu'une conséquence de la réponse immunitaire engendrée dans la greffe. Par la suite, s'il n'y a pas de rejet sans la formation d'OLT, il serait logique de se demander si l'absence d'OLS influence le développement d'OLT dans notre modèle ou si ces structures lymphoïdes tertiaires se formeraient en leur présence comme c'est le cas dans plusieurs études en contexte physiologique. Pour ce faire, je pourrais tout simplement évaluer la présence de ces structures dans les greffons des souris receveuses qui possèdent des OLS ($TCR\alpha KOK$).

À plus long terme, si les souris receveuses $TCR\alpha KOK$ forment des OLT dans leur greffon, il serait intéressant de modifier notre modèle de greffe de peau afin d'étudier le rôle des OLT dans le rejet chronique. J'aimerais me pencher sur le rejet chronique (composante immunitaire de la dysfonction chronique du greffon) pour deux raisons. D'abord, car c'est maintenant la principale source de rejet des greffes avec l'utilisation des traitements immunosuppresseurs. Donc, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ce type de rejet permettrait d'améliorer les médicaments immunosuppresseurs pour qu'ils contrôlent aussi le rejet chronique. Ensuite, parce que les OLT sont souvent observés lors de rejet chronique. Je voudrais étudier leur rôle dans cette forme de rejet afin de déterminer s'ils sont nécessaires ou non au rejet et s'ils se forment dans les greffons acceptés comme dans l'étude mentionnée précédemment (Brown, Sacks et al. 2011). Pour ce faire, je devrais établir un nouveau modèle de greffe avec un organe solide, car la peau est trop immunogène et elle est rejetée de façon aigüe dans la majorité des modèles, dont le nôtre. J'effectuerais des greffes avec le cœur de souris donneuses pour la voie indirecte ($B6mHEL-Hb$) ainsi que les témoins isogéniques ($B6.AKR$). Seulement la voie indirecte serait utilisée, car juste les lymphocytes T de la voie indirecte peuvent continuer de reconnaître des antigènes présentés par les CPA du soi après la perte

des CPA du donneur. J'utiliserais les souris receveuses TCR α KOK où je pourrais moduler la quantité de lymphocytes T à leur transférer afin d'établir le modèle. Si je réussis à établir le modèle de rejet chronique, je pourrais évaluer la cinétique de rejet de greffe (par palpation du cœur) chez les souris transplantées. Finalement, je pourrais rechercher par coupes histologiques, la présence d'OLT et corrélérer la présence de ces formations avec le rejet ou l'acceptation du greffon. Si une corrélation est observée, il serait intéressant de bloquer la formation des OLT en utilisant par exemple des greffes déficientes en LT β R ou en bloquant d'autres molécules impliquées dans la signalisation menant à la formation des OLT. Si les OLT s'avèrent être importants dans le rejet de greffe, ils offriront une autre cible sur laquelle travailler afin de parvenir à enrayer le rejet de greffe.

4. Conclusion générale

Mon projet de recherche a tenté d'apporter sa part de lumière et de compréhension sur deux grandes questions auxquelles ont fait face les chercheurs en transplantation. D'une part, nous avons démontré que les lymphocytes Th2 sont aussi capables que les lymphocytes Th1 de mener au rejet de la greffe dans chacune des voies d'alloréactivité bien qu'avec une cinétique de rejet un peu retardée dans la voie indirecte. D'autre part, les organes lymphoïdes secondaires ne sont pas essentiels au rejet de greffe de peau dans la voie directe ni dans la voie indirecte. Cependant, les structures lymphoïdes tertiaires qui se développent dans les greffons pourraient venir remplacer les OLS, laissant donc croire qu'un certain environnement organisé est requis pour le développement d'une réponse immunitaire. Ces recherches sont de petits pas de plus afin de comprendre les nombreux mécanismes impliqués dans le rejet de greffe.

En terminant, je finirai avec une opinion personnelle sur l'avenir de la transplantation. Depuis les débuts du succès de la transplantation dans les années 1950, les découvertes dans le domaine de l'immunologie se sont succédé à un rythme fou. Au départ, le développement de médicaments immunosuppresseurs en a profité grandement. L'arrivée des inhibiteurs de la calcineurine comme la cyclosporine au début des années 1980 a été

un grand pas pour l'immunosuppression plus spécifique, mais une certaine toxicité est associée à la prise de ces médicaments. Depuis, malgré l'avancement constant des connaissances, l'amélioration des médicaments immunosuppresseurs semble avoir ralenti. En effet, le taux de survie des allogreffes à court terme est de plus de 90%. Cependant, le taux de survie des greffes à long terme n'a pas beaucoup changé depuis les années 1990. Malgré qu'il existe de nombreuses stratégies prometteuses qui visent à bloquer des populations cellulaires (ex : lymphocytes B et T) ou des molécules spécifiques (ex : les molécules de costimulation) impliquées dans le rejet ou qui visent le développement de la tolérance de la greffe par le receveur (ex : cellules Treg, cellules dendritiques, cellules Breg), aucune n'a réussi jusqu'à ce jour à atteindre le but ultime en transplantation qui est d'induire un état de tolérance de la greffe sans l'utilisation des médicaments immunosuppresseurs.

Bien qu'il soit important en recherche de comprendre de mieux en mieux les mécanismes impliqués dans la greffe lors du rejet afin d'améliorer les traitements, mon opinion personnelle est que nous ne trouverons pas de solution idéale en voulant manipuler et/ou supprimer le système immunitaire de façon spécifique et efficace pour qu'une greffe soit acceptée ou tolérée, sans qu'il n'y ait des effets secondaires sur les défenses immunitaires de la personne ou qu'un autre mécanisme ne resurgisse pour causer le rejet. Selon moi, il y a trop de cellules impliquées pour réussir à toutes les contrôler. De plus, juste la procédure chirurgicale en soi cause des dommages à la greffe qui initie des réponses inflammatoires non spécifiques et spécifiques par l'activation des cellules dendritiques par les DAMP. Arriver à contrôler tout le système immunitaire pour qu'il soit tolérant à l'organe, mais fonctionnel contre les infections me semble utopique. J'espère que l'avenir me fera mentir.

Finalement, il y a une nouvelle avenue qui semble prometteuse et c'est la médecine régénérative, c'est-à-dire la science qui vise à régénérer des cellules, tissus ou organes humains pour restaurer leur fonction normale. Suggérée depuis plus de 100 ans par Alexis Carrel, la médecine régénérative a connu ses premiers succès récemment. En 2008, la première trachée humaine a été régénérée à partir d'une trachée prélevée chez un donneur cadavérique (Orlando, Wood et al. 2011). Pour ce faire, la trachée a été

décellularisée pour ne conserver que la matrice extracellulaire et elle a été ensuite recellularisée avec les cellules souches du patient. Cette technique est intéressante, car elle élimine le besoin d'immunosuppresseurs puisque les cellules du patient lui-même servent à reconstruire l'organe. Jusqu'à maintenant, un cœur, des poumons et un foie ont été régénérés par ce processus dans des modèles expérimentaux. Toutefois, les reins, les intestins et le pancréas semblent être plus difficiles à régénérer (Orlando, Wood et al. 2011). L'avenir nous dira si un jour nous pourrions régénérer tous les organes sur mesure et ainsi pallier au manque d'organes en transplantation!

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A. K. and A. H. Litchman (2009). Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Issy-les-Moulineaux.
- Afzali, B., G. Lombardi, et al. (2007). "The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease." Clin Exp Immunol **148**(1): 32-46.
- Aloisi, F. and R. Pujol-Borrell (2006). "Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases." Nat Rev Immunol **6**(3): 205-217.
- Antonyamy, M. A., W. C. Fanslow, et al. (1999). "Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors." J Immunol **162**(1): 577-584.
- Arakelov, A. and F. G. Lakkis (2000). "The alloimmune response and effector mechanisms of allograft rejection." Semin Nephrol **20**(2): 95-102.
- Auchincloss, H., Jr., R. Lee, et al. (1993). "The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3373-3377.
- Baddon, A., M. Jones, et al. (2010). "A review of allograft ophthalmic tissue in eye surgery." Cell Tissue Bank **11**(1): 29-38.
- Baddoura, F. K., I. W. Nasr, et al. (2005). "Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection." Am J Transplant **5**(3): 510-516.
- Baratin, M., K. Bonin, et al. (2004). "Frontline: Peripheral priming of alloreactive T cells by the direct pathway of allorecognition." Eur J Immunol **34**(12): 3305-3314.
- BBC, N. (2008). "Farmer has double arm transplant." from <http://news.bbc.co.uk/2/hi/7537897.stm>.
- Benichou, G. (1999). "Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection." Front Biosci **4**: D476-480.
- Benichou, G., E. Fedoseyeva, et al. (1994). "Limited T cell response to donor MHC peptides during allograft rejection. Implications for selective immune therapy in transplantation." J Immunol **153**(3): 938-945.
- Benichou, G. and A. W. Thomson (2009). "Direct versus indirect allorecognition pathways: on the right track." Am J Transplant **9**(4): 655-656.
- Benichou, G., A. Valujskikh, et al. (1999). "Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice." J Immunol **162**(1): 352-358.
- Benjamini, E., G. Sunshine, et al. (2000). Immunology : a short course. New York, Wiley-Liss.
- Bevan, M. J. (1984). "High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity." Immunol.Today **5**(May): 128-130.
- Birchall, M. (2004). "Tongue transplantation." Lancet **363**(9422): 1663.
- Bishop, D. K., S. Chan, et al. (1993). "CD4-positive helper T lymphocytes mediate mouse cardiac allograft rejection independent of donor alloantigen specific cytotoxic T lymphocytes." Transplantation **56**(4): 892-897.
- Bistrup, A., D. Tsay, et al. (2004). "Detection of a sulfotransferase (HEC-GlcNAc6ST) in high endothelial venules of lymph nodes and in high endothelial venule-like vessels within ectopic lymphoid aggregates: relationship to the MECA-79 epitope." Am J Pathol **164**(5): 1635-1644.
- Bradley, J. A. (1996). "Indirect T cell recognition in allograft rejection." Int Rev Immunol **13**(3): 245-255.

- Brazelton, T. R. and R. E. Morris (1996). "Molecular mechanisms of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leflunomide." Curr Opin Immunol **8**(5): 710-720.
- Brown, K., S. H. Sacks, et al. (2011). "Coexpression of Donor Peptide/Recipient MHC Complex and Intact Donor MHC: Evidence for a Link between the Direct and Indirect Pathways." Am J Transplant.
- Brown, K., S. H. Sacks, et al. (2011). "Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection." Eur J Immunol **41**(1): 89-96.
- Buonocore, S., M. Surquin, et al. (2004). "Amplification of T-cell responses by neutrophils: relevance to allograft immunity." Immunol Lett **94**(3): 163-166.
- Caballero, A., N. Fernandez, et al. (2006). "Tolerogenic response: allorecognition pathways." Transpl Immunol **17**(1): 3-6.
- Cai, J. and P. I. Terasaki (2005). "Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment." Hum Immunol **66**(4): 334-342.
- Capla, J. M., D. J. Ceradini, et al. (2006). "Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis." Plast Reconstr Surg **117**(3): 836-844.
- Carragher, D. M., J. Rangel-Moreno, et al. (2008). "Ectopic lymphoid tissues and local immunity." Semin Immunol **20**(1): 26-42.
- Chadha, R., S. Heidt, et al. (2011). "Th17: contributors to allograft rejection and a barrier to the induction of transplantation tolerance?" Transplantation **91**(9): 939-945.
- Chakravarti, A., I. Allaey, et al. (2007). "[Neutrophils and immunity: is it innate or acquired?]." Med Sci (Paris) **23**(10): 862-867.
- Chalasan, G., Z. Dai, et al. (2002). "Recall and propagation of allospecific memory T cells independent of secondary lymphoid organs." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6175-6180.
- Chan, S. Y., L. A. DeBruyne, et al. (1995). "In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection." Transplantation **59**(8): 1155-1161.
- Chatenoud, L. and J.-F. Bach (2008). Immunologie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences.
- Chen, N., Q. Gao, et al. (1996). "Prevention of Th1 response is critical for tolerance." Transplantation **61**(7): 1076-1083.
- Chen, Y. and K. J. Wood (2007). "Interleukin-23 and TH17 cells in transplantation immunity: does 23+17 equal rejection?" Transplantation **84**(9): 1071-1074.
- Chin, R., P. Zhou, et al. (2001). "Confounding factors complicate conclusions in aly model." Nat Med **7**(11): 1165-1166.
- Choy, J. C. (2010). "Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection." Cell Death Differ **17**(4): 567-576.
- Clatworthy, M. R. (2011). "Targeting B cells and antibody in transplantation." Am J Transplant **11**(7): 1359-1367.
- Clay, C. C., D. S. Rodrigues, et al. (2004). "Chemokine networks and in vivo T-lymphocyte trafficking in nonhuman primates." J Immunol Methods **293**(1-2): 23-42.
- Colvin, R. B. and R. N. Smith (2005). "Antibody-mediated organ-allograft rejection." Nat Rev Immunol **5**(10): 807-817.
- Commission, d., l'éthique, de, la, science, et, la, technologie. (2004). Le don et la transplantation d'organes: dilemmes éthiques en contexte de pénurie (AVIS). Ste-Foy, Transcontinental Impression.

- Cruzado, J. M., O. Bestard, et al. (2009). "New immunosuppressive protocols with the advent of novel biological drugs." Transplantation **88**(3 Suppl): S20-23.
- Csencsits, K., S. C. Wood, et al. (2005). "Graft rejection mediated by CD4+ T cells via indirect recognition of alloantigen is associated with a dominant Th2 response." Eur J Immunol **35**(3): 843-851.
- Culshaw, S., O. R. Millington, et al. (2008). "Murine neutrophils present Class II restricted antigen." Immunol Lett **118**(1): 49-54.
- Cupedo, T., W. Jansen, et al. (2004). "Induction of secondary and tertiary lymphoid structures in the skin." Immunity **21**(5): 655-667.
- Daniel, C., A. Grakoui, et al. (1998). "Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands." J Immunol **160**(7): 3244-3250.
- Daniel, C., S. Horvath, et al. (1998). "A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR." Immunity **8**(5): 543-552.
- Devauchelle, B., L. Badet, et al. (2006). "First human face allograft: early report." Lancet **368**(9531): 203-209.
- Di Rosa, F. and R. Pabst (2005). "The bone marrow: a nest for migratory memory T cells." Trends Immunol **26**(7): 360-366.
- Drayton, D. L., S. Liao, et al. (2006). "Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis." Nat Immunol **7**(4): 344-353.
- Dummer, C. D., V. N. Carpio, et al. (2012). "FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance." Transpl Immunol **26**(1): 1-10.
- Eltzschig, H. K. and T. Eckle (2011). "Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation." Nat Med **17**(11): 1391-1401.
- Espinosa, É. and P. Chillet (2006). Immunologie. Paris, Ellipses.
- Fan, L., B. W. Busser, et al. (2003). "Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease." PNAS **100**(6): 3386-3391.
- Faust, S. M., G. Lu, et al. (2009). "Role of T cell TGFbeta signaling and IL-17 in allograft acceptance and fibrosis associated with chronic rejection." J Immunol **183**(11): 7297-7306.
- Felix, N. J. and P. M. Allen (2007). "Specificity of T-cell alloreactivity." Nat Rev Immunol **7**(12): 942-953.
- Feurerer, M., P. Beckhove, et al. (2003). "Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen." Nat Med **9**(9): 1151-1157.
- Fritsche, L., D. Dragun, et al. (2004). "Impact of cyclosporine on the development of immunosuppressive therapy." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 130S-134S.
- Futterer, A., K. Mink, et al. (1998). "The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues." Immunity **9**(1): 59-70.
- Game, D. S. and R. I. Lechler (2002). "Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance." Transpl Immunol **10**(2-3): 101-108.
- Ganji, M. R. and A. Harririan (2012). "Chronic allograft dysfunction: major contributing factors." Iran J Kidney Dis **6**(2): 88-93.
- Gelman, A. E., W. Li, et al. (2009). "Cutting edge: Acute lung allograft rejection is independent of secondary lymphoid organs." J Immunol **182**(7): 3969-3973.
- Gelman, A. E., M. Okazaki, et al. (2008). "CD4+ T lymphocytes are not necessary for the acute rejection of vascularized mouse lung transplants." J Immunol **180**(7): 4754-4762.
- Gluckman, E. (2009). "Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside." Br J Haematol **147**(2): 192-199.

- Gokmen, M. R., G. Lombardi, et al. (2008). "The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation." Curr Opin Immunol **20**(5): 568-574.
- Goldman, M., A. Le Moine, et al. (2001). "A role for eosinophils in transplant rejection." Trends Immunol **22**(5): 247-251.
- Gorantla, V. S., S. Schneeberger, et al. (2010). "T regulatory cells and transplantation tolerance." Transplant Rev (Orlando) **24**(3): 147-159.
- Gorbacheva, V., R. Fan, et al. (2010). "Interleukin-17 promotes early allograft inflammation." Am J Pathol **177**(3): 1265-1273.
- Gould, D. S. and H. Auchincloss, Jr. (1999). "Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection." Immunol Today **20**(2): 77-82.
- Grakoui, A., D. L. Donermeyer, et al. (1999). "TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization." J Immunol **162**(4): 1923-1930.
- Gregori, S., K. S. Goudy, et al. (2012). "The cellular and molecular mechanisms of immunosuppression by human type 1 regulatory T cells." Front Immunol **3**: 30.
- Groux, H. (2003). "Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses." Transplantation **75**(9 Suppl): 8S-12S.
- Hall, B. M. (1991). "Cells mediating allograft rejection." Transplantation **51**(6): 1141-1151.
- Halloran, P. F. (2004). "Immunosuppressive drugs for kidney transplantation." N Engl J Med **351**(26): 2715-2729.
- Hamburger, J., J. Vayse, et al. (1962). "Renal homotransplantation in man after radiation of the recipient. Experience with six patients since 1959." Am J Med **32**: 854-871.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.
- Haskova, Z., N. Usiu, et al. (2000). "CD4+ T cells are critical for corneal, but not skin, allograft rejection." Transplantation **69**(4): 483-487.
- Heidt, S., D. S. Segundo, et al. (2010). "The impact of Th17 cells on transplant rejection and the induction of tolerance." Curr Opin Organ Transplant **15**(4): 456-461.
- Hernandez, M. G. H., L. Shen, et al. (2007). "CD40-CD40 Ligand Interaction between Dendritic Cells and CD8+ T Cells Is Needed to Stimulate Maximal T Cell Responses in the Absence of CD4+ T Cell Help." The Journal of Immunology **178**(5): 2844-2852.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, et al. (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." J Immunol **173**(8): 4828-4837.
- Hofmann, G. O., M. H. Kirschner, et al. (1998). "Vascularized knee joint transplantation in man: a report on the first cases." Transpl Int **11** Suppl 1: S487-490.
- Hosgood, S. A., H. F. Nicholson, et al. (2012). "Oxygenated kidney preservation techniques." Transplantation **93**(5): 455-459.
- Hsieh, H. G., C. C. Loong, et al. (2001). "IL-17 expression as a possible predictive parameter for subclinical renal allograft rejection." Transpl Int **14**(5): 287-298.
- Hu, W., J. Lu, et al. (2006). "A preliminary report of penile transplantation." Eur Urol **50**(4): 851-853.
- Illigens, B. M., A. Yamada, et al. (2009). "Dual effects of the alloresponse by Th1 and Th2 cells on acute and chronic rejection of allotransplants." Eur J Immunol **39**(11): 3000-3009.
- Ito, A., M. Minagawa, et al. (1999). "Cytotoxic pathways in the skin allograft rejection by CD4+ T cells." Transplantation **68**(1): 97-100.
- Itoh, S., S. Nakae, et al. (2010). "IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model." J Clin Immunol **30**(2): 235-240.

- Janeway, C. A., Jr., P. Travers, et al. (2001). Immunobiology 5, The immune system in health and disease. New York, Garland Publishing.
- Jones, N. D., M. Carvalho-Gaspar, et al. (2006). "Effector and memory CD8+ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4+ T cell help." J Immunol **176**(4): 2316-2323.
- Jones, N. D., S. E. Turvey, et al. (2001). "Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection." J Immunol **166**(4): 2824-2830.
- Jonigk, D., U. Lehmann, et al. (2007). "Recipient-derived neoangiogenesis of arterioles and lymphatics in quilty lesions of cardiac allografts." Transplantation **84**(10): 1335-1342.
- Joosten, S. A., C. van Kooten, et al. (2003). "Pathogenesis of chronic allograft rejection." Transpl Int **16**(3): 137-145.
- Jose, M. D., Y. Ikezumi, et al. (2003). "Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection." Transplantation **76**(7): 1015-1022.
- Kagi, D., B. Ledermann, et al. (1996). "Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo." Annu Rev Immunol **14**: 207-232.
- Kahan, B. D. (2003). "Individuality: the barrier to optimal immunosuppression." Nat Rev Immunol **3**(10): 831-838.
- Kamoun, M. (2006). "Mechanisms of chronic allograft dysfunction." Ther Drug Monit **28**(1): 14-18.
- Kang, S. M., Q. Tang, et al. (2007). "CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects." Am J Transplant **7**(6): 1457-1463.
- Kapessidou, Y., C. Habran, et al. (2006). "The replacement of graft endothelium by recipient-type cells conditions allograft rejection mediated by indirect pathway CD4+ T cells." Transplantation **82**(4): 582-591.
- Kim, I. K., D. S. Bedi, et al. (2008). "Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance." Transplantation **86**(7): 889-894.
- Kindt, T. J., R. A. Goldsby, et al. (2008). Immunologie. Paris, Dunod.
- Kitchens, W. H., S. Uehara, et al. (2006). "The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance." Transplantation **81**(6): 811-817.
- Klein, I. and I. N. Crispe (2006). "Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver." J Exp Med **203**(2): 437-447.
- Knepper, M. A. é. (2001). "Renal Homotransplantation in Identical Twins: [Murray JE, Merrill JP, Harrison JH: Surg. Forum VI: 432-436, 1955 (with comments by Joseph E. Murray and Charles B. Carpenter)]." J Am Soc Nephrol **12**(1): 201-204.
- Kobayashi, Y. (2008). "The role of chemokines in neutrophil biology." Front Biosci **13**: 2400-2407.
- Krawczyk, C. M., H. Shen, et al. (2007). "Functional plasticity in memory T helper cell responses." J Immunol **178**(7): 4080-4088.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, et al. (2002). "Mouse Vascular Endothelium Activates CD8+ T Lymphocytes in a B7-Dependent Fashion." J Immunol **169**(11): 6154-6161.
- Krieger, N. R., D. P. Yin, et al. (1996). "CD4+ but not CD8+ cells are essential for all rejection." J Exp Med **184**(5): 2013-2018.
- Lakkis, F. G. (1998). "Role of cytokines in transplantation tolerance: lessons learned from gene-knockout mice." J Am Soc Nephrol **9**(12): 2361-2367.
- Lakkis, F. G. (2001). "Reply to "Confounding factors complicate conclusions in aly model"." Nat Med **7**(11): 1165-1166.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, et al. (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." Nat Med **6**(6): 686-688.

- Lanzetta, M., P. Petruzzo, et al. (2007). "Second report (1998-2006) of the International Registry of Hand and Composite Tissue Transplantation." Transpl Immunol **18**(1): 1-6.
- LaRosa, D. F., A. H. Rahman, et al. (2007). "The innate immune system in allograft rejection and tolerance." J Immunol **178**(12): 7503-7509.
- Le Moine, A., M. Goldman, et al. (2002). "Multiple pathways to allograft rejection." Transplantation **73**(9): 1373-1381.
- Le Moine, A., M. Surquin, et al. (1999). "IL-5 mediates eosinophilic rejection of MHC class II-disparate skin allografts in mice." J Immunol **163**(7): 3778-3784.
- Lechler, R., R. Batchelor, et al. (1991). "The relationship between MHC restricted and allospecific T cell recognition." Immunol Lett **29**(1-2): 41-50.
- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells." J Exp Med **155**(1): 31-41.
- Lechler, R. I., G. Lombardi, et al. (1990). "The molecular basis of alloreactivity." Immunol Today **11**(3): 83-88.
- Lechler, R. I., M. Sykes, et al. (2005). "Organ transplantation--how much of the promise has been realized?" Nat Med **11**(6): 605-613.
- Lee, R. S., M. J. Grusby, et al. (1994). "Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo." J Exp Med **179**(3): 865-872.
- Leguern, C. (2011). "Regulatory T cells for tolerance therapy: revisiting the concept." Crit Rev Immunol **31**(3): 189-207.
- Levi, D. M., A. G. Tzakis, et al. (2003). "Transplantation of the abdominal wall." Lancet **361**(9376): 2173-2176.
- Li, J., E. Simeoni, et al. (2006). "Gene transfer of soluble interleukin-17 receptor prolongs cardiac allograft survival in a rat model." Eur J Cardiothorac Surg **29**(5): 779-783.
- Liu, Z., Y. K. Sun, et al. (1993). "Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity." J Exp Med **177**(6): 1643-1650.
- Loong, C. C., H. G. Hsieh, et al. (2002). "Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection." J Pathol **197**(3): 322-332.
- Loong, C. C., C. Y. Lin, et al. (2000). "Expression of interleukin-17 as a predictive parameter in acute renal allograft rejection." Transplant Proc **32**(7): 1773.
- Lorenz, R. G. and P. M. Allen (1988). "Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5220-5223.
- Lund, F. E., S. Partida-Sanchez, et al. (2002). "Lymphotoxin-alpha-deficient mice make delayed, but effective, T and B cell responses to influenza." J Immunol **169**(9): 5236-5243.
- Luo, Z. J., T. Tanaka, et al. (1999). "Analysis of the mode of action of a novel immunosuppressant FTY720 in mice." Immunopharmacology **41**(3): 199-207.
- Maeda, H., M. Takata, et al. (1994). "Adoptive transfer of a Th2-like cell line prolongs MHC class II antigen disparate skin allograft survival in the mouse." Int Immunol **6**(6): 855-862.
- Magil, A. B. (2009). "Monocytes/macrophages in renal allograft rejection." Transplant Rev (Orlando) **23**(4): 199-208.
- Marieb, E. N. and K. Hoehn (2010). Anatomie et physiologie humaines. Canada, E.R.P.I.
- Matarese, L. E., G. Costa, et al. (2007). "Therapeutic efficacy of intestinal and multivisceral transplantation: survival and nutrition outcome." Nutr Clin Pract **22**(5): 474-481.
- Matas, A. J., R. Kandaswamy, et al. (2004). "Long-term immunosuppression, without maintenance prednisone, after kidney transplantation." Ann Surg **240**(3): 510-516; discussion 516-517.

- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Matzinger, P. and M. J. Bevan (1977). "Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?" Cell Immunol **29**(1): 1-5.
- McFarland, H. I. and A. S. Rosenberg (2009). "Skin allograft rejection." Curr Protoc Immunol **Chapter 4**: Unit 4.4.
- Mebius, R. E. (2003). "Organogenesis of lymphoid tissues." Nat Rev Immunol **3**(4): 292-303.
- Medawar, P. B. (1944). "The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council." J Anat **78**(Pt 5): 176-199.
- Medawar, P. B. (1958). "The homograft reaction." Proc R Soc Lond B Biol Sci **149**(935): 145-166.
- Merrill, J. P., J. E. Murray, et al. (1960). "Successful homotransplantation of the kidney between nonidentical twins." The new england journal of medicine **262**(25): 1251-1260.
- Mills, K. H. (2004). "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" Nat Rev Immunol **4**(11): 841-855.
- Min, B. (2010). "Th2 immunity: a step closer to completion." Immunol Cell Biol **88**(3): 235.
- Mitchell, R. N. and P. Libby (2007). "Vascular remodeling in transplant vasculopathy." Circ Res **100**(7): 967-978.
- Miura, M., T. El-Sawy, et al. (2003). "Neutrophils mediate parenchymal tissue necrosis and accelerate the rejection of complete major histocompatibility complex-disparate cardiac allografts in the absence of interferon-gamma." Am J Pathol **162**(2): 509-519.
- Miyawaki, S., Y. Nakamura, et al. (1994). "A new mutation, *aly*, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice." Eur J Immunol **24**(2): 429-434.
- Moll, S. and M. Pascual (2005). "Humoral rejection of organ allografts." Am J Transplant **5**(11): 2611-2618.
- Mombaerts, P., A. R. Clarke, et al. (1992). "Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages." Nature **360**(6401): 225-231.
- Montgomery, R. A., E. Cozzi, et al. (2011). "Humoral immunity and antibody-mediated rejection in solid organ transplantation." Semin Immunol **23**(4): 224-234.
- Morita, K., M. Miura, et al. (2001). "Early chemokine cascades in murine cardiac grafts regulate T cell recruitment and progression of acute allograft rejection." J Immunol **167**(5): 2979-2984.
- Mosmann, T. R., J. H. Schumacher, et al. (1991). "Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells." Immunol Rev **123**: 209-229.
- Motallebzadeh, R., E. M. Bolton, et al. (2008). "Lymphoid tissue formation in allografts: innocent until proven guilty." Transplantation **85**(3): 309-311.
- Moyron-Quiroz, J. E., J. Rangel-Moreno, et al. (2006). "Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs." Immunity **25**(4): 643-654.
- Moyron-Quiroz, J. E., J. Rangel-Moreno, et al. (2004). "Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity." Nat Med **10**(9): 927-934.
- Muller, I., M. Munder, et al. (2009). "Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms?" Trends Immunol **30**(11): 522-530.
- Murray, J. E. (1993). "Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1981-1990." from http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1990/murray-lecture.html.
- Murray, J. E., J. P. Merrill, et al. (1960). "Study on transplantation immunity after total body irradiation: clinical and experimental investigation." Surgery **48**: 272-284.

- Murray, J. E., J. P. Merrill, et al. (1963). "Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy." N Engl J Med **268**: 1315-1323.
- Murray, J. E., R. E. Wilson, et al. (1968). "Five years' experience in renal transplantation with immunosuppressive drugs: survival, function, complications, and the role of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula." Ann Surg **168**(3): 416-435.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- Nasr, I. W., M. Reel, et al. (2007). "Tertiary lymphoid tissues generate effector and memory T cells that lead to allograft rejection." Am J Transplant **7**(5): 1071-1079.
- Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." Nature **464**(7293): 1367-1370.
- Newell, K. A., D. Phippard, et al. (2011). "Regulatory cells and cell signatures in clinical transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **23**(5): 655-659.
- Nozaki, T., J. M. Rosenblum, et al. (2008). "CD4 T cell-mediated rejection of cardiac allografts in B cell-deficient mice." J Immunol **181**(8): 5257-5263.
- O'Shea, J. J. and W. E. Paul (2010). "Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells." Science **327**(5969): 1098-1102.
- Oberbarnscheidt, M. H., D. Zecher, et al. (2011). "The innate immune system in transplantation." Semin Immunol **23**(4): 264-272.
- Onodera, K., W. W. Hancock, et al. (1997). "Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients." J Immunol **158**(4): 1572-1581.
- Orlando, G., K. J. Wood, et al. (2011). "Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future." Transplantation **91**(12): 1310-1317.
- Orloff, M. S., E. M. DeMara, et al. (1995). "Prevention of chronic rejection and graft arteriosclerosis by tolerance induction." Transplantation **59**(2): 282-288.
- Pabst, R. (2007). "Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary?" Immunol Lett **112**(1): 1-8.
- Park, H., Z. Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
- Petit, F. (2007). "[Tongue, trachea, abdominal wall, uterus, and penis allografts. More details on some other clinical applications of vascularized composite tissue allotransplantation]." Ann Chir Plast Esthet **52**(5): 498-501.
- Piccotti, J. R., S. Y. Chan, et al. (1996). "IL-12 antagonism induces T helper 2 responses, yet exacerbates cardiac allograft rejection. Evidence against a dominant protective role for T helper 2 cytokines in alloimmunity." J Immunol **157**(5): 1951-1957.
- Piccotti, J. R., S. Y. Chan, et al. (1997). "Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival?" Transplantation **63**(5): 619-624.
- Pietra, B. A., A. Wiseman, et al. (2000). "CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II." J Clin Invest **106**(8): 1003-1010.
- Porrett, P. M., M. K. t. Lee, et al. (2008). "A direct comparison of rejection by CD8 and CD4 T cells in a transgenic model of allotransplantation." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **56**(3): 193-200.
- Québec-Transplant. (2011). "Statistiques 2010." from http://www.quebec-transplant.qc.ca/QuebecTransplant_fr/stats_donneurs.htm.
- Redfield, R. R., 3rd, E. Rodriguez, et al. (2011). "Essential role for B cells in transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **23**(5): 685-691.

- Reed, A. J., H. Noorchashm, et al. (2003). "Alloreactive CD4 T Cell Activation In Vivo: An Autonomous Function of the Indirect Pathway of Alloantigen Presentation." J Immunol **171**(12): 6502-6509.
- Rogers, N. J. and R. I. Lechler (2001). "Allorecognition." Am J Transplant **1**(2): 97-102.
- Rothoef, T., A. Gonschorek, et al. (2003). "Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells." Immunology **110**(4): 430-439.
- Sauve, D., M. Baratin, et al. (2004). "Alloantibody production is regulated by CD4+ T cells' alloreactive pathway, rather than precursor frequency or Th1/Th2 differentiation." Am J Transplant **4**(8): 1237-1245.
- Sayegh, M. H., E. Akalin, et al. (1995). "CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2." J Exp Med **181**(5): 1869-1874.
- Sayegh, M. H. and C. B. Carpenter (1996). "Role of indirect allorecognition in allograft rejection." Int Rev Immunol **13**(3): 221-229.
- Sayegh, M. H. and C. B. Carpenter (2004). "Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises." N Engl J Med **351**(26): 2761-2766.
- Schulz, M., H. J. Schuurman, et al. (1995). "Acute rejection of vascular heart allografts by perforin-deficient mice." Eur J Immunol **25**(2): 474-480.
- Schwartz, R., A. Eisner, et al. (1959). "The effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune responses." J Clin Invest **38**(8): 1394-1403.
- Sherman, L. A. and S. Chattopadhyay (1993). "The molecular basis of allorecognition." Annu Rev Immunol **11**: 385-402.
- Shirwan, H. (1999). "Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role?" Transplantation **68**(6): 715-726.
- Shirwan, H., L. Barwari, et al. (1998). "Predominant expression of T helper 2 cytokines and altered expression of T helper 1 cytokines in long-term allograft survival induced by intrathymic immune modulation with donor class I major histocompatibility complex peptides." Transplantation **66**(12): 1802-1809.
- Shoskes, D. A. and K. J. Wood (1994). "Indirect presentation of MHC antigens in transplantation." Immunol Today **15**(1): 32-38.
- Simon, M. (2009). "cours-pharmacie.com."
- Snapper, C. M. and F. D. Finkelman (1993). Immunoglobulin class switching. In: William E. Paul, (éd). Fundamental immunology. W. E. Paul. New York, Raven Press: 837-856.
- Soong, T. R., A. P. Pathak, et al. (2010). "Lymphatic injury and regeneration in cardiac allografts." Transplantation **89**(5): 500-508.
- Spandidos, A., X. Wang, et al. (2010). "PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification." Nucleic Acids Res **38**: D792-799.
- Spandidos, A., X. Wang, et al. (2010). "PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D792-799.
- Spencer, L. A. and P. F. Weller (2010). "Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights." Immunol Cell Biol **88**(3): 250-256.
- Spoerl, S. and X. C. Li (2011). "Regulatory T cells and the quest for transplant tolerance." Discov Med **11**(56): 25-34.
- Strom, T. B., P. Roy-Chaudhury, et al. (1996). "The Th1/Th2 paradigm and the allograft response." Curr Opin Immunol **8**(5): 688-693.
- Strome, M., J. Stein, et al. (2001). "Laryngeal transplantation and 40-month follow-up." N Engl J Med **344**(22): 1676-1679.

- Stuht, S., W. Gwinner, et al. (2007). "Lymphatic neoangiogenesis in human renal allografts: results from sequential protocol biopsies." Am J Transplant **7**(2): 377-384.
- Suchin, E. J., P. B. Langmuir, et al. (2001). "Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question." J Immunol **166**(2): 973-981.
- Suciu-Foca, N., Z. Liu, et al. (1997). "Indirect T-cell recognition in human allograft rejection." Transplant Proc **29**(1-2 /01): 1012-1013.
- Sugito, K., T. Koshinaga, et al. (2005). "The effect of a novel immunosuppressant, FTY720, in mice without secondary lymphoid organs." Surg Today **35**(8): 662-667.
- Surquin, M., A. Le Moine, et al. (2005). "IL-4 deficiency prevents eosinophilic rejection and uncovers a role for neutrophils in the rejection of MHC class II disparate skin grafts." Transplantation **80**(10): 1485-1492.
- Swearingen, B., K. Ravindra, et al. (2008). "Science of composite tissue allotransplantation." Transplantation **86**(5): 627-635.
- Sykes, M., K. Wood, et al. (2008). Transplantation immunology In: William E. Paul, (éd). Fundamental immunology. W. E. Paul. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins p. 1427-1488.
- Takeuchi, T., R. P. Lowry, et al. (1992). "Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance." Transplantation **53**(6): 1281-1294.
- Tan, J. and G. Zhou (2005). "Chemokine receptors and transplantation." Cell Mol Immunol **2**(5): 343-349.
- Tang, J. L., V. M. Subbotin, et al. (2001). "Interleukin-17 antagonism inhibits acute but not chronic vascular rejection." Transplantation **72**(2): 348-350.
- Tang, Q., J. A. Bluestone, et al. (2012). "CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation." J Mol Cell Biol **4**(1): 11-21.
- Tay, S. S., K. M. Plain, et al. (2009). "Role of IL-4 and Th2 responses in allograft rejection and tolerance." Curr Opin Organ Transplant **14**(1): 16-22.
- Terasaki, P. I. and J. Cai (2005). "Humoral theory of transplantation: further evidence." Curr Opin Immunol **17**(5): 541-545.
- Tesar, B. M., G. Chalasani, et al. (2004). "Direct antigen presentation by a xenograft induces immunity independently of secondary lymphoid organs." J Immunol **173**(7): 4377-4386.
- Thaunat, O. (2012). "Humoral immunity in chronic allograft rejection: puzzle pieces come together." Transpl Immunol **26**(2-3): 101-106.
- Tripp, R. A., D. J. Topham, et al. (1997). "Bone marrow can function as a lymphoid organ during a primary immune response under conditions of disrupted lymphocyte trafficking." J Immunol **158**(8): 3716-3720.
- Turka, L. A. and R. I. Lechler (2009). "Towards the identification of biomarkers of transplantation tolerance." Nat Rev Immunol **9**(7): 521-526.
- Uchimura, K. and S. D. Rosen (2006). "Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation." Trends Immunol **27**(12): 559-565.
- Van Kooten, C., J. G. Boonstra, et al. (1998). "Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection." J Am Soc Nephrol **9**(8): 1526-1534.
- Vanaudenaerde, B. M., L. J. Dupont, et al. (2006). "The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation." Eur Respir J **27**(4): 779-787.

- VanBuskirk, A. M., M. E. Wakely, et al. (1996). "Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection." Transplantation **62**(2): 229-238.
- Vu, M. D., F. Amanullah, et al. (2004). "Different costimulatory and growth factor requirements for CD4+ and CD8+ T cell-mediated rejection." J Immunol **173**(1): 214-221.
- Wadia, P. P. and A. R. Tambur (2008). "Yin and yang of cytokine regulation in solid organ graft rejection and tolerance." Clin Lab Med **28**(3): 469-479, vii-viii.
- Wan, Y. Y. (2010). "Multi-tasking of helper T cells." Immunology **130**(2): 166-171.
- Williams, C. B., K. Vidal, et al. (1998). "In vivo expression of a TCR antagonist: T cells escape central tolerance but are antagonized in the periphery." J Immunol **161**(1): 128-137.
- Wing, K., Z. Fehervari, et al. (2006). "Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells." Int Immunol **18**(7): 991-1000.
- Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, et al. (1997). "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." Biotechniques **22**(1): 130-131, 134-138.
- Wood, K. J. and R. Goto (2012). "Mechanisms of rejection: current perspectives." Transplantation **93**(1): 1-10.
- Wood, K. J. and S. Sakaguchi (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." Nat Rev Immunol **3**(3): 199-210.
- Wyburn, K. R., M. D. Jose, et al. (2005). "The role of macrophages in allograft rejection." Transplantation **80**(12): 1641-1647.
- Wynn, T. A. (2005). "T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2." Nat Immunol **6**(11): 1069-1070.
- Xu, S. and X. Cao (2010). "Interleukin-17 and its expanding biological functions." Cell Mol Immunol **7**(3): 164-174.
- Yamanokuchi, S., I. Ikai, et al. (2005). "Asialo GM1 positive CD8+ T cells induce skin allograft rejection in the absence of the secondary lymphoid organs." J Surg Res **129**(1): 57-63.
- Youssef, A. R., C. Otley, et al. (2004). "Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine skin and heart allograft rejection across different antigenic disparities." Transpl Immunol **13**(4): 297-304.
- Yu, G., X. Xu, et al. (2006). "NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells." J Exp Med **203**(8): 1851-1858.
- Yuan, X., J. Paez-Cortez, et al. (2008). "A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy." J Exp Med **205**(13): 3133-3144.
- Zarkhin, V., L. Li, et al. (2008). ""To B or not to B?" B-cells and graft rejection." Transplantation **85**(12): 1705-1714.
- Zelenika, D., E. Adams, et al. (1998). "Rejection of H-Y disparate skin grafts by monospecific CD4+ Th1 and Th2 cells: no requirement for CD8+ T cells or B cells." J Immunol **161**(4): 1868-1874.
- Zerrahn, J., W. Held, et al. (1997). "The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection." Cell **88**(5): 627-636.
- Zhang, S., H. Zhang, et al. (2009). "The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation." Biochem Biophys Res Commun **384**(4): 405-408.
- Zhang, X. and D. M. Mosser (2008). "Macrophage activation by endogenous danger signals." J Pathol **214**(2): 161-178.
- Zhou, L., M. M. Chong, et al. (2009). "Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation." Immunity **30**(5): 646-655.
- Zhou, P., K. W. Hwang, et al. (2003). "Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses." Am J Transplant **3**(3): 259-266.

Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-702.

ANNEXE I: Article
D.Sauvé et al.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

American Society of Transplantation 2004 Aug;4(8):1237-45.

Alloantibody production is regulated by CD4+ T cells' alloreactive pathway, rather than precursor frequency or Th1/Th2 differentiation.

Sauvé D, Baratin M, Leduc C, Bonin K, Daniel C.